

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 03 Décembre 2020
Par Mme ROLAND Estelle**

Étude par biologie moléculaire des discordances entre MALDI-TOF et CLHP observées dans le cadre du dépistage néonatal de la drépanocytose. Mise en évidence de variants neutres.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH, CHU de Lille

Directeur de thèse : Madame le Docteur Claude MEREAU, MCU-PH, CHU de Lille

Assesseur(s) : Monsieur le Docteur Patrice MABOUDOU, PH, CHU de Lille
Monsieur le Docteur Jean-Marc PERINI, MCU-PH, CHU de Lille



Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective :	Régis BORDET
Vice-présidente ressources :	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique

Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale

Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique

Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurie	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

A mon président de jury,

Monsieur le Professeur Thierry Brousseau,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Professeur de Biochimie à la Faculté de Pharmacie, Université de Lille.
Chef de Pôle du Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille.

*Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.
Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Claude Méreau,

Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier,
Maître de Conférences en Biologie Cellulaire à la Faculté de Médecine, Université de Lille,
Praticien Hospitalier dans le secteur des hémoglobinopathies, Centre de Biologie Pathologie
Génétique, CHU de Lille.

*Mes plus sincères remerciements pour votre accompagnement dans ce projet et lors de cette
année dans le secteur des hémoglobinopathies.*

Travailler à vos côtés a été un réel plaisir.

A mes juges,

Monsieur le Docteur Patrice Maboudou,

Praticien Hospitalier dans le secteur des hémoglobinopathies et en Biochimie Automatisée,
Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille.

Patrice, j'ai pu bénéficier de ton large éventail de connaissances et de ton expérience dans de multiples domaines au cours de mon externat et de mon internat. Je t'adresse mes plus sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Jean-Marc Périni,

Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier,
Maître de Conférences en Biochimie à la Faculté de Médecine, Université de Lille,
Praticien Hospitalier dans le secteur du dépistage périnatal, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille.

Je vous remercie pour vos conseils et votre implication dans ce projet. Soyez assuré de ma profonde considération.

A Thomas,

Sans toi ce travail n'aurait pas pu exister, tu as été un excellent formateur, avec beaucoup d'humour ou de sérieux quand il le fallait. Je te souhaite le meilleur pour tes nouveaux projets.

Aux techniciennes des hémoglobines,

Carinne, Marie-Agnès, Odile et Valérie, j'ai été très heureuse de travailler à vos côtés pendant cette année.

Merci à Gilles Renom, qui a répondu à toutes mes questions impromptues au cours de l'écriture de ma thèse.

A Lucie, Victoria et Jaime,

Merci pour les bons moments au labo et ailleurs.

A Guillaume,

Merci pour tout.

Au laboratoire du CH de Douai,

J'ai beaucoup appris lors du semestre à vos côtés, merci !

A ma maman,

Merci de ton soutien dans tous mes choix.

A mes grands-parents, à ma famille,

Pour une réunion de « la famille des Haas » au plus vite.

A mes amis « du théâtre »,

Thomas, Léo, Coralie, Laura, bonne chance à chacun pour vos beaux projets en cours et à venir !

A toute la troupe de la « Baraque Foraine »,

Merci pour toutes ces années de théâtre, de répétitions et de représentations. A l'équipe de Réveillon d'été : Henri, Hervé, Anne, Odile, Nathalie, Nadine et Jeanne. Dans l'espoir que 2021 nous revoie sur les planches.

Merci à Erwin, à Marine.

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS	19
INTRODUCTION	21
GENERALITES	25
I. DEPISTAGE NEONATAL	25
A. <i>Principe du dépistage, principe du dépistage néonatal</i>	<i>25</i>
1. Le dépistage	25
2. Le dépistage néonatal	25
B. <i>Critères de mise en place d'un dépistage néonatal</i>	<i>26</i>
C. <i>Historique</i>	<i>28</i>
D. <i>Encadrement légal</i>	<i>28</i>
E. <i>Organisation</i>	<i>29</i>
1. Organisation régionale et nationale	29
2. Circuit du dépistage	30
F. <i>L'échantillon : le buvard « Guthrie »</i>	<i>31</i>
1. Avantages	32
2. Difficultés	32
G. <i>Aspects éthiques</i>	<i>33</i>
II. LES HEMOGLOBINOPATHIES	34
A. <i>L'hémoglobine</i>	<i>34</i>
1. Structure	34
2. Gènes de globine	35
3. Fonctions	37
B. <i>Les anomalies quantitatives et qualitatives</i>	<i>37</i>
C. <i>Critères de suspicion d'une anomalie de l'hémoglobine</i>	<i>38</i>
D. <i>Diagnostic biologique d'une hémoglobinopathie</i>	<i>39</i>
1. Principes de la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine	39
2. Pré-analytique	40
3. Électrophorèse capillaire	40
4. Chromatographie liquide haute performance	42
5. Isoélectrofocalisation	43
III. LA DREPANOCYTOSE	44
A. <i>Épidémiologie</i>	<i>44</i>
B. <i>Génotypes du syndrome drépanocytaire majeur</i>	<i>45</i>
C. <i>Physiopathologie</i>	<i>46</i>
D. <i>Présentations cliniques</i>	<i>47</i>
1. Hétérozygote AS	47
2. Les syndromes drépanocytaires majeurs	47
E. <i>Prise en charge</i>	<i>48</i>
1. Prévention et traitements des manifestations cliniques	48
2. Conseil génétique	50
F. <i>Diagnostic biologique</i>	<i>51</i>
1. Techniques séparatives	51
2. Test de solubilité	51
3. Biologie moléculaire	51
IV. LE DEPISTAGE NEONATAL DANS LE CADRE DE LA DREPANOCYTOSE	52

A.	<i>Enjeux</i>	52
B.	<i>Pathologies recherchées</i>	52
C.	<i>Populations ciblées</i>	53
D.	<i>Organisation spécifique au dépistage de la drépanocytose</i>	54
E.	<i>Stratégie de dépistage</i>	56
F.	<i>Spectrométrie de masse MALDI-TOF</i>	56
G.	<i>Confirmation du dépistage par chromatographie liquide haute performance</i>	58
H.	<i>Suivi et confirmation diagnostique</i>	60
V.	LES VARIANTS NEUTRES	60
A.	<i>Définition</i>	60
B.	<i>Problématique clinique des variants neutres</i>	60
C.	<i>Quand suspecter un variant neutre</i>	61
D.	<i>Mettre en évidence et identifier un variant neutre</i>	62
VI.	SEQUENÇAGE DES GENES DE GLOBINE	63
A.	<i>Particularités des gènes de globine</i>	63
1.	Homologies de séquence.....	63
2.	Modulations du phénotype	63
3.	Polymorphismes	64
B.	<i>Amplification et séquençage Sanger</i>	64
1.	Principe de la PCR	64
2.	Principe du séquençage Sanger	65
DISCORDANCES ENTRE LES TECHNIQUES DE SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF ET DE CLHP		67
I.	NOTATIONS	67
II.	PROBLEMATIQUES GENERALES D'INTERPRETATION DES RESULTATS	68
III.	PROFILS DE SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF	68
A.	<i>Cadre de lecture et résolution</i>	68
B.	<i>Méthodes de classification</i>	69
C.	<i>Distinction de profils anormaux et de profils de mauvaise qualité</i>	70
D.	<i>Profil typiques</i>	71
1.	Profil non pathologique « FA »	72
2.	Profil non pathologique « FAS »	72
3.	Profil pathologique « FS ».....	73
IV.	PROFILS DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	74
A.	<i>Classification des profils</i>	74
B.	<i>Profil non pathologique « FA »</i>	74
C.	<i>Profil non pathologique « FAS »</i>	75
D.	<i>Profil pathologique « FS »</i>	75
E.	<i>Profil pathologique « FSC »</i>	76
V.	DISCORDANCE DE RESULTATS ENTRE LES DEUX TECHNIQUES.....	77
A.	<i>Définition et problématique des discordances</i>	77
B.	<i>Cas de discordances analysés dans le cadre de cette étude</i>	78
C.	<i>Hypothèses sur l'origine des discordances</i>	79
VI.	STRATEGIES POUR L'ETUDE DE CES DISCORDANCES.....	80
A.	<i>Apport de la biologie moléculaire</i>	80
B.	<i>Adapter les techniques de biologie moléculaires disponibles au buvard</i>	81
MATERIEL ET METHODES		83
I.	SELECTION DES ECHANTILLONS	83
A.	<i>Recueil de données</i>	83

B.	<i>Population d'étude</i>	83
C.	<i>Critères d'inclusion et d'exclusion</i>	84
II.	MATERIELS.....	85
A.	<i>Nature des échantillons</i>	85
B.	<i>Techniques séparatives utilisées pour l'étude de l'hémoglobine</i>	85
III.	METHODE : APPLICATION DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE AU BUVARD, MISE AU POINT 85	
A.	<i>Extraction d'ADN</i>	86
B.	<i>PCR</i>	87
C.	<i>Purification</i>	88
D.	<i>Réaction de séquençage</i>	88
E.	<i>Séquençage Sanger</i>	89
IV.	DETERMINATION DE LA PATHOGENICITE DES VARIANTS.....	90
V.	ÉVALUATION DE LA FREQUENCE DES DISCORDANCES.....	90
RESULTATS		91
I.	RESULTAT DU SEQUENÇAGE.....	91
II.	DIFFERENTS CAS.....	92
A.	<i>FAS > FA</i>	92
B.	<i>FS > FAS</i>	93
C.	<i>FS > FA</i>	94
III.	DESCRIPTION DES VARIANTS D'HEMOGLOBINE RENCONTRES.....	95
A.	<i>Hb Yaoundé</i>	95
B.	<i>Hb Beirut</i>	97
C.	<i>Hb Franklin Park</i>	98
D.	<i>Hb Athens-Georgia</i>	99
E.	<i>Hb β45 Phe>Leu</i>	101
F.	<i>Hb β123 Thr>Ala</i>	101
IV.	VERIFICATION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE.....	102
V.	ÉVALUATION DE LA FREQUENCE DES DISCORDANCES.....	102
DISCUSSION		105
I.	SIGNIFICATION DES DISCORDANCES RETROUVEES.....	105
A.	<i>Variants neutres d'hémoglobines</i>	105
B.	<i>Diversité des variants</i>	105
C.	<i>Impact clinique</i>	106
II.	APPORTS DE L'ETUDE, APPLICATIONS.....	108
A.	<i>Apport à l'interprétation du dépistage néonatal</i>	108
B.	<i>Intérêt clinique et intérêt secondaire du dépistage néonatal</i>	108
III.	LIMITES DE L'ETUDE.....	109
A.	<i>Limitations liées à l'échantillon</i>	109
B.	<i>Influence de la population sélectionnée sur les variants retrouvés</i>	109
C.	<i>Limitations liées à l'absence de données cliniques</i>	110
D.	<i>L'étude ne s'applique qu'à une forme de discordance</i>	110
CONCLUSION		111
BIBLIOGRAPHIE.....		113
ANNEXES		121

ABBREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLHP-EC	Chromatographie Liquide Haute Performance Échangeuse de Cations
CNCDN	Centre National de Coordination du Dépistage Néonatal
CRDN	Centre Régional de Dépistage Néonatal
CSP	Code de Santé Publique
ddNTP	Didéoxyribonucléotides tri-phosphates
DNN	Dépistage Néonatal
dNTP	Déoxyribonucléotides tri-phosphates
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
HAS	Haute Autorité de Santé
Hb	Hémoglobine
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
IEF	Isoélectrofocalisation
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time Of Flight</i>
MCAD	<i>Medium-chain acyl-coenzyme A Dehydrogenase</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHHF	Persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale
T_R	Temps de rétention

INTRODUCTION

Les hémoglobinopathies sont des pathologies génétiques du globule rouge touchant l'hémoglobine. Les plus fréquentes et les mieux décrites sont la drépanocytose et les thalassémies, retrouvées dans les populations originaires d'Afrique ou d'Asie, et aujourd'hui dans le monde entier du fait des flux migratoires.

A l'état homozygote les hémoglobinopathies peuvent causer des symptômes importants, qui nécessitent une prise en charge dès la naissance et peuvent provoquer des complications. Plus de 1800 variants sont décrits à ce jour (1) et de nouveaux s'y ajoutent régulièrement.

Les variants les plus difficiles à identifier sont probablement les variants dit « neutres », car invisibles par les techniques d'analyses utilisées en routine, où l'hémoglobine anormale n'est pas séparable de l'hémoglobine normale. Ils sont d'une grande variété et avec des conséquences cliniques très disparates selon les variants.

Leur difficulté de mise en évidence est une grande contrainte dans la pratique courante et contribue à l'errance diagnostique. Seul le séquençage par biologie moléculaire permet de les identifier formellement.

Depuis 1972 le diagnostic néonatal est proposé à l'ensemble des nouveau-nés nés en France pour des maladies à graves conséquences cliniques. La phénylcétonurie a été la première pathologie recherchée ; au fil des années d'autres s'y sont ajoutées, dont une hémoglobinopathie, la drépanocytose. Le diagnostic précoce va réduire la mortalité et les conséquences cliniques. Le bénéfice pour le nouveau-né est au cœur de la démarche de dépistage.

Le dépistage de la drépanocytose en France est ciblé aux populations à risque, ce qui a concerné 43,3 % des nouveau-nés en 2019 (2). Ce volume important d'analyses a la particularité, par rapport aux autres pathologies du dépistage néonatal, de s'organiser autour d'un nombre plus restreint de sites. Le Centre de Biologie Pathologie Génétique du CHU de Lille est l'un des 3 principaux centres, traitant des demandes émanant de métropole et de certains départements d'Outre-Mer. Au CHU de Lille, les analyses sont effectuées par une collaboration entre le laboratoire de dépistage périnatal et le secteur des hémoglobinopathies.

Pour un dépistage, les cas positifs par technique initiale doivent être confirmés par une seconde technique. Afin d'adapter les performances analytiques au volume d'analyse et aux objectifs du dépistage néonatal de la drépanocytose, c'est désormais la technique de spectrométrie de masse en temps de vol qui est utilisée à Lille et non plus l'électrophorèse capillaire (3). La spectrométrie de masse permet de sélectionner les enfants porteurs de l'hémoglobine S et doit être secondairement confirmée par chromatographie liquide haute performance (CLHP). L'intérêt de cette nouvelle stratégie est de ne repérer que les drépanocytoses majeures et les hétérozygotes, en excluant les autres variants tels que D, E et O'Arab. La détection systématique de ces derniers ne fait pas partie des objectifs de Santé Publique.

Avec un recul d'un an d'utilisation, il s'avère que la spectrométrie de masse met en évidence des variants supplémentaires de l'hémoglobine par rapport aux autres techniques. Mais ces variants ne sont pas identifiables car ils ne sont pas visualisés par la technique de confirmation CLHP pour laquelle le profil apparaît normal. Le résultat est donc discordant. L'hypothèse de variants non séparables de l'hémoglobine normale en CLHP est alors avancée, c'est-à-dire des variants neutres. Lille étant le seul centre à utiliser cette combinaison de techniques, nous ne disposons pas de données de la littérature sur les variants neutres observables par spectrométrie de masse.

Tant que ces variants restent non identifiés, il est impossible de déterminer leur pathogénicité par rapport à des cas précédemment décrits. Nous ne disposons pas non plus de données cliniques car les nouveau-nés ne présentent pas encore de symptômes potentiellement liés à ces hémoglobinopathies. Le moyen de les identifier est d'avoir recourt à la biologie moléculaire puis de comparer les variants retrouvés à une base de données. Si ces variants s'avèrent pathologiques, les indiquer lors du dépistage néonatal peut engendrer un bénéfice pour l'enfant. Une réflexion pourra alors être engagée sur l'intérêt de les signaler.

C'est pourquoi cette étude a eu pour but de caractériser par biologie moléculaire les gènes de globine de 51 de ces profils discordants. Une fois les données acquises, un inventaire des variants neutres pouvant être rencontrés en spectrométrie de masse peut être établi.

Les profils ciblés par cette étude sont dans un premier temps ceux qui mettent en évidence une hémoglobine S en spectrométrie de masse mais qui ne sont pas confirmés par CLHP. Ce sont ceux qui compliquent l'interprétation des résultats par le biologiste. En effet, pour ces cas la question se pose de savoir s'il s'agit d'une erreur analytique ou s'il existe réellement un variant, S ou autre, qui puisse avoir des conséquences cliniques pour le nouveau-né.

L'objectif principal de cette thèse est l'exploration des discordances retrouvées entre les techniques de spectrométrie de masse MALDI-TOF et de chromatographie liquide haute performance, dans le cadre du dépistage néonatal de la drépanocytose. L'étude veut montrer que ces discordances sont expliquées par la présence de variants neutres d'hémoglobine.

Les objectifs secondaires sont d'identifier les variants pouvant être rencontrés et de déterminer leur pathogénicité.

Ce travail est le résultat d'une collaboration entre le laboratoire de dépistage périnatal et le secteur des hémoglobinopathies.

GENERALITES

I. Dépistage néonatal

A. Principe du dépistage, principe du dépistage néonatal

1. Le dépistage

Un dépistage vise à repérer une pathologie de façon précoce, avant l'apparition des symptômes, pour la prévenir ou en diminuer les conséquences. C'est donc apporter un bénéfice pour l'individu et/ou la société.

C'est l'un des principaux axes sur lequel s'appuie la médecine préventive.

Le dépistage est à différencier du diagnostic. En effet, le dépistage estime la probabilité de l'existence d'une pathologie alors que le diagnostic détermine si elle est présente ou non. De plus, un dépistage ne s'applique qu'aux personnes asymptomatiques ; un test diagnostic s'adresse plutôt aux cas symptomatiques.

C'est pourquoi la majorité des programmes de dépistage opèrent en deux temps, avec une première phase de tri (ou « screening », avec un test de dépistage), puis une phase diagnostique réservée à la confirmation des dépistages positifs (4,5).

2. Le dépistage néonatal

Le dépistage néonatal (DNN) est un programme de santé national, proposé gratuitement à la naissance de tout enfant sur le territoire français.

Par un prélèvement sanguin à 72h de vie, il permet le dépistage de maladies graves, asymptomatiques à la naissance et dont la prise en charge précoce améliore le pronostic vital.

Les objectifs peuvent être résumés ainsi (6,7) :

- Dépister le maximum d'enfants : en le proposant gratuitement à tous les nouveau-nés.
- Le plus efficacement possible : avec des techniques analytiques sensibles et spécifiques, de haut débit.

- Avec un rapport bénéfice/risque élevé : on apporte un bienfait non négligeable à l'enfant, sa famille et à la société par une prise en charge adaptée.
- Par un coût faible : un grand nombre d'échantillons devront être testés.

En France cinq pathologies sont dépistées à ce jour : la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, la drépanocytose, l'hyperplasie congénitale des surrénales et la mucoviscidose.

Les analyses réalisées sont des dosages biochimiques, sauf pour la confirmation de la mucoviscidose en cas de dosage de trypsine immuno-réactive (TIR) élevé, celle-ci étant la recherche génétique de mutations.

B. Critères de mise en place d'un dépistage néonatal

Les critères de Wilson et Jungner édités par l'OMS en 1968 (4) proposent des règles pour juger de l'utilité de la mise en place d'un programme de dépistage :

- 1) *Il faut que la maladie dont on recherche les cas constitue une menace grave pour la santé publique.*
- 2) *Il faut qu'un traitement d'efficacité démontrée puisse être administré aux sujets chez lesquels la maladie a été décelée.*
- 3) *Il faut disposer de moyens appropriés de diagnostic et de traitement.*
- 4) *Il faut que la maladie soit décelable pendant une phase de latence ou au début de la phase clinique.*
- 5) *Il faut qu'il existe une épreuve ou un examen de dépistage efficace.*
- 6) *Il faut que l'épreuve utilisée soit acceptable pour la population.*
- 7) *Il faut bien connaître l'histoire naturelle de la maladie, notamment son évolution de la phase de latence à la phase symptomatique.*
- 8) *Il faut que le choix des sujets qui recevront un traitement soit opéré selon des critères préétablis.*
- 9) *Il faut que le coût de la recherche des cas (y compris les frais de diagnostic et de traitement des sujets reconnus malades) ne soit pas disproportionné par rapport au coût global des soins médicaux.*
- 10) *Il faut assurer la continuité d'action dans la recherche des cas et non la considérer comme une opération exécutée « une fois pour toutes ».*

Ces critères sont toujours utilisés aujourd'hui comme référentiel à défaut de consensus international, mais sont adaptés par chaque pays. Ceci résulte en de grandes disparités entre les programmes de DNN des différents pays (variabilité des populations cibles, des pathologies recherchées, des techniques utilisées) (8).

En France la Haute Autorité de Santé (HAS) distingue des critères majeurs et des critères mineurs pour juger de l'intérêt d'un programme de dépistage. Ils ont été utilisés en 2020 pour évaluer l'extension du dépistage néonatal à plusieurs erreurs innées du métabolisme par la technique de spectrométrie de masse en tandem (9).

- Les critères majeurs sont :
 - La connaissance de l'histoire naturelle de la maladie,
 - Sa gravité,
 - L'efficacité du traitement,
 - Le bénéfice individuel d'une intervention précoce,
 - La fiabilité de l'examen de dépistage.
- Les critères mineurs sont :
 - L'incidence de la maladie,
 - L'impact organisationnel du dépistage.

Il faut que le dépistage soit possible avant l'apparition des symptômes, avec un traitement efficace disponible.

La pathologie doit avoir une prévalence élevée (au moins égale à celle de la phénylcétonurie, environ 1/15000). Actuellement, la possibilité de dépister plusieurs maladies à partir d'une même technique permet d'envisager le dépistage de pathologies à prévalence plus faible.

L'existence d'une technique de dépistage robuste et peu coûteuse (aspect médico-économique) avec un test fiable et validé est nécessaire.

L'impact organisationnel englobe l'équipement des laboratoires, la mise au point de la technique, les délais de rendu, la prise en charge clinique et l'information des familles et des professionnels de santé.

Les notions de bénéficiaire (enfant) et de réduction de l'errance diagnostique sont intégrées.

La mise en place d'un programme de dépistage néonatal repose donc sur deux axes : le bénéfice pour le nouveau-né et la faisabilité.

La drépanocytose entre dans ce cadre, étant l'une des pathologies monogéniques la plus fréquente dans le monde, bien décrite (10), entraînant des complications sérieuses voir mortelles (11), avec une prophylaxie des complications infectieuses disponible et nécessaire dès les premiers mois de vie (12), des techniques de dépistage fiables et l'appui d'un réseau national de dépistage déjà déployé en France.

C. Historique

Robert Guthrie met au point en 1963 un dosage de la phénylalanine à partir de gouttes de sang séché sur un papier buvard pour le dépistage de la phénylcétonurie (13). Dix ans auparavant, Horst Bickel avait révolutionné la prise en charge de la pathologie en montrant l'utilité d'un régime appauvri en phénylalanine, à condition d'être mis en place dans les premières semaines de vie (14). En associant le dépistage précoce à la prise en charge, on modifie radicalement l'évolution de la pathologie : la voie du dépistage néonatal est alors ouverte (15).

Des programmes de santé publique commencent à être organisés par les États et le dépistage néonatal via le buvard s'étend à d'autres pathologies.

La France commence en 1972 avec la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale en 1978, la drépanocytose dès 1981 (progressivement déployée dans les départements d'Outre-Mer puis en métropole en 1995) (16), l'hyperplasie congénitale des surrénales en 1995 et la mucoviscidose en 2002. Il est prévu que le dépistage du déficit en acyl-CoA-déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD) soit mis en place au 1^{er} décembre 2020 (17).

D. Encadrement légal

Le dépistage néonatal est encadré par l'arrêté ministériel du 22 février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale (18).

Selon cet arrêté,

« Les professionnels de santé ont l'obligation d'informer les parents du programme de dépistage néonatal (DNN). L'information est d'abord orale et se fait par la remise, autant que possible avant l'accouchement et obligatoirement avant le prélèvement, du dépliant d'information, réalisé au niveau national et fourni par le Centre Régional de Dépistage Néonatal (CRDN). Le but est d'expliquer la nature de l'acte, les objectifs du DNN et les maladies dépistées.

Une personne titulaire de l'autorité parentale doit donner son consentement à la réalisation du DNN. Le consentement n'a pas besoin d'être écrit, hormis pour les examens de biologie médicale de génétique pour lesquels le consentement des deux parents est obligatoire (art. R. 1131-4 du CSP).

Le refus du DNN doit :

- Faire l'objet de la signature, par le titulaire de l'autorité parentale qui a refusé la réalisation du DNN, d'un formulaire type de refus, fixé par arrêté du ministère chargé de la santé et fourni aux services préleveurs par le CRDN ;*

- *Conduire à archiver le formulaire signé au niveau, d'une part, du service préleveur dans le dossier de la mère et, d'autre part, du CRDN après transmission systématique ;*
- *Conduire à renseigner et transmettre systématiquement au CRDN un buvard de prélèvement sans prélèvement sanguin (« buvard blanc ») ;*
- *Conduire à inscrire l'information dans le carnet de santé du nouveau-né remis aux titulaires de l'autorité parentale.*

En cas de refus du DNN, le CRDN doit :

- *Archiver les formulaires de refus ;*
- *Recenser les refus et transmettre leur nombre à l'ARS et au niveau national. »*

Les refus de dépistage sont marginaux, ils représentaient 0,04% des naissances en 2019 (2) .

E. Organisation

1. Organisation régionale et nationale

Depuis 1972, le dépistage néonatal en France était géré par un réseau associatif régional, coordonné au niveau national par l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) avec un financement de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS) (6,19).

Au 1^{er} 2018 ce dispositif a été restructuré pour passer à une organisation hospitalière, sous la responsabilité des Agences Régionales de Santé (18).

Le niveau régional est assuré par des Centres Régionaux de Dépistage Néonatal (CRDN). Ils permettent une action de proximité et sont rattachés à un Centre de Référence des Maladies Rares (CRMAR).

Les CRDN assurent des missions :

- De formation : former les acteurs du dépistage néonatal (sage femmes, pédiatres, biologistes médicaux...) sur le prélèvement, les pathologies et l'organisation du réseau.
- De transmission des échantillons au laboratoire réalisant les analyses.
- De coordination entre les différents acteurs : assurer la collecte et la transmission des informations de l'étape du prélèvement à celle du rendu de résultat.
- De gestion du suivi des nouveau-nés positifs.

Le Centre National de Coordination du Dépistage Néonatal (CNCDN) assure des missions au niveau national. Il remonte les données du dépistage pour une exploitation épidémiologique (au sein d'une commission épidémiologique), évalue les tests actuels et l'extension du

dépistage à de nouvelles pathologies (au sein d'une commission biologique), assure la coordination avec les centres régionaux et les partenaires institutionnels et prépare des documents d'information à destination du public et des professionnels (20).

Au total, cette organisation garantit le lien entre les professionnels de santé pour gérer le diagnostic et le suivi de l'enfant, de l'étape d'information précédant le prélèvement à la prise en charge des enfants positifs. S'ajoute à cela un suivi épidémiologique et une évaluation continue de l'évolution du dépistage.

2. Circuit du dépistage

Après l'accouchement, la sage-femme informe les parents sur les objectifs, le déroulement du dépistage néonatal et les pathologies recherchées. Les parents donnent un consentement oral ou un refus écrit (18).

Le prélèvement du nouveau-né est réalisé à 72h. La peau au niveau du talon est désinfectée et percée avec une lancette stérile pour le recueil de sang capillaire. Les gouttes de sang sont déposées sur papier buvard spécifique sous forme de taches. Idéalement le sang déposé doit remplir le cercle prédéfini (8mm de diamètre) et imbiber le buvard jusqu'au dos. Le volume total prélevé correspond à quelques gouttes (50µl par tache).

Le buvard est séché quelques heures à température ambiante, à l'abri de la lumière (21).

Le carton d'information sur le buvard doit être rempli (**Annexe 1**). Les échantillons sont ensuite envoyés au CRDN par voie postale. Il existe 15 centres de dépistage en France, un par région administrative, à savoir que seulement 5 de ces centres prennent en charge le dépistage de la drépanocytose.

Le CRDN anonymise les prélèvements et transpose les données associées au prélèvement. Les données fournies contiennent : terme, date de naissance, date du prélèvement, poids de naissance, transfusion, centre local de provenance, numéro d'anonymisation, coordonnées des parents.

Seule la partie portant les tâches de sang est envoyée au laboratoire de biologie, identifiée par un code barre. Après la réalisation des analyses, les buvards seront stockés 1 an minimum dans un contenant hermétique (22).

Un biologiste médical habilité valide et interprète le résultat (selon les modalités prévues à l'article D. 6211-3 du CSP). Concernant le retour du résultat (18), s'il est positif, il est transmis par écrit et/ou lors d'une consultation et est inséré dans le dossier médical de la mère.

Le médecin du CRDN s'assure que l'information soit relayée entre le professionnel de santé qui a demandé le prélèvement, la famille et le pédiatre référent de la maladie. Ce dernier organise l'étape de confirmation diagnostique et en remonte les résultats au CRDN. Si le diagnostic est avéré, le patient sera suivi dans le centre de référence de sa pathologie tout au long de sa vie.

Pour les résultats négatifs, ils sont envoyés mensuellement au professionnel qui a demandé le dépistage. Ils ne sont pas communiqués aux parents mais sont disponibles sur demande. Les résultats sont archivés pendant 20 ans (18).

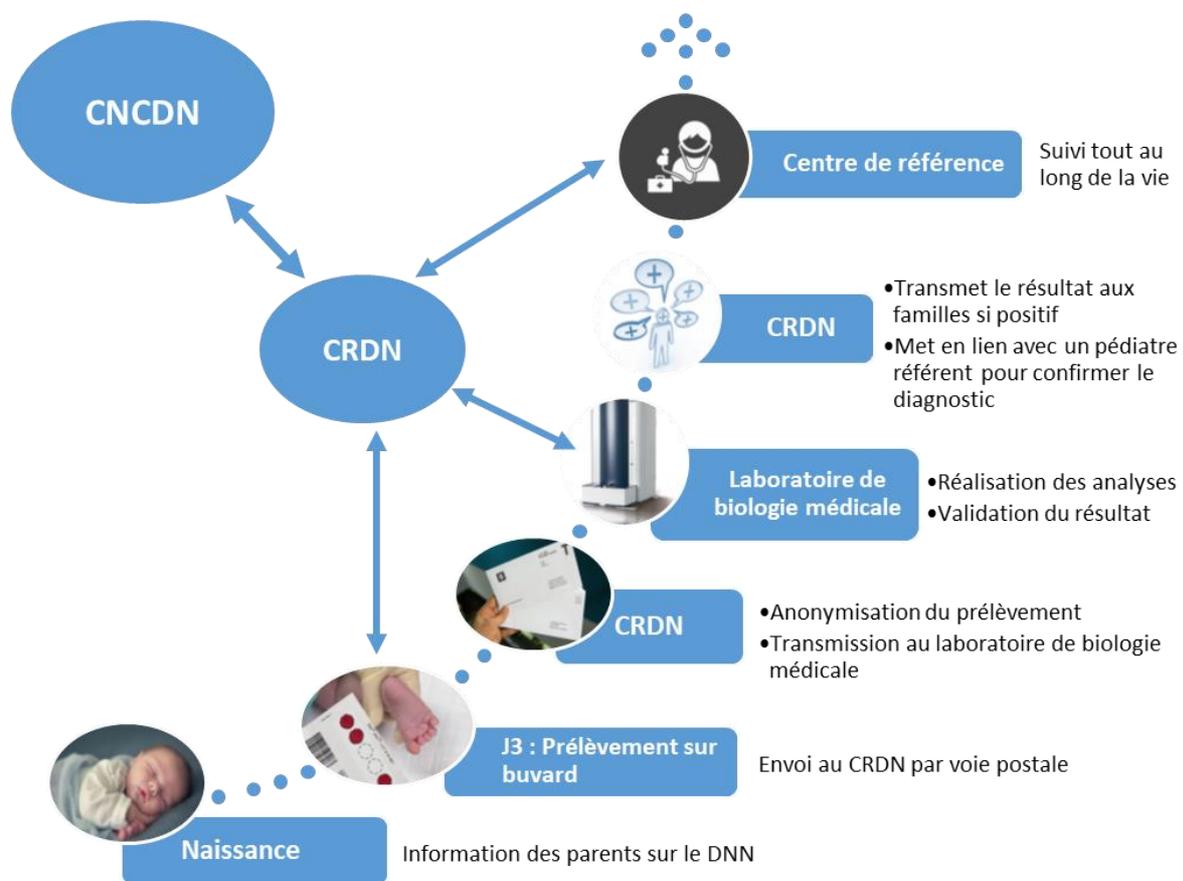


Figure 1 : Circuit du dépistage néonatal.

F. L'échantillon : le buvard « Guthrie »

Depuis 60 ans le buvard est le prélèvement de référence pour le dépistage néonatal.

La particularité des échantillons utilisés dans le dépistage néonatal repose sur l'utilisation de tâches de sang séché sur buvard spécifique ou « Guthrie » comme alternative au prélèvement

sanguin classique. Il s'agit d'un buvard en cellulose qui présente des caractéristiques précises de composition et d'absorbance (23), il est marqué CE. Le modèle validé par le CNCDN en 2019 (**Annexe 1**) provient de la société Perkin Elmer (2). Ce modèle associe une zone dédiée au recueil sanguin et un carton d'information.

Une fois la zone d'échantillon découpée, elle est identifiée par un code barre spécifique. Des poinçons de sang séché y seront découpés pour être analysés.

1. Avantages

Les avantages pratiques et économiques de l'utilisation de buvards sont adaptés à l'étude à grande échelle, notamment dans le cadre du dépistage (21,24).

Au niveau pré analytique, le prélèvement sur buvard est facile à réaliser et peu invasif. Le volume nécessaire est faible (très avantageux chez le nouveau-né). Le transport est facile et moins coûteux car réalisable par voie postale.

Les paramètres pouvant être étudiés sont très nombreux (21). L'adsorption sur un support solide rend la plupart des analytes plus stables que dans le sang liquide. Cependant la stabilité est à étudier au cas par cas. Elle varie de quelques jours à quelques mois à température ambiante et peut être améliorée par conservation à -20 ou -80°C. L'ADN est particulièrement stable (plusieurs années) (25). Le séchage inactive fortement les agents infectieux.

Le processus analytique peut être en partie automatisé, avec par exemple l'analyse de séries en plaques ou le dépôt automatisé sur les cibles du MALDI-TOF. Un seul poinçon peut être suffisant pour l'analyse et la réanalyse, avec la possibilité de contrôle sur un nouveau poinçon.

Pour le post analytique, la conservation est facile, à température ambiante, +4°C ou au congélateur, dans un contenant hermétique avec un dessicant. Le volume de stockage est moindre qu'avec des tubes de sang.

La conservation obligatoire pendant 1 an des buvards de dépistage néonatal (18) donne la possibilité d'analyses complémentaires.

2. Difficultés

Les difficultés rencontrées sont principalement liées à des erreurs de prélèvement. Par exemple un volume prélevé trop faible ou un buvard mal séché (entraîne des problèmes d'homogénéité de la répartition des molécules).

Malgré la bonne stabilité, le sang peut être dégradé, notamment par un long ou mauvais stockage (par exemple pour les régions tropicales comme la Guyane).

Au niveau analytique, le matériel de départ ne permet d'obtenir qu'un hémolysat de sang total, où l'hémoglobine et le contenu cellulaire peuvent être sources d'interférences. Tous les paramètres ne sont pas analysables. Par exemple les cellules étant altérées, cela empêche la réalisation d'un hémogramme.

La faible quantité de sang implique d'utiliser des méthodes de dosage de très haute sensibilité et peut limiter le nombre de tests réalisables. Il y a un risque de faux négatif si le volume est insuffisant. De plus, l'utilisation du buvard comme échantillon demande une adaptation de la technique analytique (nécessite une élution) et de définir des normes biologiques.

L'hématocrite est un facteur de variabilité, le taux va affecter la diffusion du sang dans le papier, le temps de séchage et l'homogénéité de la tâche finale. Donc pour une même taille de poinçon, le taux d'hématocrite peut induire un biais analytique (21,24).

G. Aspects éthiques

Lors de l'étude de l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCAD (déficit en acyl-CoA-déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne) réalisée en 2011 (17), quatre principes éthiques ont été retenus par la HAS :

- La bienfaisance
- La non-malfaisance
- L'autonomie
- La justice

La bienfaisance induit un bienfait pour le nouveau-né testé : s'il est malade il pourra bénéficier d'une prise en charge qui va améliorer sa qualité de vie. Le bienfait peut aussi être indirect par rapport aux parents (apporte un choix éclairé pour les grossesses futures), et pour la société (meilleure qualité de vie globale de la population, réduction des coûts de prise en charge...).

La non-malfaisance implique de ne pas nuire au patient, ou indirectement (à la famille, à la société).

Le principe d'autonomie est concrétisé par l'information sur les objectifs du dépistage et la possibilité de le refuser.

Le principe de justice a été évalué sur sa propriété à maximiser les gains de santé au niveau collectif, tout en conservant un accès aux soins pour chaque individu de la collectivité.

II. Les hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies sont des pathologies héréditaires de l'hémoglobine, à transmission principalement autosomique récessive. Des mutations au niveau des gènes de globine peuvent causer des anomalies de production quantitatives ou qualitatives. Les répercussions cliniques sont variées, d'asymptomatique à létales *in utero*.

A. L'hémoglobine

1. Structure

L'hémoglobine est une protéine hétérotétramérique, composée de quatre sous unités de chaînes de globines identiques deux à deux (**Figure 2**).

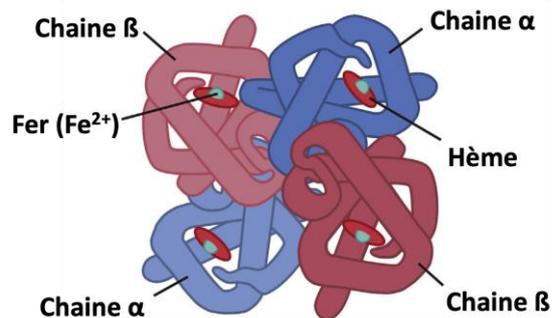


Figure 2 : Structure de la molécule d'hémoglobine (26).

La structure primaire est une protéine de 141 ou 146 acides aminés (pour les chaînes alpha et bêta respectivement) qui se replie en hélices alpha reliées par des coudes pour former sa structure secondaire. Les chaînes alpha et bêta sont formées de 7 et 8 hélices respectivement, nommées de A à H.

La structure tertiaire forme la sous unité et correspond à l'association par liaisons covalentes d'un groupement hémique à la poche hydrophobe d'une chaîne de globine (formée des hélices E et F). Un atome de fer à l'état réduit Fe^{2+} se trouve au centre de l'hème (27).

Il existe 6 types de sous unités différentes : zêta et alpha sur le locus alpha, epsilon, gamma, bêta et delta sur le locus bêta.

L'association de ces sous-unités deux à deux détermine les hémoglobines produites selon un processus ontologique (29) c'est-à-dire évolutif au cours du développement. Leur production débute *in utero* et se succède en fonction de l'âge (**Figure 3**) :

- Hémoglobines embryonnaires : Glower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Glower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), Portland ($\zeta_2\gamma_2$)
- Hémoglobine fœtale : HbF ($\alpha_2\gamma_2$)
- Hémoglobines adultes : HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA2 ($\alpha_2\delta_2$)

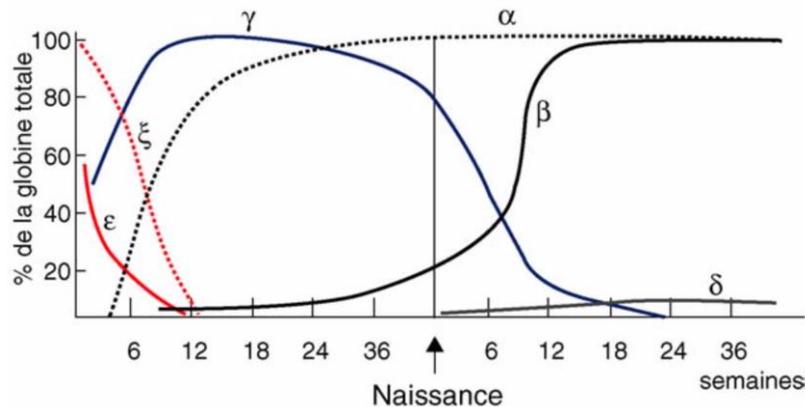


Figure 3 : Évolution de la synthèse des chaînes de globine selon l'âge (28).

A la naissance, l'hémoglobine majoritaire est l'HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Une proportion d'HbA ($\alpha_2\beta_2$) est également présente et augmente avec l'âge jusqu'à remplacer totalement l'HbF.

Chez l'adulte l'HbA ($\alpha_2\beta_2$) et l'HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) sont les hémoglobines principales avec respectivement environ 97 et 3%. Une production résiduelle d'HbF <1% est possible.

L'HbA regroupe l'HbA0 (hémoglobine non glyquée) et l'HbA1 (hémoglobine glyquée, dont l'HbA1c).

2. Gènes de globine

Les gènes de globine sont localisés sur deux chromosomes, ce qui les regroupe en deux locus (**Figure 4**) :

- Le locus alpha, sur le bras court du chromosome 16
- Le locus bêta, sur le bras court du chromosome 11

Les hémoglobines normales sont constituées de deux sous-unités de globine issues du locus alpha et deux issues du locus bêta. L'expression des différents gènes est séquentielle au cours du développement dans le sens 5' à 3'.

Il n'existait à l'origine qu'un gène unique d'hémoglobine qui a été dupliqué au cours de l'évolution. Leurs origines communes leur donnent de grandes similarités. Ils sont tous composés de trois exons séparés par deux introns. Chaque gène est précédé d'un promoteur et d'un amplificateur et chaque locus possède une séquence régulatrice en amont (Locus Control Region LCR pour le locus bêta, HS-40 pour le locus alpha).

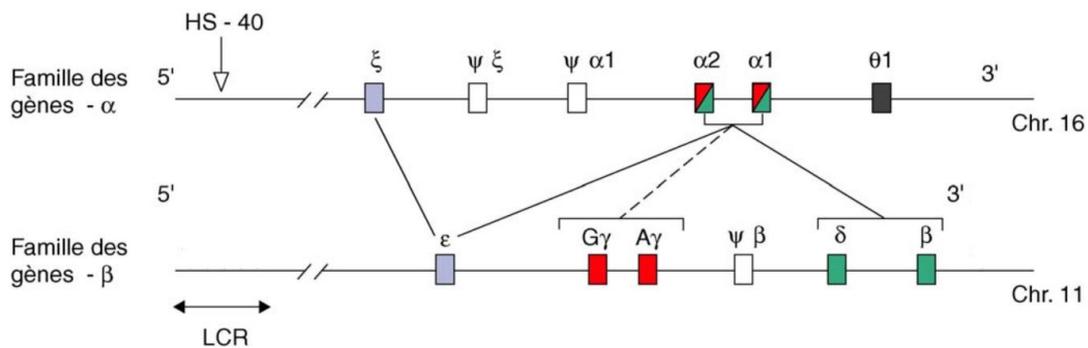


Figure 4 : Organisation des gènes de globine (28).

Sur le locus alpha sont retrouvés :

- Le gène zêta embryonnaire,
- Des pseudo-gènes alpha et zêta : non transcrits, non fonctionnels,
- Les gènes alpha, deux par chromosome, issus d'une duplication récente donc très similaires entre eux, produisant des chaînes alpha identiques et à un même niveau d'expression,
- Le gène thêta de fonction indéterminée.

Dans le locus bêta :

- Le gène epsilon embryonnaire,
- Deux gènes gamma : $A\gamma$ et $G\gamma$, dont la chaîne de globine produite ne diffère que d'un acide aminé en position 136 (Ala et Gly),
- Un pseudogène bêta non transcrit,
- Le gène delta d'expression faible,
- Le gène bêta.

3. Fonctions

La fonction principale de l'hémoglobine est le transport d'oxygène. Chaque hème peut fixer une molécule d'O₂ lors du passage au niveau pulmonaire pour le relarguer dans l'organisme.

La capacité de l'hémoglobine à fixer l'O₂ (son affinité pour l'oxygène), est mesurée par la PO₂50, valeur de PO₂ pour laquelle 50% des sites d'O₂ sont occupés.

L'hémoglobine possède 2 structures quaternaires distinctes en équilibre :

- La forme tendue « T » qui fixe peu l'O₂
- La forme relâchée « R » qui a une forte affinité pour l'O₂

Un mécanisme de coopération allostérique entre les 4 chaînes de globine déplace l'équilibre de la forme T vers R lorsqu'une molécule d'O₂ est fixée, augmentant ainsi la probabilité de fixation d'O₂ par les autres sous-unités (30).

B. Les anomalies quantitatives et qualitatives

Dans les anomalies quantitatives, une ou plusieurs chaînes de globine voient leur production diminuer ou être absente, avec une augmentation relative des autres chaînes.

On retrouve dans ce groupe les thalassémies, qui représentent les hémoglobinopathies les plus fréquentes dans le monde.

Parmi celles-ci, sont principalement retrouvées :

- L'alpha thalassémie, qui est caractérisée par un défaut de production de chaînes alpha,
- La bêta thalassémie présente un déficit de chaînes bêta.

On retrouve différents génotypes en fonction du nombre de gènes atteints et s'il y a production résiduelle de chaînes (β⁺) ou absence de synthèse (α⁰, β⁰) (**Tableau 1**).

Nombre de gènes atteints	Alpha thalassémie	Bêta thalassémie
1	αα/α-	β/β ⁺ ou β/β ⁰
2	αα/-- α-/α-	β ⁺ /β ⁺ β ⁰ /β ⁺ β ⁰ /β ⁰
3	α/-- Hémoglobinose H	
4	--/-- <i>Hydrops fetalis</i>	

Tableau 1 : Génotypes thalassémiques les plus fréquemment rencontrés.

Dans le cas de l'hémoglobinose H, l'association de chaînes en excès est à l'origine d'hémoglobines anormales : Hb Bart's (γ^4) chez le nouveau-né, HbH (β^4) chez l'adulte (31).

Dans les anomalies qualitatives, une mutation génétique entraîne une modification de la séquence protéique. Celle-ci peut s'en trouver allongée, raccourcie ou de composition d'acide aminés modifiée. Le plus fréquent est la modification d'un acide aminé (AA) unique.

Les altérations de la séquence de la protéine induisent une modification des charges et de la taille des AA, ce qui impacte les liaisons faibles établies donc le repli de la chaîne (structure tertiaire). L'impact est plus important si l'AA substitué se situe aux zones de contact entre les chaînes, pouvant notamment jouer sur la stabilité de leur association, ou s'il se trouve en contact avec l'hème altérant ainsi sa stabilité ou sa capacité à fixer l'oxygène.

Au niveau génétique, une mutation hétérozygote, qui n'est présente que sur l'un des gènes d'une chaîne de globine, sera généralement asymptomatique et ne présentera pas ou peu de traduction biologique.

La symptomatologie peut s'avérer modérée à sévère pour les mutations homozygotes (mutation identique sur les 2 gènes), ou les hétérozygotes composites (une mutation différente sur chaque gène) où il n'y a plus de production d'hémoglobine normale possible.

Certains variants sont à l'origine d'une anomalie quantitative et qualitative, par exemple l'hémoglobine E, un variant de chaîne bêta, voit sa synthèse sous exprimée (32).

Dans le cas faisant l'objet de cette étude, la drépanocytose est une anomalie de structure de l'hémoglobine au niveau de la chaîne bêta.

C. Critères de suspicion d'une anomalie de l'hémoglobine

Clinique et biologie

Ce sont les symptômes d'anémie non spécifiques (pâleur cutanéomuqueuse, asthénie, dyspnée), d'une polyglobulie (érythrose) ou d'une cyanose.

Une hémoglobinopathie peut être suspectée devant toute anémie mais principalement :

- Une anémie chronique si les causes carencielles ou inflammatoires sont écartées,
- Une anémie sévère aigue : révélatrice d'une décompensation.

Pouvant être associée à, ou retrouvant de manière isolée : une microcytose, une polyglobulie, des anomalies morphologiques des érythrocytes, une réticulocytose, des inclusions érythrocytaires (corps de Heinz, de Pappenheimer...).

Les symptômes d'hémolyse (ictère, splénomégalie) et les marqueurs d'hémolyse (LDH, bilirubine, haptoglobine) sont à rechercher.

Antécédents familiaux et origine géographique

La présence d'une hémoglobinopathie dans la parenté ou d'une origine géographique « à risque ».

D. Diagnostic biologique d'une hémoglobinopathie

1. Principes de la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine

Selon les recommandations de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine se fait par combinaison de plusieurs techniques basées sur des principes différents. En première intention ce sont des techniques séparatives et d'étude biochimique de l'hémoglobine qui sont utilisées, avec recours en seconde intention à la biologie moléculaire (33).

La nomenclature des actes de biologie médicale en vigueur au 1^{er} avril 2020 (34) prévoit pour la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine la réalisation de 3 tests phénotypiques distincts dont « au moins une technique d'électrophorèse, et deux autres tests adaptés selon les besoins pour un résultat diagnostique d'orientation ».

Chaque technique séparative va éluer les variants différemment et plusieurs hémoglobines peuvent éluer à la même position. Aucune technique seule ne permet d'identifier une hémoglobine de façon certaine. Un profil normal sur une technique ne permet pas d'éliminer un variant, d'où la nécessité d'associer et de comparer plusieurs techniques.

Au laboratoire des hémoglobinopathies du CHU de Lille, les 3 techniques systématiquement utilisées dans l'étude de l'hémoglobine sont : l'électrophorèse capillaire, la chromatographie liquide haute performance et l'isoélectrofocalisation.

3 techniques complémentaires sont disponibles : le test de solubilité, le test d'instabilité et la mesure de la PO₂50. Le test de solubilité est réalisé pour confirmer la présence d'une HbS. Le test d'instabilité, ou test à l'isopropanol permet de mettre en évidence des hémoglobines

instables (35). La PO₂50 mesure l'affinité pour l'oxygène, une anomalie oriente vers une hémoglobine hypo ou hyperaffine.

En pratique, le seul variant à caractériser en urgence est l'HbS puisque, à l'état homozygote ou en association avec une autre hémoglobinopathie, il est responsable d'un syndrome drépanocytaire majeur (Sβ⁰, Sβ⁺, SC).

2. Pré-analytique

Les analyses se réalisent sur sang total recueilli sur tube EDTA. La conservation est de 7j à +4°C (36). Au-delà des fractions d'hémoglobines dégradées apparaissent.

L'échantillon a cependant une bonne stabilité sauf pour la recherche d'hémoglobine instable ou d'hémoglobine H (retrouvée dans l'alpha thalassémie) qui se dégradent rapidement.

3. Électrophorèse capillaire

L'automate utilisé au laboratoire d'hémoglobinopathies est le Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) associé au kit hémoglobine, il possède 8 capillaires analysés en parallèle. Le volume minimal pour l'analyse est de 100µL.

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative automatisée qui permet une étude qualitative et quantitative des hémoglobines. Cette technique sépare les molécules en fonction de leur charge et de leur mobilité électrophorétique, dans un tampon à pH basique 9,4.

L'échantillon dilué dans une solution hémolysante est injecté à l'anode dans un capillaire en silice fondue. Un potentiel électrique de plusieurs milliers de volts est appliqué aux bornes du capillaire et sépare les hémoglobines en les faisant migrer vers la cathode.

Dans un champ électrique, les hémoglobines se déplacent à une vitesse différente en fonction de leur charge, leur taille, de la force ionique, du pH du tampon et de la nature du support. Les hémoglobines ont des charges de surface différentes donc une mobilité électrophorétique différente.

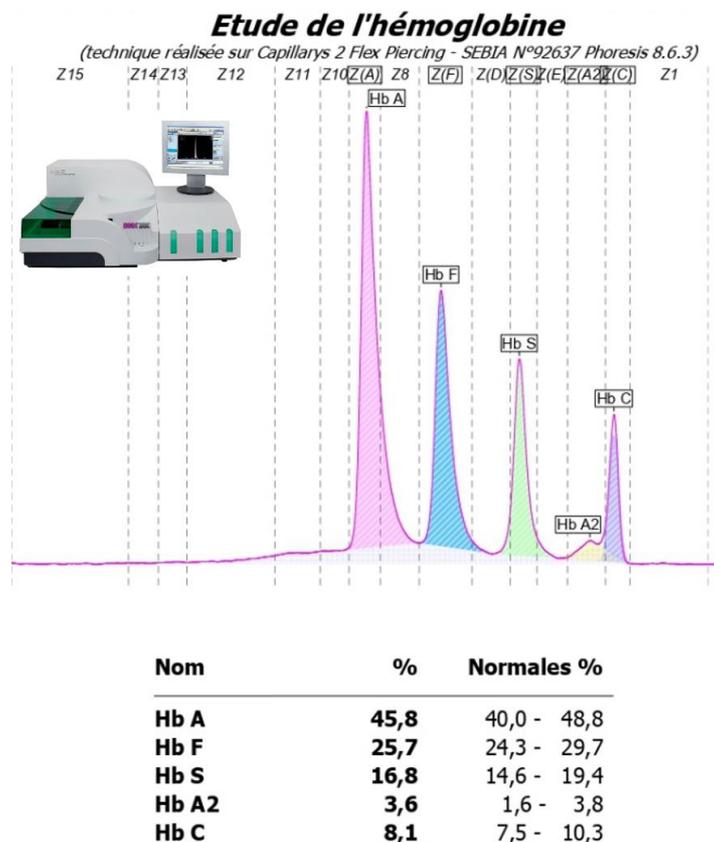
La mesure s'effectue par détection directe des hémoglobines à 415 nm à la cathode par spectrophotométrie d'absorbance (longueur d'onde spécifique de l'hémoglobine).

L'absorbance détermine la quantité relative d'une hémoglobine et le temps de migration caractérise les fractions d'hémoglobines. Le résultat est donné sous la forme d'un électrophorégramme, dont les aires sous la courbe déterminent les quantités relatives d'hémoglobines (en pourcentage) (exemple : **Figure 5**).

Les hémoglobines les plus courantes sont identifiées par comparaison à un spectre de référence. Le temps de migration aide à identifier les hémoglobines anormales : le spectre est divisé en 15 zones et la zone de migration de 190 variants connus est donnée par le fournisseur.

Les hémoglobines normales (HbA, HbA2, HbF) et les principaux variants (HbS, HbC, HbD, HbE, Hb O'Arab) sont séparables par cette technique.

Cependant, pour une hémoglobine anormale dont la mutation n'entraîne pas de différence de charge dans les conditions analytiques, celle-ci ne pourra pas être séparée de l'hémoglobine normale et il faudra avoir recours à d'autres techniques pour la mettre en évidence. On parle de variant d'hémoglobine « neutre » quand le variant co-migre avec l'HbA.



**Figure 5 : Exemple de profil d'électrophorèse capillaire (Capillarys 2 Flex Piercing, Sebia).
Contrôle AFSC.**

4. Chromatographie liquide haute performance

L'automate du laboratoire est le Tosoh G8 (Tosoh Biosciences), avec le kit G8 B-Thal et repose sur le principe de la chromatographie liquide à haute performance échangeuse de cations (CLHP-EC). C'est la technique de référence pour la quantification des hémoglobines S et F. Elle est automatisée, de haute résolution et rapide pour un résultat qualitatif et quantitatif des fractions d'hémoglobine. L'analyse requiert 50µL (volume minimal de 10µL).

Les hémoglobines sont séparées en fonction des différences d'interactions ioniques avec la colonne.

L'échantillon associé à une solution hémolysante est injecté à haute pression dans une colonne composée :

- D'une phase stationnaire : la colonne est remplie de résine sur laquelle des groupements anioniques sont greffés et neutralisés par des cations mobiles.
- D'une phase mobile : des tampons imposent un gradient ionique progressif combiné à un gradient linéaire de 3 concentrations salines différentes.

Les hémoglobines ionisées par le tampon dans la phase mobile sont plus ou moins retenues par les anions en surface de la colonne et auront donc un temps de rétention (T_R) caractéristique.

L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie en sortie de colonne à 2 longueurs d'onde : 415 nm (spécifique des hémoglobines) et 690 nm (permet de réduire le bruit de fond).

Les résultats sont rendus sous forme de chromatogramme divisé en fenêtres de migration (exemple : **Figure 6**). L'aire sous le pic donne une quantification relative exprimée en pourcentage de la surface totale, alors que le temps de rétention et la fenêtre dans laquelle se trouve le pic orientent l'identification.

Comme en électrophorèse, il y a la possibilité qu'un variant soit « neutre » donc non différencié de l'hémoglobine normale. Il peut être neutre dans l'un ou l'autre, ou les deux systèmes.

Paramètres	Value	Temps min.	Area	Total Area
P00	2.24%	0.58	97.07	4 331.1
F	6.96%	1.08	253.71	
P01	0.13%	1.54	5.6	
P02	5.89%	1.87	255.1	
P03	2.23%	2.17	96.58	
A0	45.00%	2.5	2 030.41	
A2	4.96%	3.17	176.57	
P04	0.47%	3.82	20.27	
P05	0.53%	3.99	22.77	
S+	30.25%	4.42	1 310.01	
P06	0.82%	4.74	35.72	
P07	0.53%	5.11	22.92	
P08	0.10%	5.67	4.42	

time: -0.46, mV: -3.00



Plateau théo.: 1118
Methode : B-Thalassemia
Analyzer: G8
Operator: LABO
Flag & Comment: .
Date of analysis: 21/10/2020
Time of analysis: 10:39:02

Y=(Ax+B)

Element	Factor-A	Factor-B
1	1.1887	0.0000
2	1.2181	0.0000

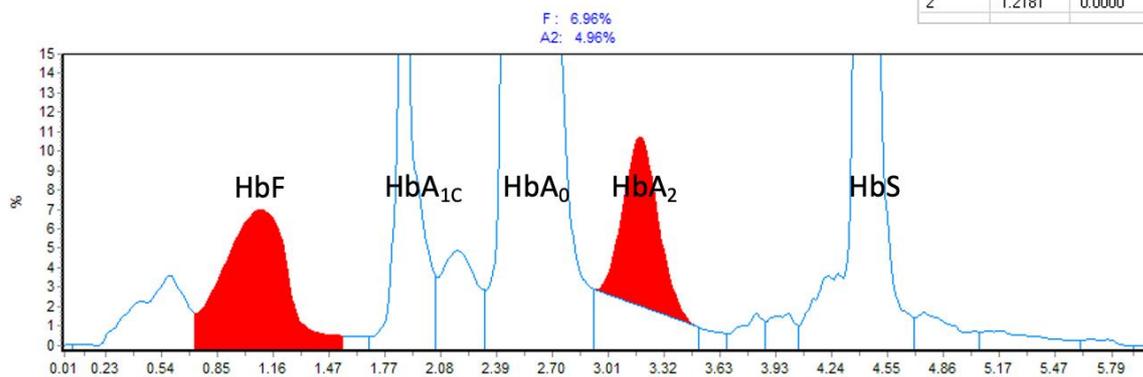


Figure 6 : Exemple de chromatogramme (Tosoh G8, Tosoh Biosciences). *Contrôle.*

5. Isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation (IEF) est une technique d'électrophorèse sur gel qui utilise un gradient de pH (de 6 à 8) sous voltage élevé. La séparation des hémoglobines se fait selon leur pHi, point isoélectrique, pH pour lequel la charge globale de la molécule est nulle (forme zwitterionique). Les hémoglobines migrent dans le gradient de pH jusqu'à atteindre leur pHi. La résolution est de 0,01 unité de pH.

Une plaque de gel d'agarose est placée dans un tampon dans une cuve d'isoélectrofocalisation. 20µL de sang total hémolysé est déposé par patient. Une étape de coloration du gel après migration met en évidence les bandes.

L'identification d'un variant inconnu se fera par comparaison du pHi à celui d'un mutant de référence ou à un contrôle.

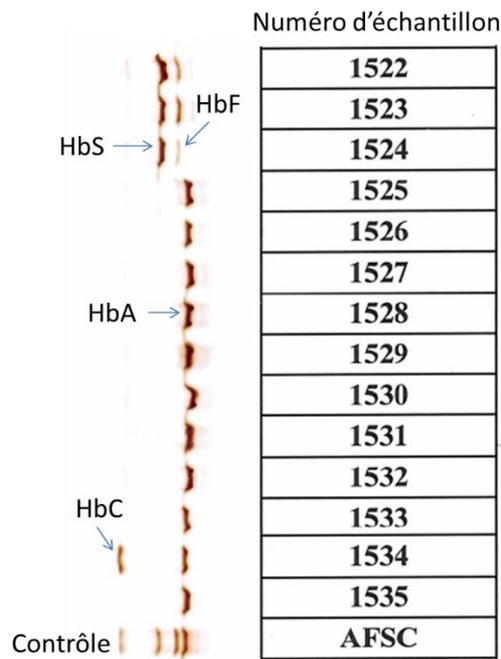


Figure 7 : Isoélectrofocalisation pH 6 à 8 (gel Perkin Elmer).

III. La drépanocytose

La drépanocytose est causée par une anomalie qualitative de l'hémoglobine, avec une chaîne de globine bêta mutée (β^S) formant l'hémoglobine S. A l'état homozygote elle engendre des symptômes pouvant être graves voire létaux. La pathologie est connue de longue date mais sa première description moléculaire et les propriétés de l'hémoglobine S datent de 1949 (10).

A. Épidémiologie

La drépanocytose représente l'hémoglobinopathie la plus fréquente avec les thalassémies. Elle est présente principalement en Afrique, ainsi que dans le bassin méditerranéen, aux Antilles et en Inde. On la trouve dans le monde entier du fait des flux migratoires et des brassages de population.

En 2019 l'incidence globale en France du syndrome drépanocytaire majeur (SDM) parmi les nouveau-nés était de 1/1300 c'est-à-dire 586 nouveau-nés. L'incidence est plus élevée en Outre-Mer (1/461) et en Ile-de-France (1/590). Le trait drépanocytaire (AS), a quant à lui représenté 11597 naissances en 2019, soit 1,5 % de l'ensemble des nouveau-nés (2).

Au niveau mondial le nombre de naissances d'enfants drépanocytaires majeurs est estimé entre 350000 et 400000 par an (37).

Cette incidence justifie l'instauration d'un dépistage néonatal. A titre de comparaison, en 2019 en France, 37 nouveau-nés ont été positifs pour l'hyperplasie congénitale des surrénales, 48 pour la phénylcétonurie, 117 pour la mucoviscidose et 305 pour l'hyperthyroïdie congénitale ; contre 586 syndromes drépanocytaires majeurs, en faisant la première pathologie retrouvée par le programme de dépistage néonatal (2).

B. Génotypes du syndrome drépanocytaire majeur

Le syndrome drépanocytaire majeur regroupe les pathologies de l'hémoglobine engendrant :

- 3 types principaux de manifestations cliniques :
 - Une anémie hémolytique chronique,
 - Des phénomènes vaso-occlusifs,
 - Une susceptibilité aux infections,
- Avec au niveau biologique,
 - La présence d'hémoglobine S,
 - Une morphologie érythrocytaire en drépanocyte.

Le « syndrome drépanocytaire majeur » regroupe plusieurs génotypes. Le plus fréquent est l'association homozygote S/S (β^S/β^S) mais il existe des formes issues d'hétérozygoties composites.

On retrouve notamment des hétérozygoties composites :

- Avec association à une anomalie quantitative du gène bêta :
 - L'association à un trait bêta thalassémique implique que la production d'HbA est absente (β^S/β^0) ou trop abaissée (β^S/β^+) pour obtenir un effet protecteur complet sur la falciformation. L'Hb majoritaire est l'HbS.
- Avec association à une anomalie qualitative de la chaîne bêta globine :
 - La plus fréquente : drépanocytose S/C (β^S/β^C).
 - Plus rarement : β^S/β^O -Arab, β^S/β^D -Punjad, β^S/β^C -Harlem, β^S/β^E et β^S/β^L epore.
- Les hétérozygotes présentant une symptomatologie malgré la présence d'HbA :
 - β/β^S -Antilles, β/β^S -Oman.

C. Physiopathologie

Dans l'exon 1 du gène de bêta globine, la substitution en position 20 de la base A pour un T (HBB:c.20A>T) entraîne le remplacement du 6^e acide aminé (AA) d'un acide glutamique par une valine (beta6(A3) Glu>Val). Cette chaîne bêta mutée s'associe avec la chaîne alpha pour former de l'hémoglobine S ($\alpha_2\beta^S_2$).

L'acide glutamique est un AA chargé négativement alors que la valine est apolaire. La différence de masse est de -30 g/mol.

Au niveau de la structure quaternaire, cet AA est positionné sur la surface extérieure de l'hétéro tétramère. La substitution en position 6 en par une valine engendre une modification des attractions de charges, et celle-ci va pouvoir se lier à la phénylalanine en position 85 et la leucine en position 88 des chaînes bêta d'autres tétramères (38) (**Figure 8**).

L'HbS diffère de l'HbA par sa propriété à polymériser en formant des associations moléculaires hydrophobes avec les autres molécules d'hémoglobine.

En présence d'O₂, ce phénomène est en équilibre réversible. En situation d'hypo oxygénation, les polymères s'associent en fibrilles. Du fait d'un processus auto catalytique, l'équilibre se trouve déplacé vers la formation de fibres de désoxy-HbS (**Figure 8**).

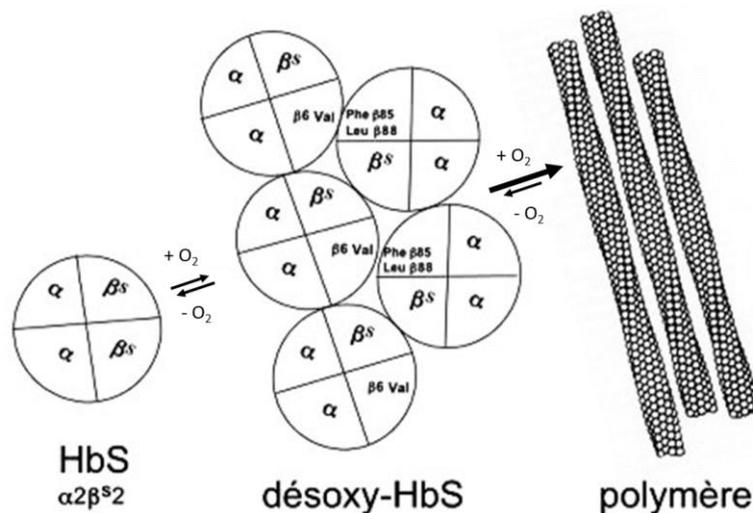


Figure 8 : Mécanisme de polymérisation de l'hémoglobine dans la drépanocytose (38).

La polymérisation participe à une dérégulation de l'homéostasie ionique (causant une déshydratation érythrocytaire) et à une dénaturation de l'hémoglobine qui précipite et libère

l'hème et le fer. Ces phénomènes entraînent une déformation de l'hématie qui prend une forme de faucille (drépanocyte).

La formation des drépanocytes est à l'origine d'une hémolyse intra et extra-vasculaire ; ainsi qu'une modification de la membranaire érythrocytaire avec expression anormale de molécules d'adhésion en surface. L'adhésion endothéliale accrue des drépanocytes et des réticulocytes est à l'origine de vaso-occlusions. L'hème oxydé relargué dans la circulation contribue à l'état pro-inflammatoire et pro-coagulant (39).

L'hématie est alors non seulement incapable d'assurer sa fonction d'oxygénation mais aussi cause l'obstruction vasculaire.

Ce phénomène a lieu à bas bruit en situation d'oxygénation normale, l'hémolyse chronique est compensée. Cependant en cas de circonstances favorisant l'hypoxie (insuffisance respiratoire, déshydratation, acidose, hyperthermie...) l'hémolyse peut être massive et entraîner une anémie profonde (40,41).

D. Présentations cliniques

1. Hétérozygote AS

Un patient porteur d'un trait drépanocytaire (drépanocytose hétérozygote) associé à une chaîne bêta normale est asymptomatique.

Toutefois, dans une revue de la littérature, *Naik et al*, a mis en évidence que le trait drépanocytaire est un facteur de risque de maladie thromboembolique, d'embolie pulmonaire, d'insuffisance rénale chronique et de protéinurie. Dans des conditions d'activité physique très intense il a aussi été rapporté un risque accru de rhabdomyolyse (42).

2. Les syndromes drépanocytaires majeurs

La symptomatologie sera davantage marquée chez les homozygotes et les hétérozygotes S/ β^0 , S/C. On retrouve cependant une hétérogénéité de gravité des manifestations cliniques selon les individus due à des facteurs modulateurs, notamment l'association avec la mutation d'autres gènes de globine (alpha thalassémie, persistance d'HbF...).

Le nouveau-né, grâce à la production d'HbF, est protégé jusqu'à l'âge de 3 à 6 mois, les premiers symptômes apparaissent lorsque le taux d'HbF diminue.

En dehors des crises, on observe une anémie hémolytique chronique, bien tolérée et compensée pouvant causer une asthénie, une pâleur cutanéomuqueuse, un subictère conjonctival.

En situation de faible oxygénation, des crises peuvent se déclencher, notamment des crises vaso-occlusives causées par l'occlusion des micro-vaisseaux de toutes localisations. Elles sont douloureuses et localisées au niveau squelettique, musculaire, abdominal, thoracique... Elles sont notamment responsables d'accident vasculaire cérébral, de syndrome main-pied (fréquent chez l'enfant) ou de priapisme. Le syndrome thoracique aigu est une forme de crise très douloureuse, causée par l'association d'un infiltrat pulmonaire, d'une infection et de vaso-occlusions pulmonaires.

Ces vaso-occlusions entraînent sur le long terme des pathologies dégénératives, des complications neurologiques, cardiaques, rénales, ophtalmiques... (43).

Une splénomégalie est fréquemment retrouvée chez l'enfant (jusqu'à 5 ans environ) due à une activité accrue pour l'élimination des drépanocytes puis, à la suite des multiples micro-infarctus spléniques, elle évolue en asplénie fonctionnelle.

Autre versant, la susceptibilité accrue aux infections bactériennes est une cause majeure de mortalité chez l'enfant. Il s'agit principalement de bactéries encapsulées, avec une susceptibilité multifactorielle, d'une part par l'asplénie fonctionnelle et d'autre part par une réponse immunitaire altérée. Les complications infectieuses sont la cause principale de décès chez l'enfant drépanocytaire de moins de 3 ans (44,45).

E. Prise en charge

1. Prévention et traitements des manifestations cliniques

Prévention

Pour réduire la mortalité liée aux infections, une antibiothérapie quotidienne par pénicilline orale est conduite chez le nouveau-né jusqu'à l'âge de 5 ans. Celle-ci est complétée par une vaccination anti-pneumococcique (12,46,47).

Une supplémentation en acide folique prévient l'anémie par carence, secondaire au renouvellement accéléré des hématies.

Les patients sont suivis pour la recherche de complications fréquentes (48) :

- Doppler transcrânien ou IRM annuel pour la recherche d'AVC
- Suivi de la tension

- Recherche de protéinurie
- Tests neurocognitifs
- Suivi ophtalmologique pour recherche de rétinopathies
- Recherche d'hypertension pulmonaire
- Suivi de la fonction pulmonaire, recherche d'asthme
- Recherche d'apnée du sommeil
- Radiographies et densité osseuse pour les complications ostéo-articulaires

L'éducation thérapeutique joue une part prépondérante dans la prévention. Il est recommandé d'éviter les facteurs favorisant des crises (hypoxie, hypothermie, hyperthermie, déshydratation, stress, prise d'excitants, d'alcool, tabac ou drogues). Le patient doit apprendre à reconnaître les signes précoces de la crise (douleur, fièvre, vomissements, signes d'anémie aiguë, splénomégalie, priapisme) (44,45).

Traitements au long court

Les traitements actuels reposent principalement sur l'utilisation de l'hydroxyurée et la transfusion. Ils ont pour but de réduire la fréquence et la gravité des crises (49).

L'hydroxyurée induit la production d'HbF, hémoglobine qui inhibe la falciformation et prévient ainsi les crises et les complications à long terme. Les transfusions sanguines sont utilisées soit lors de crises ou en prévention d'une chirurgie, soit régulièrement si l'hydroxyurée n'est pas utilisable.

Les deux approches curatives sont la greffe de cellules souches et la thérapie génique. L'indication de la greffe de cellules souches est à discuter au cas par cas en fonction de la gravité de la symptomatologie, de l'existence d'un donneur et de la toxicité associée.

Traitements de la crise

Le traitement de la crise se fait par l'éviction au possible du facteur déclenchant et par du repos au chaud.

A ceci on adjoint en traitements symptomatiques (50) :

- Antalgiques pour la prise en charge de la douleur : paracétamol, ibuprofène ou morphine. Si celle-ci ne cède pas, le recours aux échanges transfusionnels ou à une transfusion est possible.
- L'hydratation doit être abondante, orale ou intraveineuse.
- Oxygénothérapie en cas de douleur thoracique ou de saturation <96%.
- La transfusion sanguine n'est pas nécessaire si l'anémie est bien tolérée.

Les traitements en étude proposent plusieurs approches (51) :

- Les inhibiteurs de polymérisation : induction d'HbF ou stabilisation de l'oxy-HbS.
- Les inhibiteurs de déshydratation cellulaire : par action sur les canaux ioniques.
- Les réducteurs de l'inflammation chronique.
- Les réducteurs de l'adhésion cellulaire : notamment les inhibiteurs de sélectines.
- Les régulateurs de l'hémostase : réducteurs d'hypercoagulabilité ou d'activation plaquettaire.
- Les réducteurs de stress oxydatif.

Le voxelotor, approuvé aux USA en 2019, est une molécule inhibitrice de la polymérisation de l'hémoglobine. Il s'agit d'un traitement de fond (52).

Le crizanlizumab, un anticorps monoclonal anti P-selectine qui réduit l'adhésion cellulaire, est actuellement à l'étude pour la prévention des crises vaso-occlusives (53).

2. Conseil génétique

Un professionnel de santé spécialiste informe le patient porteur d'une maladie génétique sur cette pathologie, sa prise en charge, les implications sur la descendance et les solutions pouvant lui être proposées. Le patient pourra ainsi prendre une décision éclairée.

Le conseil génétique peut intervenir chez le nouveau-né, ses parents et sa fratrie, suite à la découverte d'un syndrome drépanocytaire.

Il est aussi utile pour un couple avec un projet de grossesse originaire de région à risque ou connu avec une hémoglobinopathie. Les maternités peuvent, lors de consultations prénatales, proposer une analyse de l'hémoglobine à la mère. Si elle est porteuse d'un trait drépanocytaire (AS), d'une autre maladie de l'hémoglobine, son conjoint peut être à son tour testé. Connaître le risque du bébé en fonction du phénotype des parents permet d'anticiper la prise en charge et le suivi de l'enfant à naître. Les couples à risque avéré se verront proposer un diagnostic prénatal par amniocentèse et une interruption médicale de grossesse le cas échéant (54,55).

Sont donc concernés les drépanocytaires homozygotes mais aussi les hétérozygotes. Il n'y a cependant pas de consensus national ou international sur le conseil génétique pour la drépanocytose et les pratiques et les connaissances ne sont pas homogènes parmi les professionnels de santé.

F. Diagnostic biologique

1. Techniques séparatives

Chez le nouveau-né, le dépistage néonatal va mettre en évidence l'hémoglobine S. Au CHU de Lille, cela se fera par spectrométrie de masse MALDI-TOF puis confirmé par chromatographie liquide haute performance (voir Généralités, IV.F et G.).

Dans le cadre du diagnostic, les techniques cherchent à mettre en évidence l'hémoglobine S, à mesurer son taux et à déterminer l'état homozygote, hétérozygote ou hétérozygote composite. Le diagnostic est confirmé si les 4 tests sont concordants, pour éviter tout faux positif. Notre laboratoire utilise le test de solubilité et 3 techniques séparatives : l'électrophorèse capillaire, la chromatographie liquide haute performance échangeuse de cations (CLHP-EC) et l'isoélectrofocalisation (voir Généralités, II.D.).

2. Test de solubilité

Il s'agit d'une technique manuelle sur sang total. Aussi appelé test d'Itano (56), il confirme la présence d'HbS et vient en complément des techniques séparatives.

Le principe du test repose sur la propriété de l'HbS à polymériser et précipiter dans une solution de phosphate (KH_2PO_4) lorsqu'elle est sous forme de désoxy-HbS. La désoxy-HbS est obtenue suite à une réduction par hydrosulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

Le test n'est positif que pour une concentration d'HbS > 20%. La spécificité n'est pas de 100%, de rares autres hémoglobines peuvent précipiter. Il peut être faussement négatif chez un transfusé avec un taux faible d'HbS. Il n'est pas réalisable chez le nouveau-né car l'HbF inhibe la polymérisation.

3. Biologie moléculaire

Le séquençage des gènes de globine permet de mettre en évidence la mutation $\beta 6\text{Glu}>\text{Val}$. La biologie moléculaire vient toujours dans un second temps et n'est pas essentielle pour diagnostiquer un syndrome drépanocytaire.

Elle peut en revanche s'avérer indispensable pour explorer des génotypes plus complexes avec une association de mutations et une discordance phénotype-génotype.

IV. Le dépistage néonatal dans le cadre de la drépanocytose

A. Enjeux

Le dépistage néonatal de la drépanocytose permet de répondre aux enjeux de santé publique français, présents dans la stratégie nationale de santé 2018-2022 (57) :

- Prévention : prévention des complications aiguës et chroniques.
- Lutte contre les inégalités sociales et territoriales d'accès à la santé : le dépistage est disponible et gratuit pour toutes les naissances en France.
- Améliorer l'état de santé des mères et des enfants de l'Outre-Mer : où la drépanocytose a une prévalence plus élevée qu'en métropole.

La prévention par le dépistage précoce permet :

- Une diminution de la mortalité infantile,
- La prévention de l'apparition des pathologies chroniques dues aux complications de la drépanocytose, avec une amélioration du confort de vie des patients,
- Une diminution du coût global de la prise en charge en diminuant les crises et les complications chroniques,
- Une augmentation de l'espérance de vie en bonne santé.

Une prise en charge tardive peut conduire à une évolution défavorable et à la constitution de lésions potentiellement irréversibles. Un diagnostic précoce permet un traitement plus efficace, avec un impact positif avéré sur le pronostic de la maladie (58).

B. Pathologies recherchées

Le dépistage de la drépanocytose repère (2) :

- Les syndromes drépanocytaires majeurs : homozygotes SS, hétérozygotes composites S/ β thalassémiques, S/C, S/E, S/D-Punjab, S/O-Arab, S/Lepore, A/S^{Antilles} (forme dominante).
- Les syndromes β thalassémiques avec une absence ou un taux bas d'HbA.
- La présence d'hémoglobine S associée à une hémoglobine normale : hétérozygotes AS.
- La présence d'hémoglobine C : hétérozygote (AC) selon la technique de dépistage employée.

Le dépistage repère également les porteurs du trait drépanocytaire, qui n'engendre pas d'état pathologique. Le bénéfice est indirect, celui-ci ouvrant la possibilité d'un dépistage dans la

famille. Il permet à la fois d'amener une réflexion sur les projets de grossesses futures et les impacts sur la descendance de l'enfant.

Des effets négatifs de ce dépistage ont été mis en avant. Si le diagnostic est mal compris, la famille peut avoir une peur que l'enfant développe la maladie. Également, il existe un aspect culturel pouvant engendrer une stigmatisation vis-à-vis de l'enfant.

Un consensus européen de 2017 (59) met en avant que pour les hétérozygotes, le facteur de risque de rares complications cliniques ne justifie pas à lui seul le dépistage. Il ajoute qu'étant donné que les techniques de dépistage identifient les hétérozygotes et que l'information peut permettre aux parents d'envisager autrement les grossesses à venir, cette information doit leur être communiquée. Le consensus s'accorde aussi sur le fait qu'une explication et une proposition d'accompagnement des grossesses doivent être associées pour ne pas causer de confusion et d'anxiété.

Le cadre légal du dépistage de la drépanocytose impose le rendu des résultats FAS et FS, FSX. En cas d'autre variant de l'hémoglobine retrouvé, la question se pose de transmettre cette information. Le consensus européen de 2017 (59) ne conclut que sur la bêta thalassémie majeure (HbF = 100%), en incitant à signaler les cas.

C. Populations ciblées

Contrairement aux autres pathologies du dépistage néonatal, le DNN de la drépanocytose est à ce jour en France, ciblé et non universel. Dans les départements d'Outre-Mer le dépistage est systématique. Le ciblage représente en 2019 43,3 % des nouveau-nés (2).

Les nouveaux nés sont ciblés sur 4 critères qui ont été définis par l'AFDPHE (16) :

1. *Les deux parents doivent être originaires d'une région à risque*
2. *Un seul des deux si le deuxième n'est pas connu*
3. *S'il existe des antécédents de syndrome drépanocytaire majeur dans la famille*
4. *S'il existe un doute pour les critères 1, 2, 3.*

Les régions reconnues à risque comprennent :

Départements français d'Outre-mer : Antilles, Guyane, la Réunion, Mayotte
Tous les pays d'Afrique subsaharienne et le Cap-Vert
Amérique du Sud (Brésil), Noirs d'Amérique du Nord
Inde, Océan Indien, Madagascar, île Maurice, Comores
Afrique du Nord : Algérie, Tunisie, Maroc

Italie du Sud, Sicile, Grèce, Turquie

Moyen-Orient : Liban, Syrie, Arabie Saoudite, Yémen, Oman

Le caractère ciblé du dépistage en France qui repose en partie sur des considérations médico-économiques et l'efficacité de la stratégie actuelle, est remis en cause face à des aspects d'équité, de stigmatisation des populations et d'erreur de ciblage (60).

En 2013 la HAS a réévalué la pertinence d'étendre ce dépistage à toute la population et a jugé le bénéfice supplémentaire insuffisant (7).

Selon une étude des centres de référence des anomalies de l'hémoglobine, les faux négatifs par échec du ciblage concerneraient 2,1% des enfants avec un syndrome drépanocytaire majeur en France (61).

Ces échecs de ciblage sont dus à la difficulté d'identifier les patients à haut risque,

- Soit car les origines de région à risque sont difficilement identifiables,
- Soit car le questionnaire de dépistage est mal rempli (par manque de temps, par réticence à interroger les parents).

D. Organisation spécifique au dépistage de la drépanocytose

Laboratoire de dépistage du CHU de Lille

Le laboratoire de Lille traite les demandes émanant des régions Hauts-De-France, Normandie, Bretagne, Pays de la Loire, Centre-Val-De-Loire, Bourgogne-Franche-Conté, Auvergne-Rhône-Alpes, Réunion, Guyane et Mayotte.

Le secteur du dépistage périnatal travaille en collaboration avec le secteur des hémoglobinopathies (au sein du Centre de Biologie et Pathologie du CHU de Lille) et le CRDN Hauts-de-France installé à l'hôpital Jeanne de Flandres (CHU de Lille).

Rendu des résultats d'analyse

Le résultat est rendu sous forme qualitative d'après l'arbre décisionnel de l'arrêté du 22 février 2018 (**Figure 9**) (18).

La notation pour les profils utilise « F » pour l'hémoglobine fœtale, « A » pour l'hémoglobine A adulte normale, « S » pour l'hémoglobine S, « C » pour l'hémoglobine C, « X » pour tous les autres variants ; et ils sont ordonnés du pourcentage le plus élevé au moins élevé. « FA » exprime un profil normal de nouveau-né.

Le compte rendu indique si le nouveau-né est porteur d'un trait drépanocytaire (« FAS »), d'une drépanocytose homozygote (« FS »), d'une drépanocytose hétérozygote composite (« FSC » ou « FSX »), ou si présence d'un autre variant (« FX » ou « FAX »). Ces variants « X » incluent les variants de la chaîne alpha ou bêta (HbD, E...).



ARBRE DECISIONNEL DU DEPISTAGE DES SYNDROMES DREPANOCYTAIRES MAJEURS (SDM)

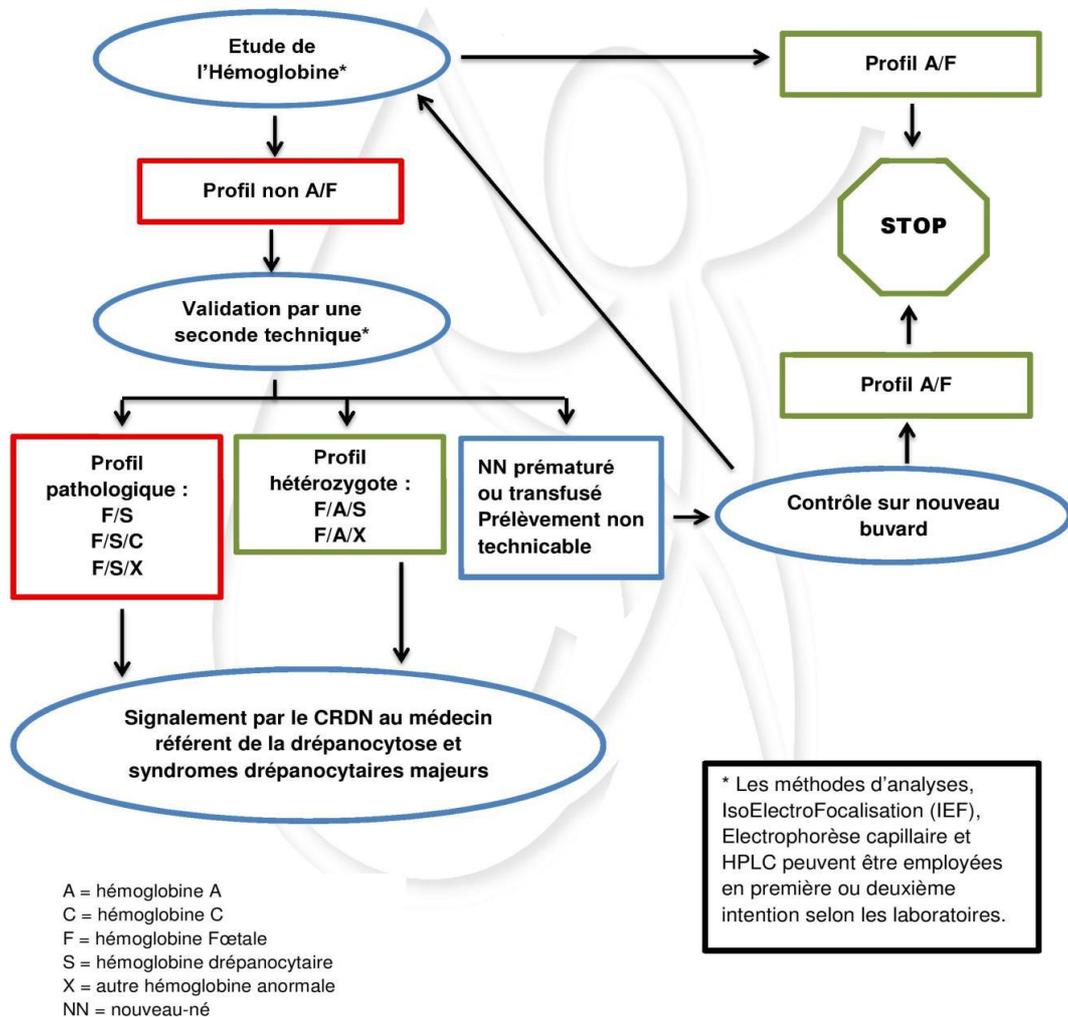


Figure 9 : Arbre décisionnel du dépistage des syndromes drépanocytaires majeurs (2).

E. Stratégie de dépistage

Idéalement, les techniques de dépistage ont une sensibilité de 100%, pour ne manquer aucun individu atteint (pas de faux négatifs). La spécificité doit être la plus élevée possible pour ne pas déclarer un individu sain malade (faux positif).

En pratique courante, on associe une technique très sensible en première intention, à une technique de confirmation plus spécifique. Seuls les tests positifs avec la première technique seront envoyés en confirmation.

L'arrêté réglementant le dépistage néonatal (18) impose la vérification d'un dépistage positif par une seconde technique, différente de celle utilisée en première intention.

Les techniques fréquemment associées sont : la chromatographie liquide haute performance, l'électrophorèse capillaire et l'isoélectrofocalisation (62). Cette approche a la problématique d'être longue et fastidieuse avec des difficultés à s'ajuster à la demande croissante.

Le consensus européen de 2017 sur le dépistage de la drépanocytose chez le nouveau-né (59) ajoute que toute méthode qui a démontré une spécificité et une sensibilité au moins égale à la chromatographie ou à l'électrophorèse est acceptable.

L'analyse de l'hémoglobine par spectrométrie de masse en première étape de dépistage a récemment émergé comme une alternative aux techniques classiques grâce à sa sensibilité et la possibilité d'un coût faible pour un débit élevé (59,63). Différentes techniques de spectrométrie de masse ont fait l'objet d'adaptation au dépistage néonatal des hémoglobinopathies : MS/MS (63), MALDI-ISD (64), MALDI-ESI (65), MALDI-TOF (3).

Au CHU de Lille, le dépistage néonatal de la drépanocytose s'organise par la collaboration de deux secteurs : le laboratoire des hémoglobinopathies et le laboratoire de dépistage périnatal. Il associe la spectrométrie de masse MALDI-TOF en première intention (laboratoire de dépistage périnatal) et la CLHP en confirmation (laboratoire d'hémoglobinopathies).

F. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse correspond à un ensemble de techniques permettant l'identification de molécules selon leur ratio masse/charge (m/z). Les applications principales sont l'identification de protéines et l'analyse de leur séquence en acides aminés.

Les molécules de l'échantillon sont ionisées et volatilisées dans une phase gazeuse puis séparées en fonction du ratio masse/charge.

C'est le spectromètre MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight) qui est utilisé au CHU de Lille en première intention dans le cadre du dépistage néonatal de la drépanocytose (MBT Smart, Bruker Daltonics) (3). Le but est d'identifier les différentes chaînes de globine du nouveau-né, qualitativement et semi-quantitativement. Une fois ionisées par laser, les chaînes de globine ont un temps de vol (ou « time of flight ») qui leur est propre selon leur masse.

Pour la préparation de la cible, un disque de Guthrie de 3,5mm est élué dans de l'eau déionisée. Une couche de matrice est déposée sur une cible en acier inoxydable (solution saturée d'acide sinapique et d'éthanol). Puis l'éluat dilué dans une solution d'acide sinapique et d'acide trifluoroacétique est ajouté. Ce processus permet de co-cristalliser de façon homogène l'échantillon avec la matrice et de favoriser l'ionisation, ce qui améliore la résolution et la sensibilité du spectromètre de masse. Ce processus est automatisé.

Chaque dépôt est soumis à des tirs de laser UV, qui permettent à la matrice d'ioniser les analytes par transfert de charge ($m+1$) et les volatilisent. Le laser dissocie les associations entre sous-unités de globine mais ne les fragmente pas.

Les ions sont transférés dans le tube de l'analyseur, où ils « volent » en trajectoire rectiligne jusqu'à un détecteur (**Figure 10**). Le temps de vol est proportionnel à la masse. Les données sont acquises en mode linéaire positif.

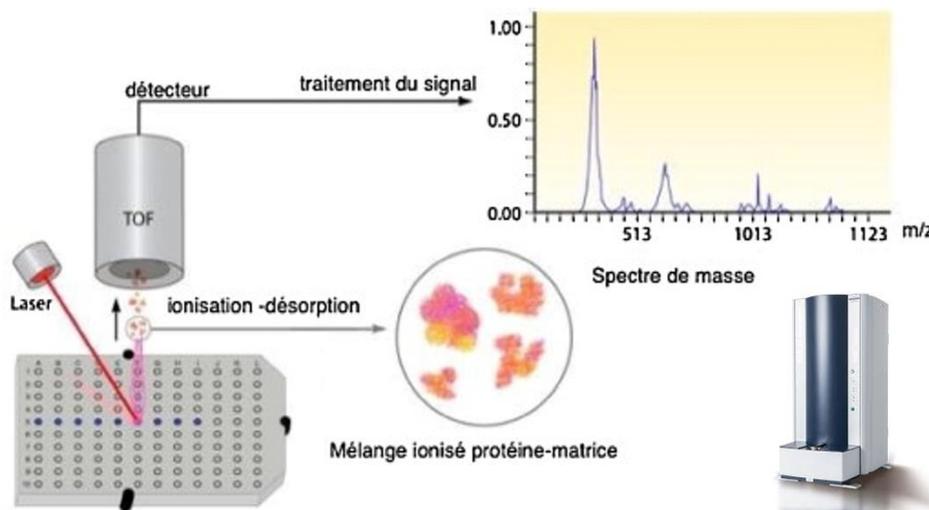


Figure 10 : Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (66).

Le traitement informatique des données modélise un spectre à partir de l'addition de 250 tirs de laser (mode classique) ou de 1000 tirs (mode « haute sensibilité ») dans une gamme de 15000-16200 m/z (1 m/z vaut 1 Da) (logiciel Flexcontrol 3.0). Cette gamme comprend les chaînes de globine d'intérêt pour la recherche de drépanocytose : chaîne β normale, chaîne β^s mutée, chaînes foétales $^A\gamma$ et $^G\gamma$.

Le résultat est présenté sous la forme d'un spectre (**Figure 11**). L'axe des abscisses correspond au rapport masse sur charge (m/z) et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal.

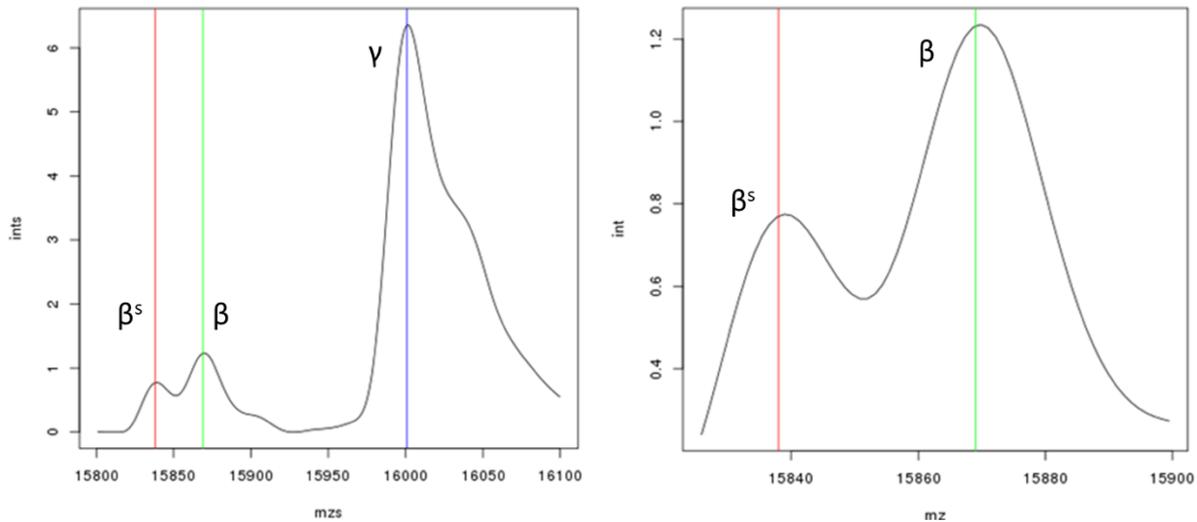


Figure 11 : Exemple de spectre des chaînes de globine du nouveau-né (MALDI-TOF). A gauche : profil « FAS » (chaînes bêta et gamma). A droite : zoom sur les chaînes bêta.

G. Confirmation du dépistage par chromatographie liquide haute performance

La technique de confirmation utilisée dans le laboratoire des hémoglobinopathies utilise l'automate Variant-NBS avec le programme Sickle Cell (Bio-Rad). Elle repose sur le principe de la chromatographie liquide haute performance échangeuse de cations (CLHP-EC) pour séparer les différentes hémoglobines.

La technique est automatisée, de haute résolution et rapide (3 minutes par échantillon) pour un résultat qualitatif et quantitatif des fractions d'hémoglobine. Les hémoglobines sont séparées en fonction des différences d'interactions ioniques avec la colonne.

L'automate fonctionne par série, avec des plaques de 96 puits. L'éluat de sang est injecté à haute pression dans une colonne chromatographique.

Dans la colonne on retrouve une phase stationnaire de résine sur laquelle des groupements anioniques sont greffés et neutralisés par des cations mobiles ; et une phase mobile dans laquelle des tampons imposent un gradient ionique progressif. L'augmentation de la force ionique du mélange entraîne l'élution des hémoglobines. Chaque fraction d'hémoglobine aura un temps de rétention (T_R) caractéristique.

L'absorbance est mesurée par un détecteur spectrophotométrique en sortie de colonne à 2 longueurs d'onde : 415 nm (spécifique des hémoglobines) et 690 nm (réduit le bruit de fond). Les résultats sont rendus sous forme de chromatogramme et exprimés en pourcentage de la surface totale (exemple : **Figure 12**).

L'automate Variant-NBS est dédié au dépistage néonatal. Sa particularité par rapport au Tosoh G8 (CLHP utilisée dans notre laboratoire pour l'étude des anomalies de l'hémoglobine chez l'adulte) est l'utilisation d'une colonne et de tampons spécifiques permettant une meilleure séparation des hémoglobines fœtales et une meilleure sensibilité (les hémoglobines adultes étant en faible proportion).

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	F1	0.253	37091	63775	4.8
2	F	0.457	374282	908217	67.7
3	A	0.799	96724	226743	16.9
4	D	1.054	25148	70123	5.2
5	C	1.695	26043	72965	5.4

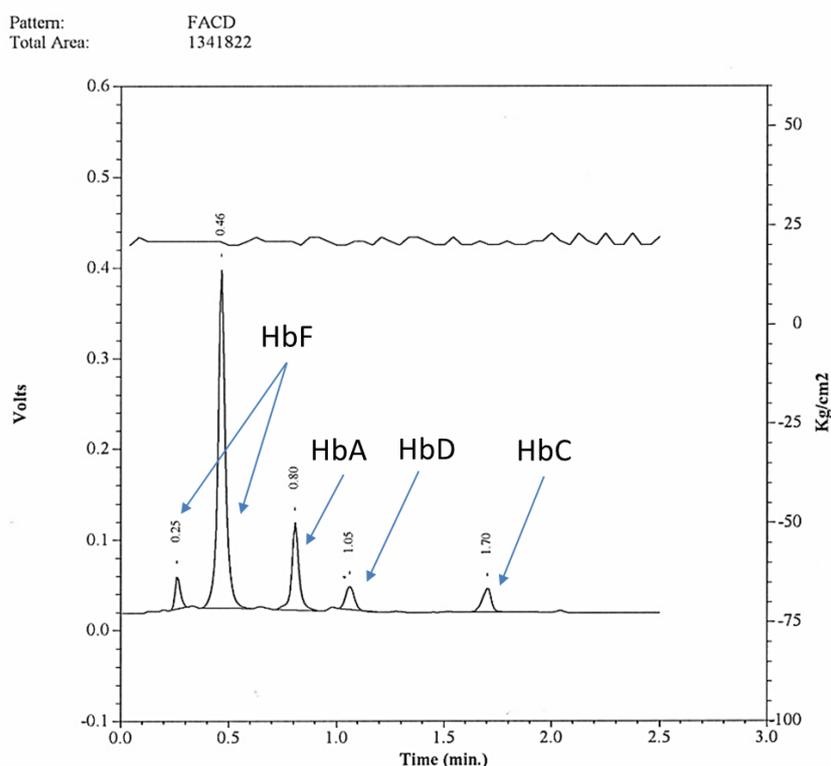


Figure 12 : Exemple de chromatogramme CLHP-EC (Variant-NBS, Bio-Rad). Contrôle FACD.

H. Suivi et confirmation diagnostique

Une consultation spécialisée avec un pédiatre référent de la pathologie est proposée pour les nouveau-nés présentant un profil de syndrome drépanocytaire majeur, vers l'âge de 1 mois. Cette première consultation permet de confirmer le résultat du dépistage sur un prélèvement veineux de l'enfant et des parents. Certaines hétérozygoties ne peuvent être détectées plus tôt chez le nouveau-né du fait de la présence majoritaire d'HbF. Une étude familiale est alors indispensable. L'étude de l'hémoglobine des parents permet de différencier les homozygotes SS, des bêta-thalasso-drépanocytoses S/ β^0 ou de l'association S- Persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale PHHF (qui ne nécessite pas de prise en charge) (60).

L'enfant sera également revu à 2 mois de vie, puis à l'âge d'un an pour établir ses taux d'hémoglobine adulte.

V. Les variants neutres

A. Définition

C'est un terme général qui englobe les anomalies qualitatives de l'hémoglobine où le variant ne peut pas être mis en évidence par une ou plusieurs techniques séparatives de l'hémoglobine.

La substitution d'un acide aminé par un autre de même charge empêche la séparation et le variant co-élue avec l'hémoglobine normale adulte HbA. Il sera donc confondu avec cette dernière.

Lors de la recherche d'une hémoglobine anormale, l'utilisation de 3 techniques séparatives de principes différents permet de diminuer le risque de manquer un tel variant. Cependant si le variant a un comportement neutre dans les 3 techniques utilisées ou qu'une seule technique est utilisée, le profil apparaîtra qualitativement normal et sera interprété comme tel.

Ce sont des variants rares mais de grande diversité. Ils sont difficiles à identifier.

B. Problématique clinique des variants neutres

Une grande variété de symptomatologie est associée aux variants neutres. Le diagnostic peut être long à être posé (errance diagnostique).

A l'état hétérozygote, ils peuvent être silencieux ou responsables d'une anémie légère à modérée, de complications thrombotiques, d'érythrocytose, de cyanose.

Beaucoup d'entre eux sont de premier abord cliniquement silencieux, mais peuvent donner un phénotype de bêta thalassémie intermédiaire plus ou moins sévère quand ils se retrouvent associés à d'autres anomalies des gènes de globine.

Par l'exemple l'Hb Olympia est une hémoglobine neutre hyperaffine. Seule elle est responsable d'une polyglobulie avec ou sans symptomatologie liée à l'érythrocytose. En association avec un trait bêta thalassémique, elle aggrave le phénotype. Dans le cas décrit par *Kalotychou et al*, malgré une polyglobulie mise en évidence à l'adolescence et une symptomatologie récurrente, le diagnostic d'hémoglobinopathie n'a été fait que 23 ans plus tard. Le patient était porteur d'une Hb Olympia, de traits alpha et bêta thalassémiques (67).

De même, l'hémoglobine La Désirade est neutre, instable *in vitro*, mais est asymptomatique à l'état hétérozygote. Or dans un cas d'association avec l'Hb Louisville, un autre variant instable, responsable à l'état hétérozygote d'une anémie légère, le patient présente une anémie hémolytique sévère (68).

Il est aussi intéressant de considérer la possibilité d'une interaction avec l'HbS. Leur présence peut conduire à un phénotype inhabituel de syndrome drépanocytaire majeur pour les individus présumés AS.

Luo et al décrit le cas d'une association Hb Volga/HbS. L'Hb Volga est un variant neutre de la chaîne bêta, de nature instable. L'électrophorèse de l'hémoglobine donne un profil de trait drépanocytaire AS or le phénotype clinique est celui d'une thalasso-drépanocytose S/ β^+ (69).

Peu de données sont disponibles dans la littérature sur ces associations d'où l'intérêt de continuer l'étude de ces variants pour enrichir les connaissances actuelles.

C. Quand suspecter un variant neutre

Les premiers signes peuvent être cliniques et évocateurs d'hémoglobinopathie : anémie chronique, hypoxie persistante, hémolyse, polyglobulie etc. avec éventuel caractère familial. Il faut d'abord éliminer les autres causes acquises et congénitales.

Au niveau biologique, dans de rares cas des signes peuvent évoquer un variant neutre lors d'une recherche d'anomalie de l'hémoglobine :

- Devant des discordances entre les techniques séparatives utilisées : un pic ou une bande apparaît sur une technique et pas une autre.
- Devant un pic d'HbA de forme imparfaite (élargi, épaulement).
- Quand un variant à l'état hétérozygote (exemple : HbS) présente un taux inhabituel, trop bas ou trop élevé.

Devant la non-spécificité de la symptomatologie et des résultats d'analyse, ce sont des pathologies où l'errance diagnostique est forte. Ceci souligne la nécessité d'un dialogue clinico-biologique dans le but d'orienter les investigations vers les techniques les plus adaptées.

D. Mettre en évidence et identifier un variant neutre

On peut étudier les propriétés biochimiques et mettre en évidence une anomalie :

- Affinité pour l'oxygène : PO_250 ,
- Stabilité : test d'instabilité.

En utilisant d'autres techniques de séparation comme la CLHP en phase inverse (70), l'électrophorèse de chaînes ou la spectrométrie de masse (71) il est parfois possible d'isoler le variant. Toutefois ces techniques ne sont pas disponibles dans la majorité des laboratoires de diagnostic. Il n'y a aucune certitude de mettre en évidence le variant neutre par ces techniques.

La possibilité du recours au séquençage des gènes de globine par biologie moléculaire place désormais ces techniques au second plan. En effet, le séquençage présente l'avantage d'être désormais une technique disponible dans de plus en plus de laboratoires, avec une exploration des gènes de globine relativement facile à mettre en place et pouvant mettre en évidence et identifier les variants neutres par la modification de la séquence génétique.

VI. Séquençage des gènes de globine

A. Particularités des gènes de globine

1. Homologies de séquence

Les gènes de globine résultent de duplications au cours de l'évolution donc les homologies de séquences sont nombreuses. Cela pose parfois des difficultés pour séquencer un gène spécifique du fait de l'impossibilité de créer un primer adéquat. Le séquençage différentiel est complexe pour les gènes gamma (HBG1 et HBGG2) et gènes alpha (HBA1 et HBA2) (72).

2. Modulations du phénotype

La corrélation entre le génotype et le phénotype clinique des hémoglobinopathies est parfois complexe. Pour une même mutation, l'expression phénotypique peut varier selon les individus.

Parmi les modulateurs du phénotype des hémoglobinopathies, on retrouve notamment :

- L'implication de gènes du locus globine :
 - L'association avec autre hémoglobinopathie : une thalassémie ou un variant.
 - La production d'HbF chez l'adulte : agit en tant qu'hémoglobine fonctionnelle et en tant qu'inhibiteur de la polymérisation de l'HbS.
 - L'haplotype du locus bêta globine : un ensemble de polymorphismes du locus bêta globine impacte le phénotype drépanocytaire.
- L'implication d'autres gènes : lié au métabolisme du fer, de la bilirubine, à la susceptibilité aux complications...
- Lié à l'environnement : encore peu connues.

Dans le cadre des bêta thalassémies, la grande diversité des génotypes conduit en parallèle à une variété phénotypique. La gravité du phénotype va dépendre de la production résiduelle de chaîne bêta, mais principalement du ratio de chaînes alpha/bêta car les chaînes en excès précipitent engendrant l'hémolyse. C'est pourquoi une association avec une alpha thalassémie va améliorer le phénotype, alors qu'une association à une triplication alpha globine va l'aggraver.

De plus, la stabilité de la chaîne bêta anormale est à prendre en compte. Celle-ci peut être fortement instable et précipiter au stade érythropoïétique ou moins instable et s'incorporer aux tétramères de globine pour précipiter au niveau intravasculaire (73).

Dans la drépanocytose, l'association avec une autre mutation de l'hémoglobine peut parfois s'avérer bénéfique. Par exemple un trait alpha thalassémique diminue le taux d'hémoglobine intra érythrocytaire donc diminue la polymérisation. L'association avec une production héréditaire d'hémoglobine fœtale (PHHF) peut suffire à inhiber la polymérisation.

Parmi les cinq haplotypes du locus bêta globine (Centrafrique, Sénégal, Cameroun, Benin et Arabo-indien), l'haplotype Centrafricain donne un syndrome drépanocytaire généralement plus sévère et l'Arabo-Indien est plus modéré (74).

3. Polymorphismes

De nombreuses mutations ponctuelles de type substitution nucléotidique sont retrouvées sur les gènes de globine, à des fréquences plus ou moins élevées dans la population générale.

Dans la grande majorité des cas, il s'agit de :

- Mutations silencieuses exoniques
- Substitutions introniques

Les mutations silencieuses n'entraînent pas de changement d'acide aminé du fait de la redondance du code génétique, elles n'auront pas de conséquences sur la protéine et sont donc non pathologiques.

La difficulté réside dans l'identification de l'impact des substitutions introniques. Ces substitutions peuvent n'avoir aucune conséquence sur la protéine mais peuvent aussi par exemple conduire à un ARN instable ou modifier l'épissage et produire un ARNm anormal (75).

Lors du séquençage du gène ils doivent être pris en compte et comparés à des bases de données prenant en compte des critères de fréquence en population générale, de localisation, de signes cliniques associés. Les polymorphismes compliquent donc l'interprétation des résultats.

B. Amplification et séquençage Sanger

1. Principe de la PCR

L'objectif de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est l'amplification d'une séquence d'ADN spécifique à partir d'un ADN génomique double brin.

L'ADN est préalablement extrait à partir de sang ou de tissus.

Le mélange réactionnel comprendra :

- L'ADN génomique extrait contenant la séquence à amplifier,
- Une enzyme Taq polymérase, qui a pour rôle la synthèse de l'ADN,
- Des nucléotides, qui seront incorporés pour former les copies d'ADN,
- Un couple d'amorces spécifique qui va encadrer la séquence à amplifier (amorce sens et amorce anti-sens).

L'ADN sera amplifié par plusieurs cycles d'un processus de trois étapes. La quantité d'ADN produite est exponentielle, 2^n (n, le nombre de cycles).

Première étape : dénaturation de l'ADN (la séparation des deux brins) par chauffage (95°C).

Deuxième étape : hybridation des amorces à l'ADN simple brin (température d'hybridation spécifique de l'amorce utilisée, entre 40 et 65°C).

Troisième étape : élongation des brins d'ADN, la Taq polymérase va synthétiser l'ADN complémentaire à partir des amorces (à 72°C, température optimale de la Taq).

2. Principe du séquençage Sanger

Lors de la PCR, la Taq polymérase synthétise l'ADN en intégrant des nucléotides à partir d'un mélange de désoxyribonucléotides (dNTP) et de didésoxyribonucléotides marqués par un fluorochrome (ddNTP).

Les ddNTP intégrés entraînent un arrêt de la synthèse du brin d'ADN. Au hasard de l'incorporation d'un dNTP ou d'un ddNTP et grâce au grand nombre de copies produites (2^n), on va retrouver des fragments de toutes les tailles (76).

Les ddNTP intégrés sont porteurs de fluorophores. Ils émettent à une longueur d'onde spécifique du type de nucléotide, ce qui permettra de les identifier (77).

Lors du séquençage à proprement parler, les fragments sont séparés par électrophorèse capillaire. Les signaux de fluorescence sont lus à la sortie du capillaire et convertis par traitement informatique en électrophorégramme (**Figure 13**).

1. Brins d'ADN marqués de longueur croissante



2. Séparation par électrophorèse capillaire



3. Détection laser

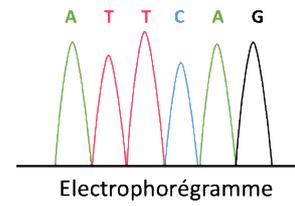


Figure 13 : Principe du séquençage selon la méthode Sanger.

DISCORDANCES ENTRE LES TECHNIQUES DE SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI- TOF ET DE CLHP

Dans un premier temps, cette thèse va définir les profils les plus couramment rencontrés lors du dépistage néonatal par technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF et chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Dans un second temps sera étudiée la problématique des discordances entre les résultats de ces deux techniques, qui se pose au biologiste lors de l'interprétation des résultats de dépistage néonatal de la drépanocytose.

Enfin, une stratégie pour explorer ces discordances sera proposée.

I. Notations

Les profils sont nommés en fonction des hémoglobines retrouvées, c'est-à-dire :

- « F » pour l'HbF (hémoglobine fœtale) ou une chaîne γ ,
- « A » pour l'HbA ou une chaîne β non mutée,
- « S » pour l'HbS ou une chaîne mutée β^s ,
- « X » pour une autre hémoglobine non identifiée.

L'Hb majoritaire est notée en premier.

Par exemple « FA » est un profil normal de nouveau-né, avec une HbF et HbA ; « FAS » représente un trait drépanocytaire avec une majorité d'HbF ; « FS » un nouveau-né drépanocytaire majeur ; « FAX » un nouveau-né avec de l'HbA normale et une Hb non identifiée.

II. Problématiques générales d'interprétation des résultats

Les difficultés générales d'interprétations peuvent être :

- Liées à l'âge du nouveau-né :
 - On a une prédominance d'HbF dont le taux est difficilement comparable d'un enfant à l'autre.
 - Pour les prématurés, plus l'âge gestationnel est faible, plus les taux d'hémoglobines adultes seront faibles, voir absents. Le résultat du dépistage pourra être ininterprétable.
- Lié à la transfusion :
 - L'hémoglobine analysée correspondra en partie à celle du donneur, rendant le résultat ininterprétable. La transfusion peut être suspectée devant un taux d'HbA trop élevé.
- Lié à la qualité du prélèvement :
 - Un mauvais séchage ou une mauvaise conservation peuvent dégrader le prélèvement et on obtient un bruit de fond analytique pouvant masquer ou mimer des anomalies.
 - Avec un prélèvement en faible quantité, ou si le nouveau-né présentait une anémie sévère, le résultat peut être ininterprétable faute de matériel.

III. Profils de spectrométrie de masse MALDI-TOF

A. Cadre de lecture et résolution

Dans un cadre du dépistage, le choix a été fait au CHU de Lille de ne pas analyser l'intégralité du spectre MALDI-TOF, uniquement la zone comprenant les chaînes d'intérêt dans la drépanocytose. Ceci s'inscrit à la fois dans un cadre éthique de dépistage, pour ne visualiser que la pathologie recherchée, et facilite l'interprétation (moins de données sont à analyser). La présence de variants absents de la zone de lecture ne peut donc pas être exclue.

La zone de lecture choisie se situe entre 15800 et 16100 m/z et comprend la chaîne mutée β^s , la chaîne non mutée β , les chaînes $\Lambda\gamma$ et $\epsilon\gamma$ (3). Les 2 chaînes γ sont visualisées en un pic unique. Ne sont pas visualisées les chaînes alpha.

Chaîne	Masse théorique des chaînes de globine
α	15127
β^s	15838
β	15868
δ	15925
$^G\gamma$	15996*
$^A\gamma$	16010*

Tableau 2 : Masses théoriques des chaînes de globine humaines (78).

*Pour simplification, le pic γ sur les spectres présentés sera présenté comme un pic unique, en position 16010 m/z.

La résolution, c'est-à-dire la capacité analytique à séparer 2 pics distincts, ne permet pas de distinguer les hémoglobines C, E, O-Arab, D-Punjab (différence de masse avec la chaîne $\beta = -1$). Cela a l'avantage de ne pas visualiser ces variants fréquents mais sans impact médical. Ils ne sont significatifs que associés à l'hémoglobine S, or tout profil présentant de l'HbS sera confirmé en CLHP, technique qui permettra alors de mettre en évidence l'hétérozygotie composite.

B. Méthodes de classification

Un algorithme élaboré d'après une base de données de spectres de référence (3) classe automatiquement les spectres « FA », « FAS », « FS » ou « non interprétable ». Celui-ci prend en compte la présence de pics retrouvés à 3 zones d'intérêt (chaînes β^s , β , γ) et le rapport de hauteur des pics en β^s et β . Une validation des spectres pathologiques ou anormaux par un technicien confirme ou infirme l'interprétation de l'algorithme.

Les spectres standards « FA », « FAS » ou « FS » confirmés tels quels lors de la validation technique seront envoyés directement pour la validation biologique.

Les spectres non standards seront ici divisés en 2 catégories : les spectres anormaux et les spectres de mauvaise qualité (exemples et définitions plus bas) (79,80).

Bien que des profils « standards » et « non standards » soient distingués, il existe un continuum entre les deux.

C. Distinction de profils anormaux et de profils de mauvaise qualité

Un spectre de mauvaise qualité est un spectre qui présente des interférences, avec par exemple du bruit de fond (**Figure 14A-B**), des pics dédoublés (**Figure 14C**) ou des pics décalés (« shift ») (**Figure 14D**) (79).

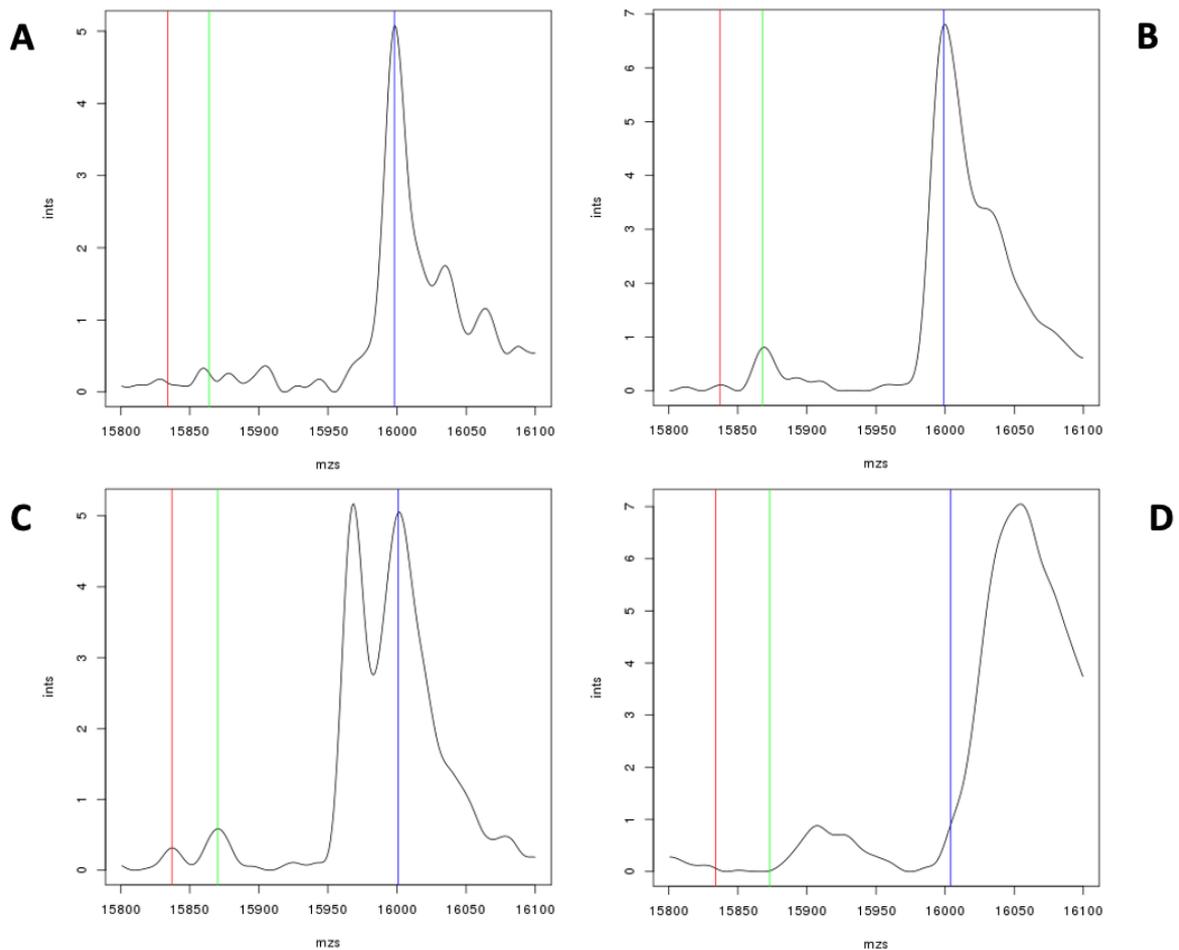


Figure 14 : Exemples de spectres MALDI-TOF de mauvaise qualité. A. Bruit de fond modéré, B. Bruit de fond léger, C. Pics dédoublés, D. Pics décalés, « shift ».

Les spectres anormaux présentent un pic dont la position ne correspond pas à une chaîne β , β^s ou γ , sans autre anomalie (**Figure 15**). Le pic anormal est symétrique, d'une hauteur similaire au pic β ou γ .

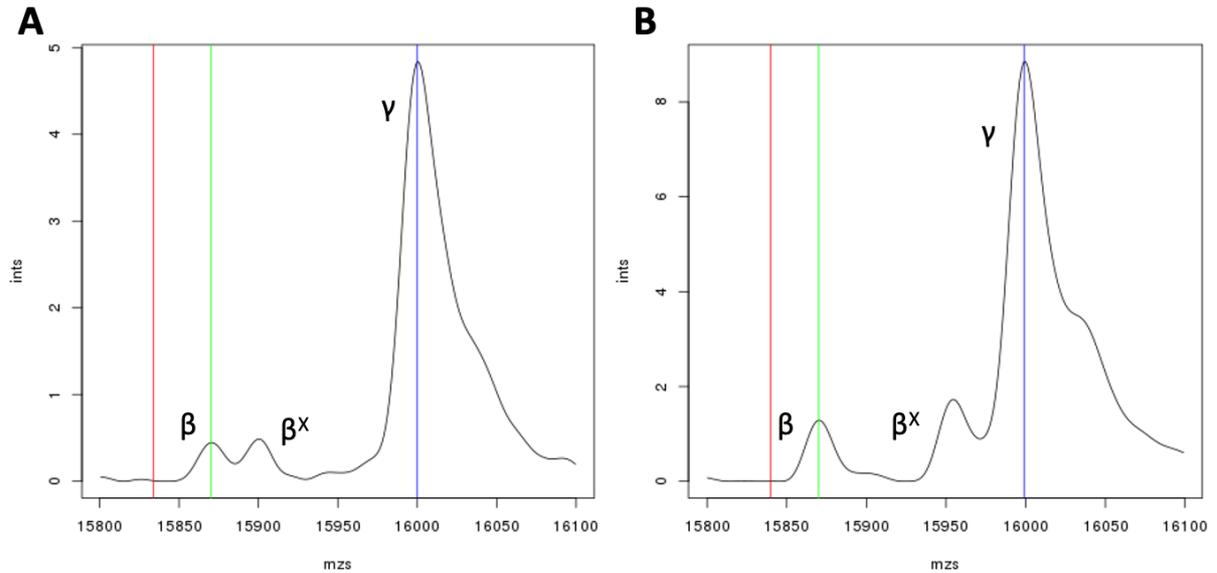


Figure 15 : Pics anormaux (β^x).

Un spectre non standard sera réanalysé pour éliminer une anomalie liée à une erreur analytique (cas d'un profil de mauvaise qualité) ou de confirmer une anomalie (cas d'un profil anormal).

L'échantillon peut être réanalysé selon 2 modalités : en « haute sensibilité » ou après reperforation. En « haute sensibilité », on augmente le nombre de tirs laser (1000 au lieu de 250), ceci atténue les problèmes liés au manque d'homogénéisation de la cristallisation de l'échantillon sur la cible. Par reperforation, on prépare un nouvel échantillon à partir de l'échantillon primaire.

Si un profil reste douteux après passage en haute sensibilité et/ou reperforation, il est envoyé pour confirmation par CLHP.

D. Profils typiques

Ces profils sont superposables aux profils de référence utilisés pour la mise au point de la technique.

1. Profil non pathologique « FA »

On observe un pic majoritaire de chaînes γ vers 16010 m/z et un pic en 15868 m/z de chaînes β (Figure 16).

Il n'y a pas de pic supplémentaire, il y a retour à la ligne de base entre les pics. Le pic bêta est pointu et symétrique.

Le pic gamma présente une asymétrie normale. Celle-ci s'explique par la substitution d'une partie des chaînes. Notamment par l'acétylation qui augmente le poids moléculaire (+ 42Da) et justifie l'aspect d'une « trainée » ou d'un « épaulement » (78).

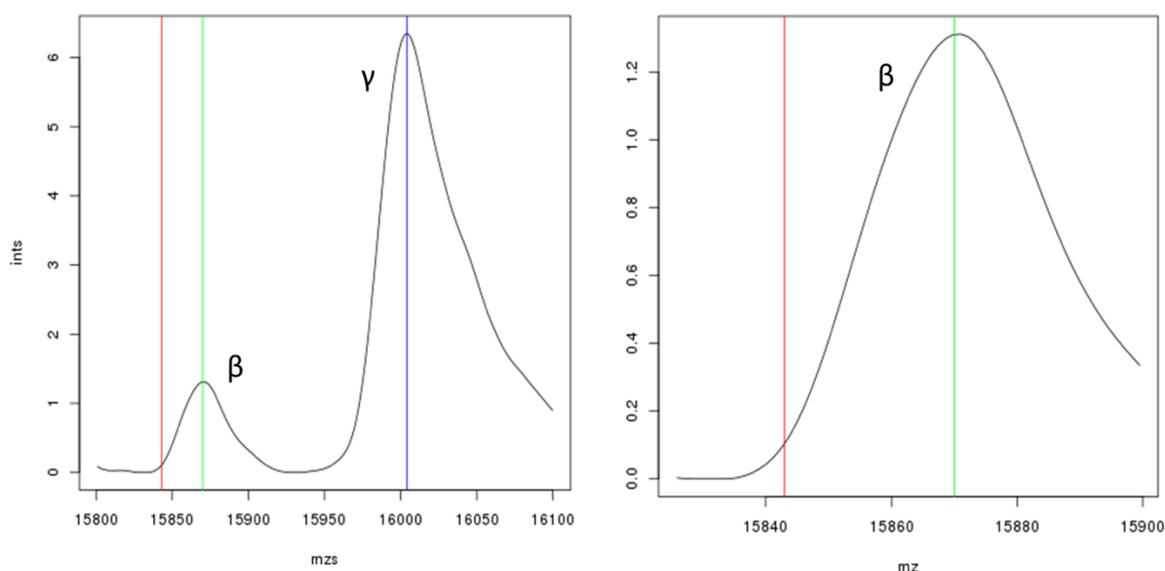


Figure 16 : Profil « FA » par spectrométrie de masse MALDI-TOF. A droite : zoom sur les chaînes bêta.

2. Profil non pathologique « FAS »

On observe 3 pics, un majoritaire vers 16010 m/z, deux minoritaires en 15838 et 15868, correspondant respectivement à une chaîne mutée β^s et β normale. L'épaulement suivant la chaîne γ est à nouveau normal, ainsi que le soulèvement présent après le pic β , il s'agit de chaînes substituées.

Ceci est donc le profil d'un nouveau-né « FAS », qui présente un trait drépanocytaire (Figure 17).

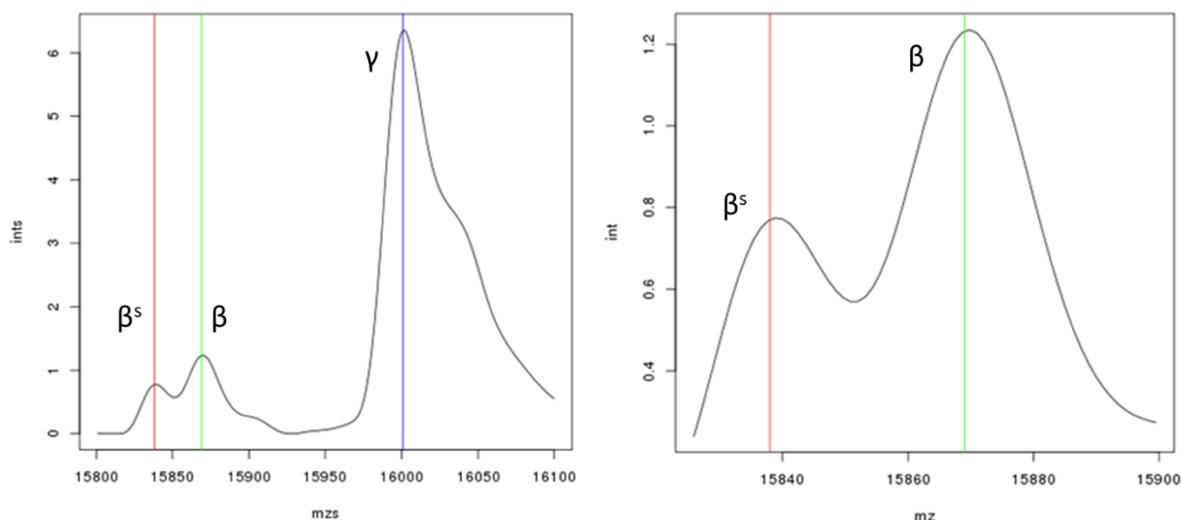


Figure 17 : Profil « FAS » par spectrométrie de masse MALDI-TOF. A droite : zoom sur les chaînes bêta.

3. Profil pathologique « FS »

Figure 18 : Ce profil présente un pic majoritaire de chaîne γ (16010 m/z) et un pic minoritaire unique en position de chaîne β^s mutée (15838 m/z). Les irrégularités de la ligne de base sont non significatives (bruit de fond).

Il s'agit donc d'un enfant drépanocytaire majeur « FS ».

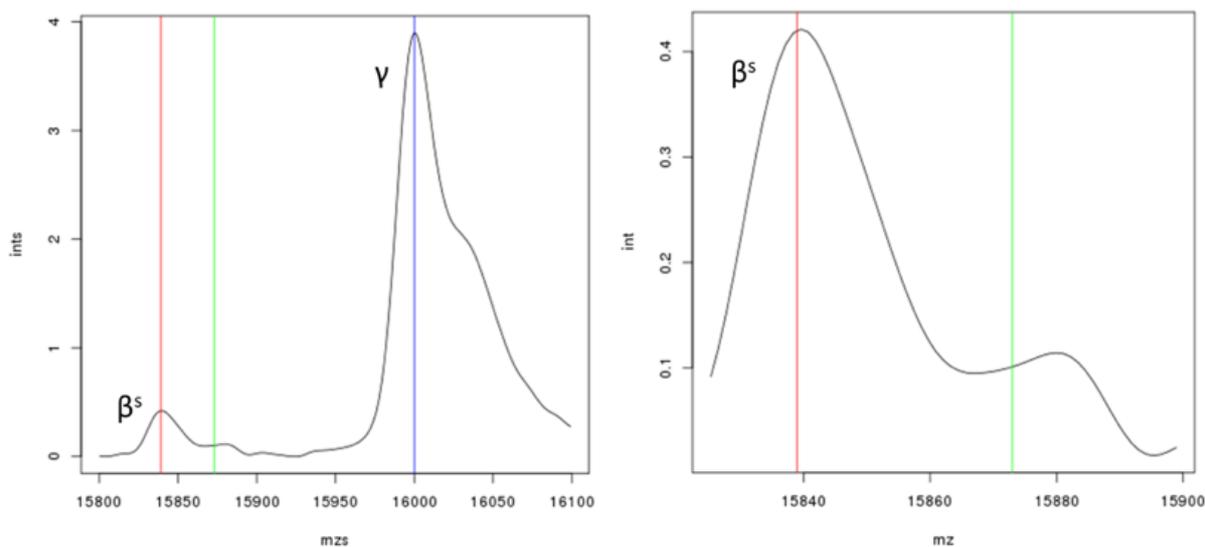


Figure 18 : Profil « FS » par spectrométrie de masse MALDI-TOF. A droite : zoom sur les chaînes bêta.

IV. Profils de chromatographie liquide haute performance

A. Classification des profils

Le chromatogramme est divisé en 14 fenêtres, en fonction du temps de rétention (81). Dans la fenêtre « FAST » éluent l'hémoglobine dégradée, les résidus de papier, la bilirubine et l'Hb Bart's. Le taux est évocateur d'une alpha thalassémie si le pic « FAST » est $\geq 22,5\%$ (82). « F1 » et « F » correspondent respectivement à l'HbF acétylée et l'HbF non acétylée. Les autres zones d'intérêt sont les fenêtres « A » et « OTHER(1) » (HbA et ses produits de dégradation), « D », « S », « C » et « E ». L'HbA₂ et E éluent dans la même fenêtre, mais l'HbA₂ étant sous le seuil de détection chez les nouveau-nés, un pic dans cette fenêtre sera automatiquement attribué à l'HbE.

B. Profil non pathologique « FA »

Sur ce chromatogramme (**Figure 19**) on observe des pics mineurs d'hémoglobine dégradée ($T_R=0.11, 0.21$ et 0.68), d'Hb F ($T_R=0.27$ et 0.46) et d'HbA ($T_R=0.80$). Il s'agit d'un profil « FA », normal pour l'âge.

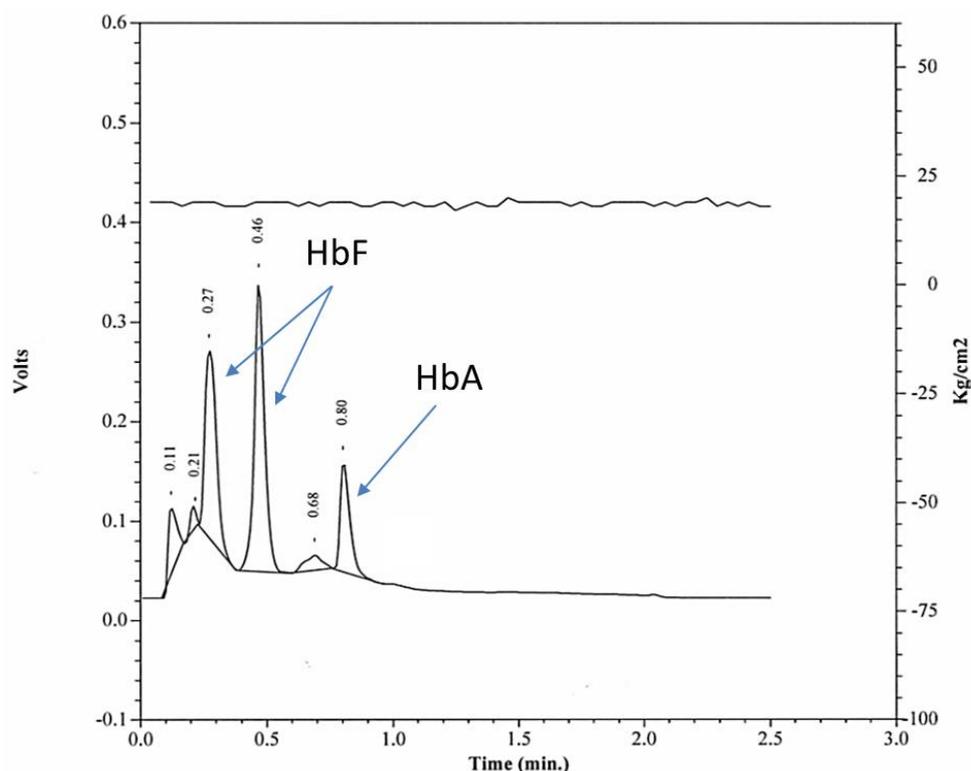


Figure 19 : Chromatogramme « FA » par CLHP-EC.

C. Profil non pathologique « FAS »

Ce chromatogramme (**Figure 20**) montre de l'HbF ($T_R=0.27$ et 0.46) et en particulier un pic d'HbA ($T_R=0.80$) et d'HbS ($T_R=1.17$), avec un rapport des taux A/S < 3.

C'est un profil « FAS », typique d'un hétérozygote AS.

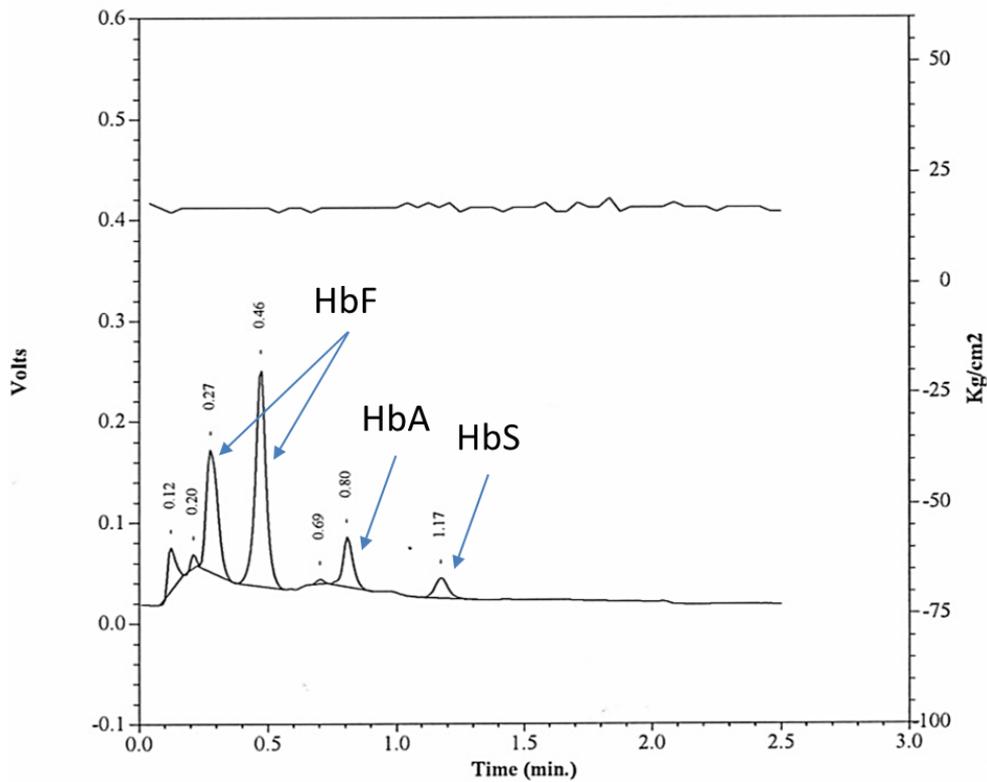


Figure 20 : Chromatogramme « FAS » par CLHP-EC.

D. Profil pathologique « FS »

La particularité de ce chromatogramme (**Figure 21**) est l'absence d'HbA et un pic correspondant à de l'HbS ($T_R=1.17$). C'est un profil de nouveau-né drépanocytaire majeur (FS).

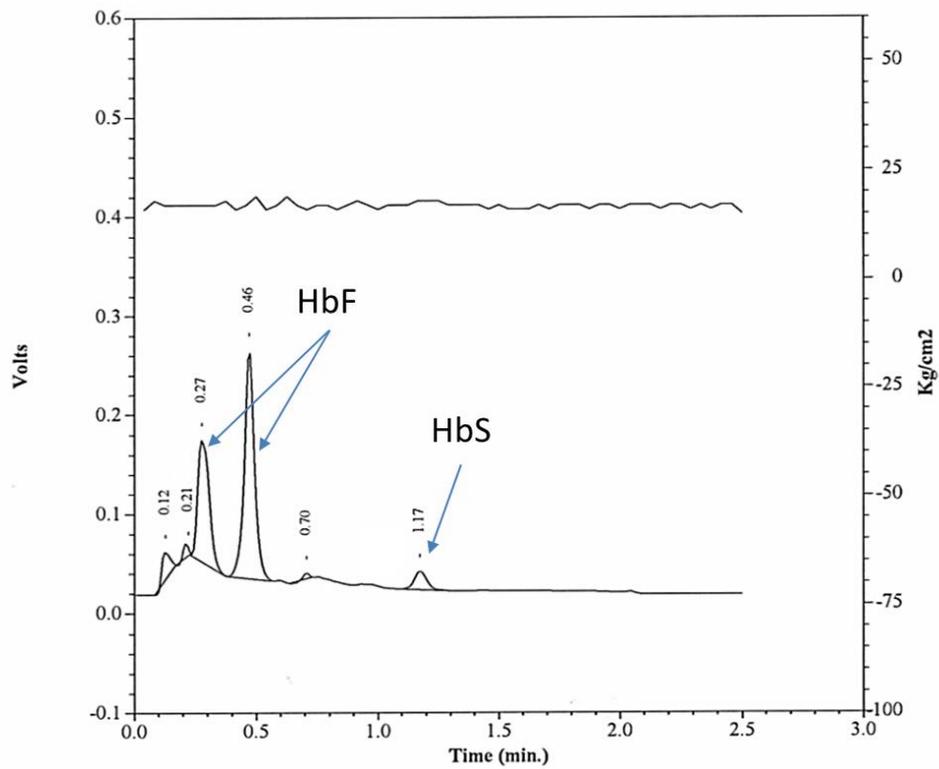


Figure 21 : Chromatogramme « FS » par CLHP-EC.

E. Profil pathologique « FSC »

Ce chromatogramme (**Figure 22**) présente une absence d'HbA, avec deux pics anormaux :

- De l'HbS ($T_R=1.17$)
- De l'HbC ($T_R=1.68$)

C'est un profil de nouveau-né drépanocytaire majeur (FSC).

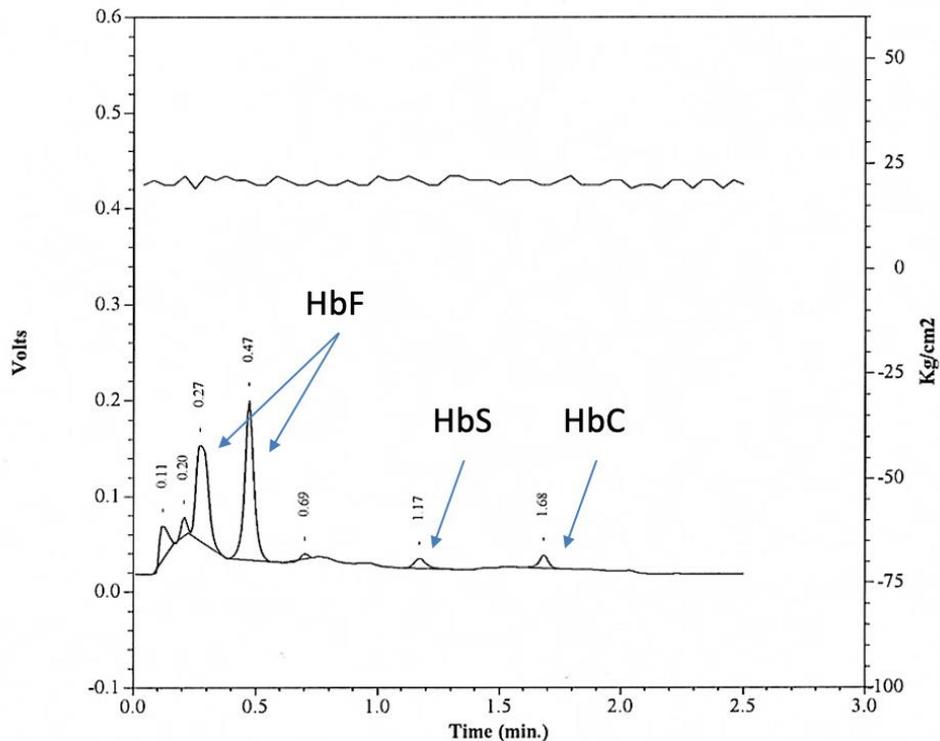


Figure 22 : Chromatogramme « FSC » par CLHP-EC.

V. Discordance de résultats entre les deux techniques

A. Définition et problématique des discordances

Après les vérifications analytiques, certains résultats diffèrent entre la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF et celle de chromatographie liquide haute performance.

Avant la mise en place du spectromètre MALDI-TOF en technique de première intention dans le dépistage néonatal de la drépanocytose, ces profils de discordance n'étaient pas rencontrés. Les techniques utilisées étaient l'électrophorèse capillaire avec la CLHP en technique de confirmation.

L'apparition de cette problématique pose un questionnement sur l'interprétation biologique des cas concernés : Que rendre comme résultat ? A quelle technique se fier ? Quelles sont les analyses complémentaires à réaliser ?

Ce questionnement est d'autant plus important que le rendu de résultat va impacter la prise en charge des nouveau-nés, peut déclencher une étude familiale et être une source de stress pour la famille.

B. Cas de discordances analysés dans le cadre de cette étude

On s'intéresse aux cas où la première technique visualise un pic anormal β^s , et en seconde technique ce pic disparaît pour apparaître comme une hémoglobine normale.

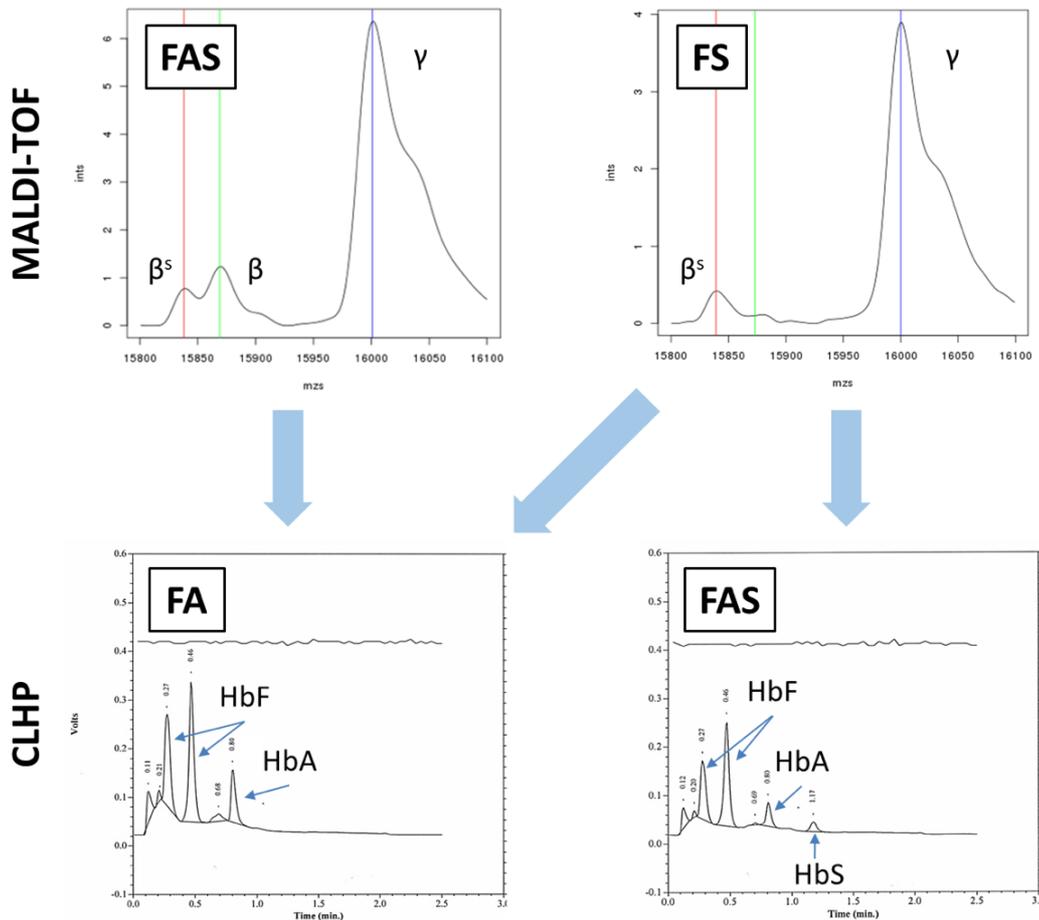


Figure 23 : Les différents cas de discordances entre les techniques de MALDI-TOF et CLHP observés dans l'étude. En haut : spectres MALDI-TOF FAS (à gauche) et FS (à droite). En bas : chromatogrammes CLHP-EC FA (à gauche) et FAS (à droite).

FAS > FA

On visualise des pics sur le spectre MALDI-TOF pouvant correspondre à de l'HbA (β) et à de l'HbS (β^s). Le spectre est strictement identique aux profils « FAS » standards, l'examen du spectre ne laisse pas suspecter d'anomalie.

En CLHP seule l'HbA est retrouvée (chromatogramme qualitativement et quantitativement normal).

FS > FAS

Visualisation d'un pic sur le spectre MALDI-TOF pouvant correspondre à de l'HbS, sans pic au niveau de l'HbA. Au contraire en CLHP 2 pics sont retrouvés, un au niveau de l'HbA, un en HbS.

FS > FA

On visualise un pic de chaînes au niveau β^s sans chaîne β normale sur le spectre MALDI-TOF mais la CLHP retrouve un profil FA normal pour l'âge (HbF + HbA).

C. Hypothèses sur l'origine des discordances

On cherche à identifier la nature du pic retrouvé par spectrométrie de masse vers 15838 m/z.

Variant de la chaîne bêta globine

Le phénomène s'observant de manière répétée parmi les échantillons analysés, et ne se corrigeant pas après réanalyse, il ne s'agit pas d'un artefact mais *a priori* d'une hémoglobine.

La hauteur du pic étant équivalente à celle de la chaîne bêta, on s'oriente vers un variant bêta. La chaîne de globine visualisée est plus légère que la chaîne bêta donc il ne peut s'agir d'une chaîne bêta substituée.

Selon le profil de spectrométrie de masse, sa masse doit être proche de celle de la chaîne β^s .

Variant neutre

Les techniques séparatives de l'Hb, dont la CLHP, ne peuvent pas exclure la présence d'un variant « neutre » co-éluant avec l'HbA devant un profil sans anomalie visible. C'est donc une hypothèse envisageable pour expliquer ces discordances.

De plus, l'ancienne stratégie de dépistage (association électrophorèse capillaire – CLHP) ne présentait pas ses discordances, or ces techniques n'ont pas la possibilité de mettre en évidence des variants neutres.

Une étude non exhaustive des variants de la chaîne bêta globine répertoriés dans la base de donnée HbVar (1) a été réalisée à la recherche de tels variants d'hémoglobine (**Tableau 3**).

Le but était d'évaluer si des variants existent et ainsi appuyer notre hypothèse sur l'origine des discordances.

Différence de masse	Hb non séparable de l'HbA	
	Décrit neutre en CLHP-EC	Non testé en CLHP-EC
-28	Hb Howden Hb Zoeterwoude Hb Djelfa Hb Stanmore Hb Beirut Hb Yaoundé Hb Athens-Georgia	Hb Collingwood
-29		Aucune
-30		Aucune
-31	Aucune	Hb Hyden
-32		Aucune

Tableau 3 : Variants d'hémoglobine connus. *Sélectionnés selon les critères : causés par une mutation ponctuelle de type « faux sens » de la chaîne bêta globine, entraînant une perte de masse similaire à celle de l'HbS (-30 ± 2Da), ayant un comportement neutre en CLHP-EC ou dans un autre système si non testé en CLHP-EC.*

L'hypothèse privilégiée est donc la présence d'un variant de la chaîne bêta globine, neutre, avec une masse similaire à l'HbS.

VI. Stratégies pour l'étude de ces discordances

A. Apport de la biologie moléculaire

L'étude par biologie moléculaire permet de contourner les problèmes auxquels nous sommes confrontés :

- Ce sont des variants neutres :

Ils sont neutres dans la plupart des techniques de séparation de l'hémoglobine utilisées en routine. Étudier l'échantillon avec d'autres techniques séparatives n'est pas envisageable, car cela nécessite des techniques non disponibles dans notre laboratoire.

- Le séquençage des gènes de globine est disponible :

La technique est disponible dans notre laboratoire, fiable, avec l'expérience de plusieurs années d'utilisation. La technique de Sanger est adaptée à la recherche de mutations ponctuelles.

- L'échantillon de départ le permet :

Le faible volume de sang séché disponible sur le buvard permet théoriquement d'obtenir une quantité suffisante de matériel génétique.

- C'est une technique qui permet d'identifier les variants :

En mettant en évidence une mutation, elle permet d'identifier le variant, qu'il ait déjà été décrit ou non. Elle permet de confirmer le comportement neutre et d'obtenir des données cliniques d'après la littérature.

En identifiant l'acide aminé qui est substitué, on peut en déduire la masse de la chaîne mutée et confirmer la cohérence avec les résultats de spectrométrie de masse.

B. Adapter les techniques de biologie moléculaires disponibles au buvard

Les techniques utilisées dans notre laboratoire pour le séquençage des gènes de globine utilisent comme échantillon du sang total liquide, à partir duquel l'ADN est rapidement extrait après prélèvement. Ceci permet l'obtention de matériel génétique en grande quantité et de bonne qualité.

Or notre échantillon de départ, provenant de tâche de sang séché en petite quantité ne peut pas permettre d'obtenir un ADN d'aussi grande quantité et qualité. Le risque est que ce matériel soit insuffisant pour réaliser l'amplification, ou que la qualité soit trop faible avec des résultats ininterprétables dû aux interférences.

Les objectifs seront donc :

- D'adapter une technique d'extraction d'ADN afin d'obtenir un rendement suffisant pour permettre l'amplification.
- D'adapter les étapes d'amplification et de séquençage pour obtenir un résultat interprétable, avec un minimum d'interférences.

MATERIEL ET METHODES

I. Sélection des échantillons

A. Recueil de données

L'étude est rétrospective.

Les échantillons de cette étude ont été sélectionnés parmi les demandes de dépistage néonatal de drépanocytose reçues par le CHU de Lille entre le 1^{er} février 2019 et le 1^{er} février 2020.

A partir des listes de travail des échantillons à vérifier en CLHP (c'est-à-dire ceux positifs en spectrométrie de masse), les résultats discordants entre les deux techniques ont été recueillis. Pour chaque résultat discordant, les spectres MALDI-TOF et les chromatogrammes correspondants ont été vérifiés (interprétation visuelle).

Les spectres ont été visualisés d'après la base de données « MIDAAS » (Biomane) pour la période du 1^{er} février 2019 au 31 août 2019 et sur le logiciel NeoSickle (Biomane) pour la période du 1^{er} septembre 2019 au 1^{er} février 2020. Les chromatogrammes proviennent des archives papier.

Les notions de transfusion ou de prématurité ont été recueillies d'après l'âge gestationnel mentionné sur « MIDAAS » ou « NeoSickle » et les annotations des biologistes lors de l'interprétation initiale des résultats.

Les résultats discordants ont été compilés dans un tableur (Excel).

B. Population d'étude

Les patients concernés sont des nouveau-nés d'environ trois jours de vie au moment du prélèvement qui ont bénéficié du dépistage ciblé de la drépanocytose. Les nouveau-nés ont été ciblés selon les antécédents familiaux et l'origine ethnique des parents. Les demandes émanent de métropole (Nord, Pas-De-Calais, Amiens, Caen, Rouen, Dijon, Rennes, Tours, Lyon, Grenoble) et d'Outre-Mer (Réunion, Guyane, Mayotte). Les échantillons sont identifiés par un numéro d'anonymat.

L'étude s'est limitée à environ 50 patients pour pouvoir réaliser les analyses dans un délai adéquat (3 mois).

C. Critères d'inclusion et d'exclusion

Les résultats discordants rendus FAS > FA, FS > FAS, ou FS > FA, respectivement par spectrométrie de masse et CLHP, ont été sélectionnés.

Sont exclus les échantillons avec existence d'une discordance non liée à la technique analytique et qui ne permettent pas d'attribuer un statut drépanocytaire ou non (transfusion, grande prématurité, quantité insuffisante).

Pour chacun des résultats discordants restants, l'étude des spectres MALDI-TOF et des chromatogrammes de CLHP (de l'analyse et des réanalyses éventuelles) est réalisée pour confirmer l'interprétation initiale et être inclus.

Après un examen visuel des buvards, la tache résiduelle doit permettre un minimum de 3 poinçons de 3,2mm de diamètre. Sont exclus les échantillons en quantité insuffisante (moins de trois poinçons disponibles).

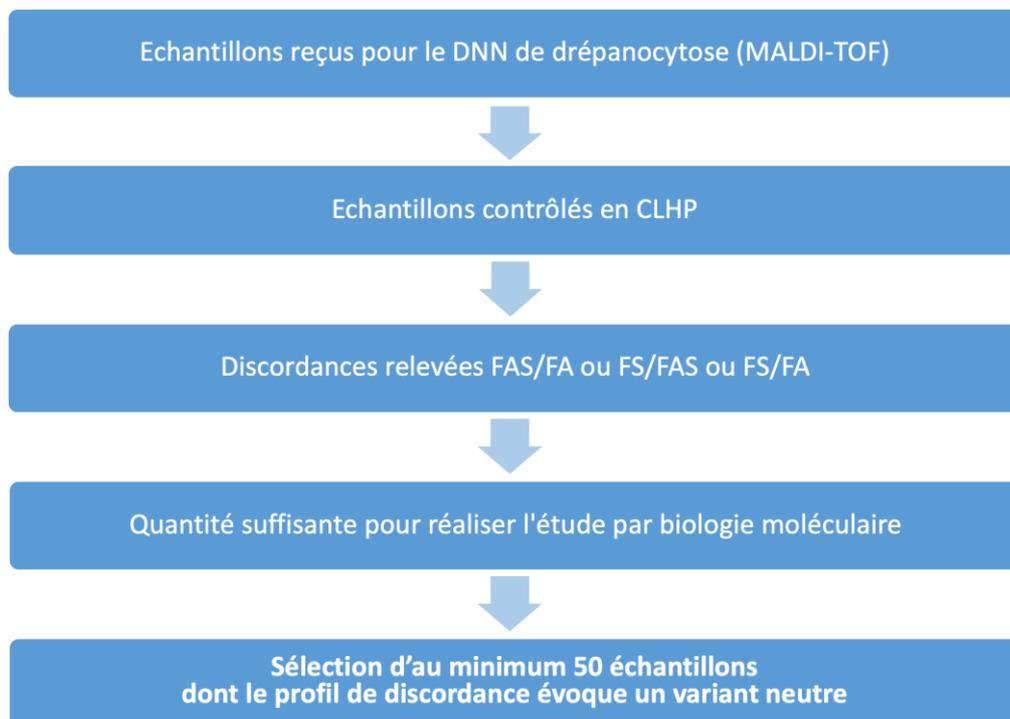


Figure 24 : Démarche générale de sélection des échantillons.

II. Matériels

A. Nature des échantillons

Le matériel utilisé pour l'étude des discordances provient des buvards après analyse (tache résiduelle de sang total séché). Ils ont été stockés à température ambiante, à l'abri de l'humidité et de la lumière, au sein du laboratoire de dépistage périnatal. Le papier buvard est de type Perkin Elmer 226. Les poinçons découpés ont un diamètre de 3,2mm.

L'ADN a été extrait sur des buvards stockés entre 1 et 12 mois après prélèvement.

L'étude de l'hémoglobine hors cadre de dépistage néonatal a été réalisée sur sang total prélevé sur tube EDTA.

B. Techniques séparatives utilisées pour l'étude de l'hémoglobine

Pour les échantillons de dépistage néonatal, l'analyse initiale a été réalisée sur :

- Le spectromètre de masse MALDI-TOF MBT Smart (Bruker Daltonics),
- La CLHP à échange de cations Variant-NBS (Bio-Rad),
- L'électrophorèse capillaire Capillarys 2 Neonat Fast (Sebia).

Pour les échantillons hors dépistage néonatal les techniques utilisées sont :

- La CLHP à échange de cations Tosoh G8, kit G8 B-Thal (Tosoh Biosciences),
- L'électrophorèse capillaire Capillarys 2 Flex Piercing, kit hémoglobine (Sebia),
- L'isoélectrofocalisation (Perkin Elmer).

III. Méthode : Application des techniques de biologie moléculaire au buvard, mise au point

La mise au point a été réalisée à partir de 8 échantillons (buvards) : 2 profils « FA », 2 « FAS », 2 « FS », 2 « FSC ».

Un échantillon dont l'ADN a été extrait à partir de sang total sur EDTA a été utilisé comme témoin positif pour les étapes de PCR et les suivantes. Le témoin négatif comporte le mélange réactionnel de PCR sans ADN.

Le temps d'analyse est long par rapport à un ADN classique car beaucoup d'adaptations ont été faites par rapport à la technique initiale.

A. Extraction d'ADN

L'ADN génomique est extrait manuellement, à partir de poinçons de buvard de diamètre 3,2mm, avec l'appareil Quickgene mini80 kit DNA Tissue (AutoGen). La concentration d'ADN et sa pureté (rapport d'absorbances A260/A280) sont mesurées après extraction avec le spectrophotomètre Nanodrop One (Thermo Scientific). L'ADN extrait est conservé à -20°C.

La technique d'extraction utilisée a nécessité l'adaptation d'une technique spécifique à l'extraction d'ADN à partir de buvards, transmise par le fournisseur. Il s'agit d'un protocole d'extraction par protéinase K, associant des étapes de lyse, de précipitation et de lavage à travers une membrane de filtration et d'élution.

Avec la technique initiale, la pureté de l'ADN extrait était correcte (rapport d'absorbances A260/A280 proche de 2) mais la concentration était trop faible pour que l'ADN puisse être amplifié (quantité d'ADN mesurée < 5 ng/μL, pas de détection de produit de PCR).

Optimisation de l'extraction

Pour augmenter la concentration finale d'ADN, deux approches ont été testées.

La première approche a été d'augmenter le nombre de poinçons de buvard (4 au lieu de 3), donc potentiellement d'augmenter l'ADN total. Les concentrations d'ADN étaient plus élevées (> 5 ng/μL), l'amplification a permis d'obtenir une bande faible après migration sur gel. Cette méthode implique d'exclure davantage d'échantillons (si quantité insuffisante).

L'autre approche a été de réduire le volume d'élution de l'ADN à 25μL, donc d'augmenter la concentration. La concentration obtenue était > 5 ng/μL. L'amplification a permis d'obtenir une bande plus intense qu'avec l'augmentation du nombre de poinçons.

Le volume final étant plus faible, il ne permet pas d'explorer l'ensemble des gènes de globine. Cependant les profils observés évoquent un variant bêta globine et cette approche est compatible avec l'exploration sélective de ce gène.

La méthode sélectionnée utilise 3 poinçons de buvard et 25μL de volume d'élution.

Les extraits d'ADN de cette étude présentait une concentration moyenne de 10,24 ng/ μ L [2,89 ; 25,20] et de pureté moyenne 2,07 [1,49 ; 2,76].

B. PCR

Les régions codantes du gène bêta globine HBB ont été amplifiées en 2 fragments. Le fragment 1 a été obtenu en utilisant l'amorce sens [5'-GAGCCAAGGACAGGTACGG-3'] et l'amorce anti-sens [5'-CATTCGTCTGTTTCCCATTCTA-3'], il permet l'amplification des exons 1 et 2. Le fragment 2 est obtenu avec l'amorce sens [5'-TAAGGCCCTTTTGCTAATCATG-3'] et l'amorce anti-sens [5'-GCAGCCTCACCTTCTTTCATGG-3'], il permet l'amplification de l'exon 3.

Les amplifications PCR ont été réalisées en microtubes à partir du mélange suivant (**Tableau 4**). La Taq polymérase utilisée est la Taq Invitrogen.

Réactifs	Volume par microtube en μ L
H ₂ O distillée	19,4
Tampon 10X	2,5
MgCl ₂ 50 mM	0,75
dNTP	0,2
Amorce sens (10 μ M)	0,5
Amorce anti-sens (10 μ M)	0,5
Taq Polymérase	0,15
ADN	2
Volume total	26

Tableau 4 : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification du gène de bêta globine (HBB).

Le protocole d'amplification est le suivant (**Tableau 5**). Les réactions ont lieu dans un thermocycleur.

Étape	Température	Durée	
Activation	94°C	2 minutes	
Dénaturation	94°C	1 minute	
Hybridation	60°C	1 minute	30 cycles
Élongation	72°C	1 minute	
Élongation finale	72°C	7 minutes	

Tableau 5 : Conditions d'amplification du gène de bêta globine (HBB).

Les produits de PCR des patients et des témoins (positif et négatif) ont été contrôlés par migration en gel d'agarose 2% + BET, après marquage au bleu de bromophénol (migration à 190 volts pendant 5 minutes). La présence d'une bande unique sous illumination UV confirme la réussite de la réaction.

C. Purification

La purification du produit de PCR a comme objectif d'éliminer les amorces et les dNTP non incorporés. Cette étape est essentielle pour diminuer les interférences lors du séquençage. Deux techniques de purification étaient disponibles : la purification enzymatique, la purification en colonne.

Dans la purification enzymatique, une exonucléase élimine les amorces en excès et une phosphatase alcaline dégrade les dNTP non consommés.

La purification en colonne retient les ADN sur une membrane en silice, le reste est éliminé par lavages. Bien que nécessitant davantage d'étapes de préparation, la purification en colonne permet en plus une concentration du produit de PCR.

Optimisation de la purification

Lors des essais, la purification enzymatique, avec utilisation d'exonucléase et de phosphatase alcaline n'était pas satisfaisante. Des pics résiduels étaient visualisés au séquençage et étaient parfois problématiques pour l'interprétation.

Le passage à la purification en colonne (GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit, GE Healthcare) a amélioré la qualité du signal en Sanger, en diminuant la fréquence des pics anormaux causés par un excès de dinucléotides.

L'utilisation d'un volume d'élution final de 15 μ L a permis de concentrer le produit de PCR.

D. Réaction de séquençage

Une seconde élongation est réalisée en thermocycleur avant le séquençage. Son but est d'incorporer en faible quantité des dNTP (désoxyribonucléotides triphosphates) et des ddNTP (didésoxyribonucléotides triphosphates). Les ddNTP sont marqués par un fluorochrome et leur intégration entraîne un arrête de la synthèse.

Cette réaction utilise les mêmes amorces que la PCR (avec une amorce sens ou anti-sens par puits), le réactif BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems) qui contient l'enzyme et les ddNTP, et du tampon (BigDye sequencing Buffer 5X) (**Tableau 6**).

Le thermocycleur utilise le programme décrit dans le **Tableau 7**.

Réactifs	Volume par puits en μL
H ₂ O distillée	13
BigDye	2
Tampon BigDye	3
Amorce (5 μM)	1
Produit de PCR purifié	1
Volume total	20

Tableau 6 : Mélange réactionnel de la seconde élongation du gène de bêta globine (HBB).

Étape	Température	Durée
Activation	96°C	1 minute
Dénaturation	96°C	10 secondes
Hybridation	50°C	5 secondes
Élongation	60°C	4 minutes
Repos	10°C	

25 cycles

Tableau 7 : Conditions de la seconde élongation du gène de bêta globine (HBB).

E. Séquençage Sanger

Le produit est purifié par gel-filtration (Biogel P-10) pour éliminer les amorces et nucléotides en excès du réactif BigDye. L'électrophorèse et l'analyse des produits de réaction ont été réalisées sur un séquenceur automatique Applied Biosystems 3130 XL 48 capillaires.

Les séquences ont été analysées avec le logiciel Seqscape Software v2.5.6 (Applied Biosystems).

La séquence de référence du gène bêta globine est : Genbank NM_000518.4 (numérotation +1 au A du codon initiateur de la traduction, selon la nomenclature internationale HGVS).

Les mutations ont été comparées aux mutations connues sur le logiciel Alamut Visual v2.10 (Interactive Biosoftware) pour distinguer les polymorphismes et les mutations d'intérêt.

IV. Détermination de la pathogénicité des variants

Nous ne bénéficions pas de données cliniques pour les nouveau-nés dont l'échantillon a été analysé dans le cadre de cette étude :

- Les échantillons sont anonymes,
- La symptomatologie potentielle peut ne pas s'exprimer dès la naissance.

Pour les variants connus, la pathogénicité a été évaluée d'après une revue de la littérature des cas cliniques et des études structurales et fonctionnelles.

Dans les cas où un patient présentant ce variant a bénéficié d'une étude de l'hémoglobine dans notre laboratoire, ses données cliniques et biologiques seront étudiées. Ceci dans le but d'évaluer si le variant présente ou non une symptomatologie associée.

Pour les variants non connus, la pathogénicité est discutée selon les données de la littérature des variants décrits sur la même position de la chaîne et en fonction de la localisation et de la nature de l'acide aminé substitué.

V. Évaluation de la fréquence des discordances

Pour évaluer la fréquence des discordances, la méthodologie a été la suivante :

Sur une période de 6 mois (du 21 février 2019 au 21 août 2019), tous les résultats des échantillons de dépistage néonatal envoyés en confirmation par CLHP ont été réexaminés et réinterprétés. Tous les échantillons correspondant à la définition de discordance de cette étude ont été comptabilisés.

Le nombre moyen annuel d'échantillons envoyés en confirmation est estimé d'après le nombre total d'échantillons envoyés en confirmation sur la période du 21 février 2019 au 30 octobre 2020, sur la base d'une série envoyée correspond à 85 échantillons analysés.

RESULTATS

I. Résultat du séquençage

Chez les 51 patients étudiés, tous présentaient une mutation exonique du gène bêta globine engendrant une hémoglobine anormale. Le type de mutation est dans les 51 cas une substitution d'un seul acide aminé.

Six hémoglobines différentes ont été identifiées. Quatre sont décrites dans la littérature : hémoglobine Yaoundé (29 patients de cette étude), hémoglobine Beirut (17 patients), hémoglobine Franklin Park (1 patient), hémoglobine Athens-Georgia (1 patient).

Deux ne sont pas décrites actuellement : beta 45(CD4) Phe>Leu et beta 123(H1) Thr>Ala (1 patient chacune) (**Tableaux 8 et 9**).

Liste complète de résultats en annexe (**Annexe 2**).

	Hb Yaoundé	Hb Beirut	Autres				Total
			Hb Franklin-Park	Hb Athens-Georgia	Hb B45 Phe>Leu	Hb B123 Thr>Ala	
Nombre	29	18	1	1	1	1	51
Pourcentage	57	35	8				100

Tableau 8 : Variants d'hémoglobine retrouvés, fréquences.

Nom	Mutation	Nomenclature HGVS	Position de la mutation	Différence de masse (Da)
Hb S	beta 6(A3) Glu>Val	HBB:c.20A>T	Externe	-30
Hb Yaoundé	beta 134(H12) Val>Ala	HBB:c.404T>C	Interne (cavité centrale)	-28
Hb Beirut	beta 126(H4) Val>Ala	HBB:c.380T>C	Externe	-28
Hb Franklin Park	beta 2(NA2) His>Asn	HBB:c.7C>A	Site de liaison au 2,3-DPG	-23
Hb Athens-GA	beta 40(C6) Arg>Lys	HBB:c.122G>A	Contact $\alpha_1\beta_2$	-28
Hb B45 Phe>Leu	beta 45(CD4) Phe>Leu	HBB:c.136T>G	Contact hème	-34
Hb B123 Thr>Ala	beta 123(H1) Thr>Ala	HBB:c.370A>G	Externe (contact $\alpha_1\beta_1$)	-30

Tableau 9 : Variants d'hémoglobine retrouvés : caractéristiques générales.

II. Différents cas

A. FAS > FA

Un variant X (chaîne β^X , HbX) associé à une Hb normale (chaîne β , HbA) est à l'origine du profil de discordance « FAS > FA » présenté en **Figure 25A-B**.

Le séquençage du gène HBB met en évidence un variant d'Hb à l'état hétérozygote (**Figure 25C**, exemple du variant Yaoundé).

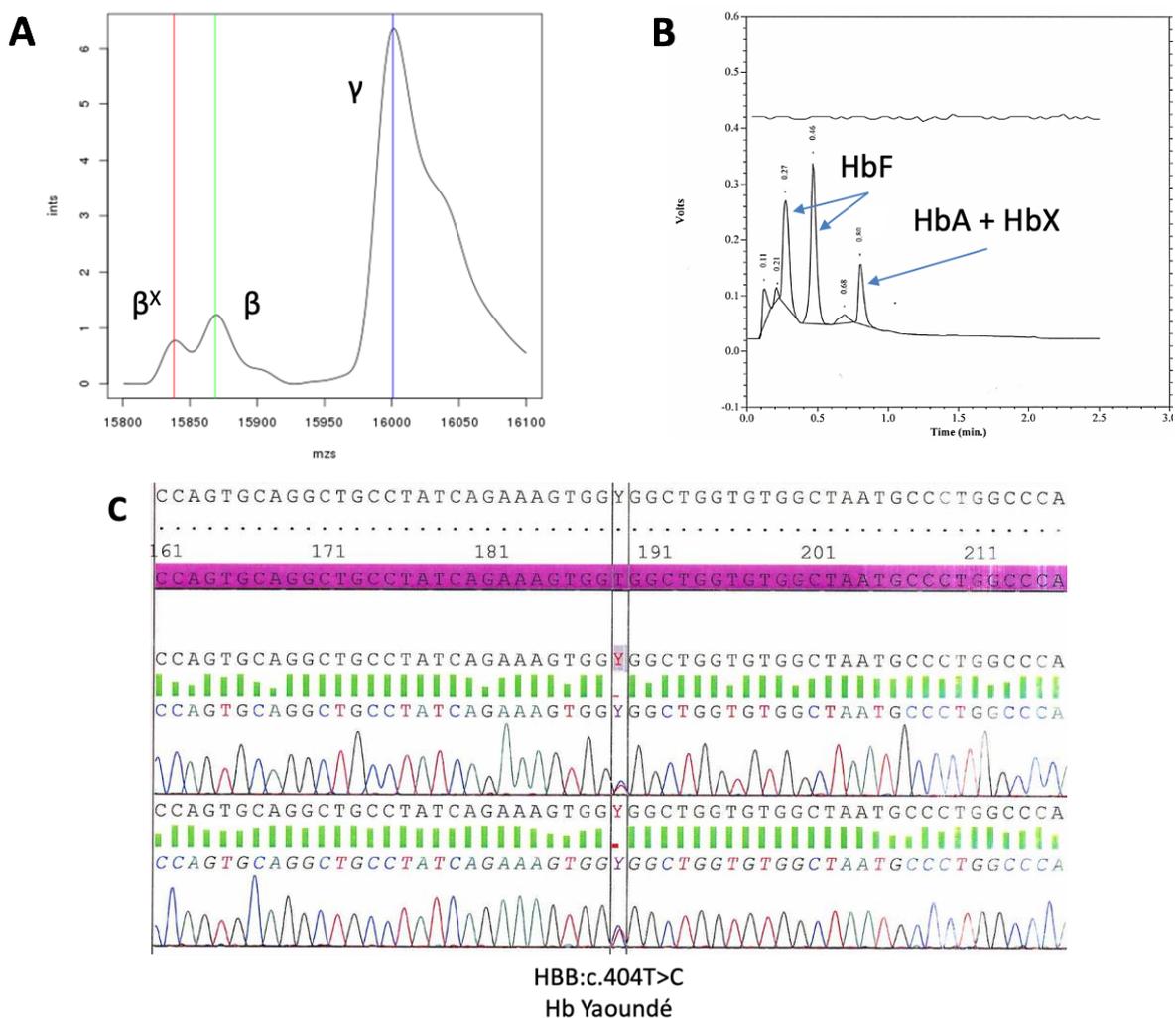
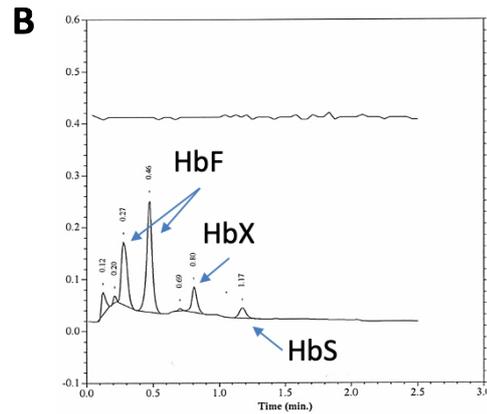
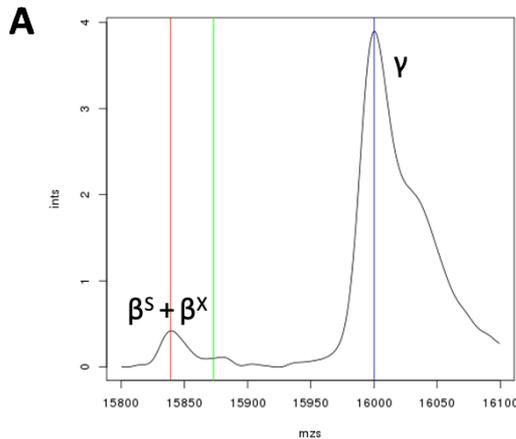


Figure 25 : Cas de discordance « FAS > FA » observé dans l'étude. A. Spectre MALDI-TOF. B. Chromatogramme CLHP-EC. C. Résultat de séquençage du gène HBB pour le variant Yaoundé.

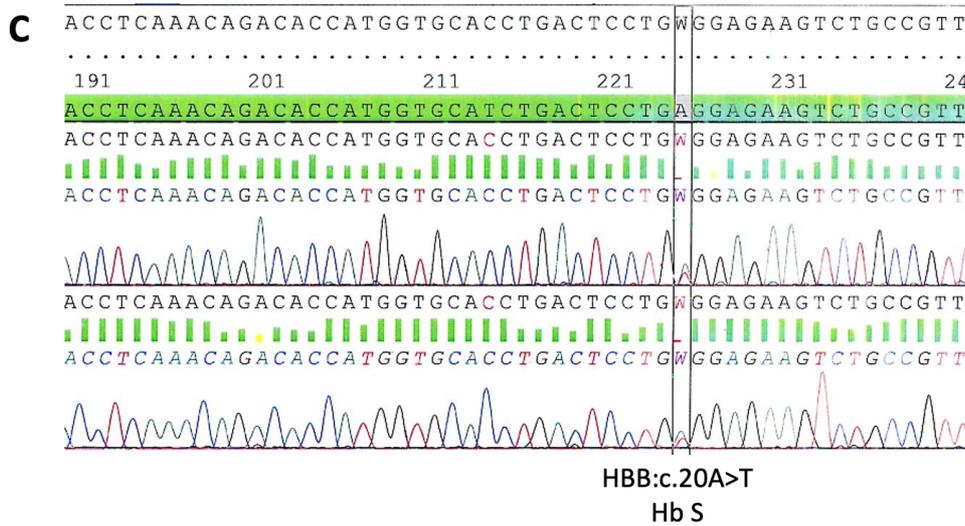
B. FS > FAS

Un variant X (chaîne β^X , HbX) associé à une hémoglobine S (chaîne β^S , HbS) est à l'origine du profil de discordance « FS > FAS » présenté en **Figure 26A-B**.

Le séquençage du gène HBB met en évidence deux variants : l'HbX et l'HbS (**Figure 26C-D**, exemple d'une association Yaoundé/S).



HbX : migration identique à l'HbA



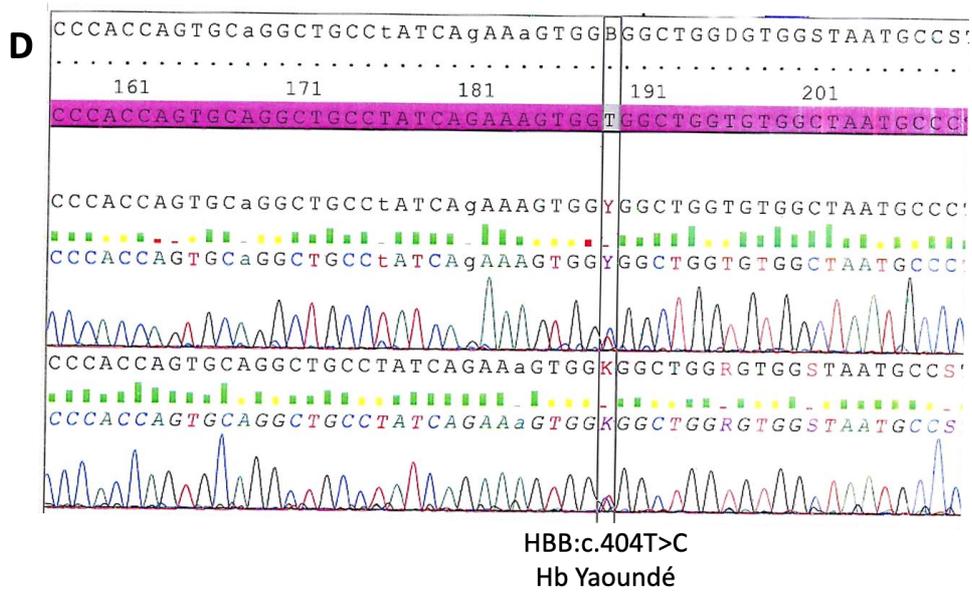
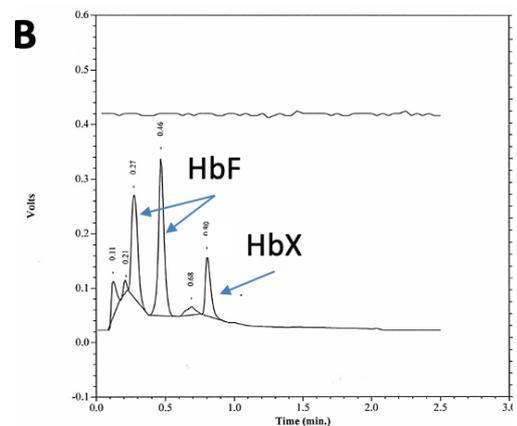
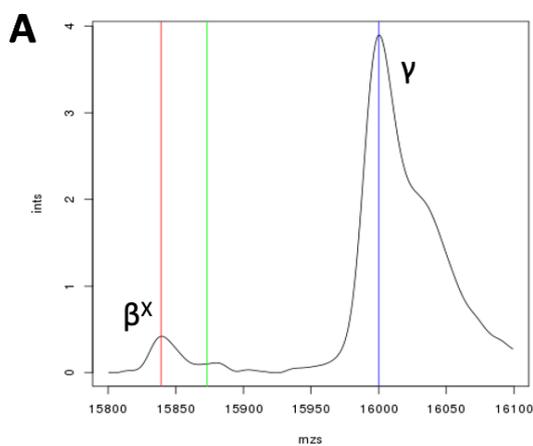


Figure 26 : Cas de discordance « FS > FAS » observé dans l'étude. A. Spectre MALDI-TOF. B. Chromatogramme CLHP-EC. C et D. Résultats de séquençage du gène HBB pour l'association Yaoundé/S.

C. FS > FA

Un variant X (chaîne β^X , HbX) associé à une β^0 thalassémie est à l'origine du profil de discordance « FS > FA » présenté en **Figure 27A-B**.

Le séquençage du gène HBB a mis en évidence deux mutations : le variant d'HbX et un codon stop en position 39 (**Figures 27C-D**), exemple d'une association Beirut/ β^0 .



HbX : migration identique à l'HbA

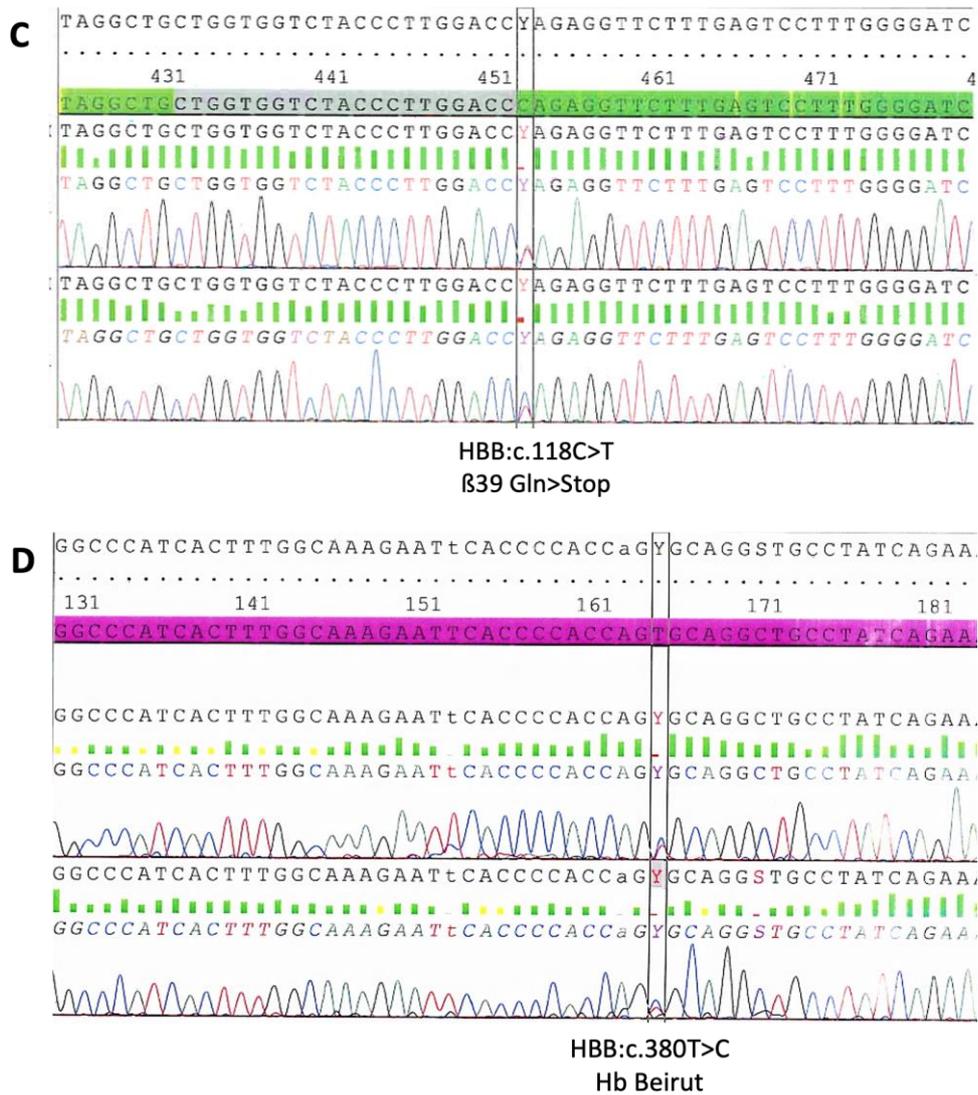


Figure 27 : Cas de discordance « FS > FA » observé dans l'étude. A. Spectre MALDI-TOF. B. Chromatogramme CLHP-EC. C et D. Résultats de séquençage du gène HBB pour l'association Beirut/β⁰.

III. Description des variants d'hémoglobine rencontrés

A. Hb Yaoundé

Sur les 51 échantillons analysés, l'hémoglobine Yaoundé a été retrouvée à l'état hétérozygote chez 29 patients. Elle n'a pas été retrouvée à l'état homozygote et chez un nouveau-né elle était associée à l'HbS. C'est le variant le plus fréquent de cette étude.

L'hémoglobine Yaoundé (beta 134 (H12) Val>Ala), aussi appelée hémoglobine Mataro, est caractérisée par la modification du 134^e acide aminé de la chaîne bêta de globine d'une valine vers une alanine. Ceci entraîne une perte de masse de 28 Da.

L'étude structurale montre que la position 134 est orientée à l'intérieur de la molécule, au niveau de la cavité centrale et est en contact avec d'autres résidus hydrophobes. La géométrie de la région ne semble pas altérée par le changement d'une valine à une alanine, les deux acides aminés ayant une chaîne aliphatique de taille similaire et sont tous 2 apolaires (83,84).

Ce variant a été jusqu'à présent décrit uniquement à l'état hétérozygote, chez des patients originaires d'Afrique et d'Europe (Portugal et Sicile) ; seule (85) ou en association avec l'Hb Kenitra (83), l'Hb C (84) ou une triplication alpha $\alpha\alpha^{3.7}$ (86).

La littérature reporte le variant comme neutre en CLHP-EC et isoélectrofocalisation (83,84). Un comportement neutre en électrophorèse capillaire a également été noté au sein de notre laboratoire chez un adulte.

Sa mise en évidence par Yapo *et al* a été fortuite, l'étude en spectrométrie de masse ESI a révélé une chaîne d'une masse de -28 Da par rapport à la chaîne bêta. Le variant a été identifié par une combinaison de CLHP échangeuse de cations, de CLHP en phase inverse après digestion enzymatique à la trypsine et de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (83). Le variant a été caractérisé par biologie moléculaire par Faustino *et al*. (84).

Le test d'instabilité sur un échantillon hétérozygote Yaoundé s'est avéré négatif, ce qui va dans le sens d'un variant stable (84). L'affinité pour l'oxygène n'a pas été étudiée.

Les données biologiques et cliniques des patients dans la littérature n'ont pas montré de conséquences hématologiques du variant à l'état hétérozygote lorsqu'il est associé à une hémoglobine stable.

Il n'a pas été décrit en association avec l'hémoglobine S mais ce cas de figure a été observé dans notre laboratoire.

- Étude de cas d'hétérozygote S/Yaoundé au laboratoire : Me U.

La patiente enceinte a bénéficié d'une étude de l'hémoglobine dans le cadre d'une consultation prénatale.

L'étude de l'hémoglobine a montré une hémoglobine S à 43% (CLHP, Tosoh G8) et une hémoglobine présumée A dans les 3 systèmes d'étude. Le taux d'HbS trop élevé pour un trait

drépanocytaire AS a orienté vers une étude complémentaire des gènes de globine par biologie moléculaire, qui a mis en évidence l'HbS associée à l'Hb Yaoundé.

Au niveau biologique, la patiente présentait une anémie modérée normocytaire normochrome (entre 9 et 11 g/dl d'Hb), compatible avec une anémie physiologique de dilution liée à la grossesse (**Tableau 10**).

La patiente a été suivie pour 2 grossesses au sein du CHU de Lille, pour lesquelles aucune complication n'a été notée.

Leucocytes	9.32 G/L (4.0-10.0)
Érythrocytes	3.63 T/L (3.8-5.8)
Hémoglobine	10.1 g/dL (12.0-16.0)
Hématocrite	30.3 % (37-47)
VGM	83.5 fl (82-98)
TCMH	27.5 pg (27-32)
CCMH	33.3 g/dL (32-36)
Numération plaquettaire	198 G/L (150-400)

Tableau 10 : Numération globulaire en pré-partum immédiat de Me U. Entre parenthèses : valeurs de référence.

B. Hb Beirut

L'hémoglobine Beirut est un variant qui a été retrouvé 18 fois à l'état hétérozygote dans cette étude suite au séquençage du gène de bêta globine. Dans un cas elle était associée à une β^0 thalassémie (génotype Beirut/ β^0) suite à un codon stop en position 39 (Gln39*). C'est le 2^e variant le plus fréquent dans cette étude.

Pour l'Hb Beirut (beta 126 (H4) Val>Ala), il s'agit à nouveau d'une substitution d'une valine par une alanine (deux AA apolaires), cette fois en position 126 de la chaîne bêta globine. Il y a une perte de masse de 28 Da. Structuralement, la position 126 de la chaîne bêta correspond à une crevasse de surface, sur une localisation qui n'est pas impliquée dans le contact inter-chaînes ou la liaison à l'hème (87).

Ce variant n'a été décrit dans la littérature qu'à l'état hétérozygote, dans une famille libanaise (87) et une famille originaire du Maghreb (88).

Cette hémoglobine a un comportement neutre par les techniques d'électrophorèse sur acétate de cellulose, électrophorèse sur citrate d'agar et CLHP échangeuse de cations ou

d'anions. Elle a pu être séparée par CLHP à phase inverse et par isoélectrofocalisation à gradient de pH immobilisé (87,89).

Les études de stabilité (test à l'isopropanol) et d'affinité pour l'oxygène (PO₂50) sont normales (88).

Les cas reportés (87,88) ne notent aucune particularité clinique ou hématologique.

C. Hb Franklin Park

L'hémoglobine Franklin Park (beta 2 (NA2) His>Asn) a été retrouvée à l'état hétérozygote à une reprise.

En position 2 de la chaîne bêta globine, l'histidine (charge positive) est substituée par une asparagine (polaire mais non chargée), ce qui cause une perte de charge.

On note que l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF donne un spectre interprété « FAS » mais que le pic de chaîne bêta mutée est légèrement en amont de la position des chaînes β^s, cohérent avec le fait que la chaîne mutée de l'Hb Franklin Park ait une différence de masse de -23 Da, contre -30 pour l'HbS.

Sur notre automate de CLHP-EC Variant-NBS (Bio-Rad), l'Hb Franklin Park co-élueait avec l'HbA, apparaissant donc neutre. *Kim et al* ont rencontré ce variant dans le cadre d'un dosage d'hémoglobine glyquée, et bien qu'interférant avec ce dosage, le variant était séparable de l'HbA dans deux systèmes de CLHP-EC (Variant II et D-10, Bio-Rad) et en électrophorèse en citrate d'agar, mais pas en électrophorèse sur acétate de cellulose (90).

La patiente présentant l'Hb Franklin Park (90) n'était pas anémiée et avait des indices érythrocytaires normaux. La stabilité est donnée comme normale (91), sans information sur l'affinité pour l'oxygène.

La mutation est localisée sur un site de liaison avec le 2,3-DPG, l'altération de ce site pouvant donc conduire à une altération de l'affinité pour l'oxygène. Pour d'autres variants d'hémoglobine à la même position (Hb Fukuoka, Hb Graz, Hb Deer Lodge, Hb Okayama) (92,93), une hyperaffinité pour l'oxygène a pu être notée, sans répercussions cliniques à l'état hétérozygote.

D. Hb Athens-Georgia

Ce variant a été identifié une fois à l'état hétérozygote lors de cette étude.

L'Hb Athens-Georgia (beta 40 (C6) Arg>Lys), aussi appelée Hb Waco, a été décrite à plusieurs reprises chez des patients caucasiens. *Mrad et al* décrit un cas d'association avec une β^0 thalassémie (94). L'arginine en position 40 est substituée par une lysine. Les deux résidus sont chargés positivement avec une taille relative légèrement plus faible pour la lysine. La position 40 est fortement conservée entre les espèces (95). La perte de masse est de 28 Da.

La position 40 sur l'hélice C se situe dans la zone de contact $\alpha_2\beta_2$. Cette zone est impliquée à la fois dans le réarrangement qui a lieu lors du passage entre les formes oxygénées et désoxygénées ; et dans la dissociation du tétramère en dimère (94–96).

L'affinité pour l'oxygène est normale à haute concentration en O_2 et en Hb. La dissociation en dimère est augmentée par rapport à l'HbA et cette forme dimérique présente une affinité anormale pour l'oxygène. Cependant cette forme est minoritaire (94).

Le variant est séparable dans plusieurs systèmes d'électrophorèse (capillaire, sur citrate d'agar et sur acétate de cellulose) mais pas en chromatographie liquide (échangeuse de cations et à phase inverse) (96,97). Les observations dans notre laboratoire le corroborent. En effet, le profil en CLHP-EC du nouveau-né de l'étude ne montre pas de séparation avec l'HbA, tandis que sur électrophorèse capillaire le pic d'HbA est dédoublé. Le profil observé au spectromètre de masse MALDI-TOF est strictement identique au profil de référence FAS (différence de masse de même ordre de grandeur qu'avec l'HbS).

Aucun patient hétérozygote décrit n'a présenté de symptomatologie en lien avec le variant, avec un hémogramme strictement normal. Le cas d'association Hb Athens-Georgia/ β^0 , ne rapporte pas d'aggravation du trait bêta thalassémique par le variant (94–96).

- Étude de cas d'hétérozygote Athens-Georgia/S au laboratoire : Mr B. A.

Mr B. A. est d'origine Franco-Maghrébine. L'HbS a été découverte fortuitement chez ce patient dans le cadre d'une étude familiale pour exploration d'un variant Athens-Georgia dans la descendance.

La présence d'un variant neutre associé à l'HbS a été évoquée devant :

- L'histoire familiale : le variant Athens-Georgia avait été confirmé chez son fils par séquençage du gène bêta globine.
- L'aspect du pic à l'électrophorèse capillaire : pic migrant à l'emplacement de l'HbA mais présentant une asymétrie (**Figure 28**). La CLHP et l'IEF montraient un pic d'HbA sans particularité.

Le séquençage a confirmé le variant Athens-Georgia.

A 65 ans ce patient n'a jamais présenté de symptomatologie évoquant une hémoglobinopathie. Son hémogramme est normal (**Tableau 11**). Le taux d'HbS est sans particularité pour un patient hétérozygote (**Figure 28**).

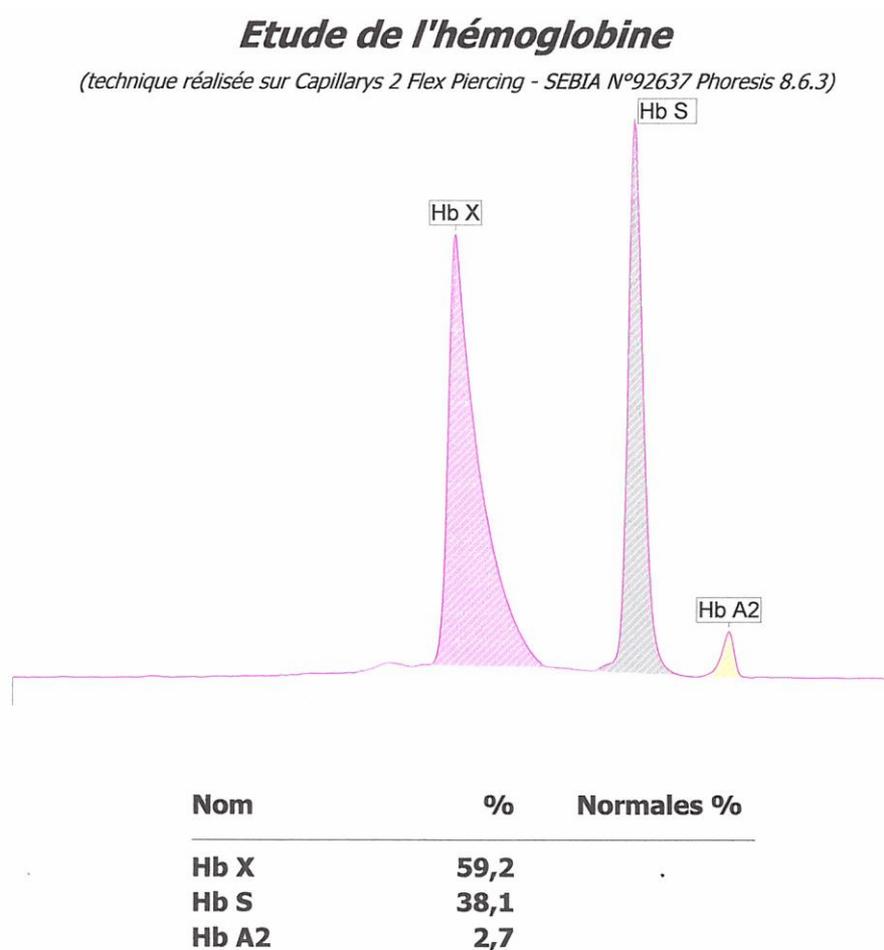


Figure 28 : Électrophorèse de l'hémoglobine (Mr B. A.)

Leucocytes	6.46 G/L (4.0-10.0)
Érythrocytes	4.71 T/L (4.5-6.5)
Hémoglobine	13.5 g/dL (13.0-17.0)
Hématocrite	39.1 % (40-52)
VGM	83.0 fl (82-98)
TCMH	28.7 pg (27-32)
CCMH	34.5 g/dL (32-36)
Numération plaquettaire	237 G/L (150-400)
Réticulocytes	127 G/L (20-120) ; 2.69 %
Morphologie érythrocytaire	Normale

Tableau 11 : Numération globulaire et taux de réticulocytes de Mr B. A. Normes biologiques entre parenthèses.

E. Hb β 45 Phe>Leu

Pour un nouveau-né une mutation non décrite a été retrouvée en position 45 de la chaîne bêta globine. Une phénylalanine est substituée par une leucine, avec une différence de masse de -34 unités. La mutation se trouve dans une zone de contact avec l'hème (coude CD4). L'analyse par CLHP-EC (Variant-NBS, Bio-Rad) était normale.

D'autres hémoglobines sont issues de substitutions en position 45 : Hémoglobines Duc Pho (beta 45 Phe>Val), Cheverly (beta 45 Phe>Ser), Arta (beta 45 Phe>Cys) et Den Haag (beta 45 Phe>Tyr) (1).

Ces quatre variants ont en commun d'être neutres dans la plupart des systèmes de séparation. Ils sont instables et d'affinité réduite pour l'oxygène (pas de données biochimiques pour l'Hb Den Haag). A l'état hétérozygote ils sont fréquemment associés avec une anémie chronique légère, voir une cyanose légère. Cependant dans un cas décrit d'association Hb Arta/ β^0 thalassémie (98), l'anémie est modérée et davantage marquée que pour une Hb Arta ou un trait thalassémique seul.

F. Hb β 123 Thr>Ala

Le séquençage a mis en évidence une mutation en position 123 de la chaîne bêta globine pour un échantillon, résultant en la substitution d'une thréonine par une alanine. Cette mutation n'est pas référencée dans la base de données HbVar. La perte de masse est de 30 unités.

La mutation est localisée sur la face externe de la chaîne de globine (hélice H1), zone de contact $\alpha_1\beta_1$. Deux variants ont été décrits à la position 123 : Hb Ern2 (b123 Thr>Asn) et Hb Villejuif (b123 Thr>Ile) (70,99). Ce sont deux variants neutres, sans modifications fonctionnelles ni symptomatologie associée, malgré un changement de polarité de l'AA pour l'Hb Villejuif. Il y a également un changement de polarité pour la mutation retrouvée dans notre étude.

IV. Vérification par électrophorèse capillaire

Après identification par biologie moléculaire, certains échantillons ont été analysés par technique d'électrophorèse capillaire (Capillarys 2 Neonat Fast, Sebia).

L'objectif était de vérifier la migration électrophorétique pour les variants décrits neutres et d'explorer l'apport de cette technique pour un variant non décrit (B45 Phe>Leu).

6 échantillons de notre collection ont été contrôlés, les résultats sont présentés dans le **tableau 12**. Il n'y a pas de séparation du variant et de l'HbA sauf pour l'Hb Athens-Georgia, qui migre entre le pic d'HbA et d'HbF.

Échantillon	Variant	Profil	Commentaire
9	Hb Yaoundé	FA	Pas de séparation
27	Hb Yaoundé	FA	Pas de séparation
31	Hb Beirut	FA	Pas de séparation
32	Hb Beirut	FA	Pas de séparation
35	Hb B45 Phe>Leu	FA	Pas de séparation
36	Hb Athens-Georgia	FAX	Séparation (HbX migre entre HbA et HbF)

Tableau 12 : Résultats de l'analyse par électrophorèse capillaire d'une sélection d'échantillons.

V. Évaluation de la fréquence des discordances

Le nombre de discordances entre les techniques de spectrométrie de masse MALDI-TOF et de CLHP impliquant un variant de masse identique à l'HbS est estimé à 123 par an. Ceci représente une fréquence de 2,5% des échantillons envoyés en confirmation (**Tableau 13**).

Nombre d'échantillons envoyés en confirmation (21/02/19 au 30/10/2020)	8330	Nombre de discordances (21/02/19 au 21/08/19)	56
Nombre d'échantillons envoyés en confirmation (moyenne par an)	4836	Nombre de discordances (reporté à 1 an)	123
		Fréquence des discordances parmi les échantillons envoyés en confirmation	2,5 %

Tableau 13 : Relevé du nombre de discordances parmi les échantillons envoyés pour confirmation par CLHP.

DISCUSSION

I. Signification des discordances retrouvées

A. Variants neutres d'hémoglobines

Dans chaque cas sélectionné un variant d'hémoglobine a été retrouvé. Ces variants ont tous un comportement neutre dans un ou plusieurs systèmes de séparation de l'hémoglobine.

Pour les variants connus (Hb Yaoundé, Beirut, Franklin Park, Athens-Georgia), les profils de spectrométrie de masse et de CLHP sont concordants avec les données de la littérature :

- Leur masse est proche de celle de l'Hb S,
- Ce sont des variants de migration neutre qui co-éluent avec l'HbA en CLHP-EC.

Pour les échantillons de notre collection contrôlés en électrophorèse capillaire, les Hb Yaoundé et Beirut ont co-élué avec l'HbA, alors que l'Hb Athens-Georgia est séparable de la fraction d'HbA. Ces résultats confirment ceux décrits dans la littérature. Pour l'Hb Athens-Georgia, Wils *et al.* observe également une séparation en électrophorèse capillaire (97). Chez le patient adulte suivi au CHU de Lille, le pic présentait une asymétrie évocatrice d'un variant.

Concernant les variants non recensés dans les bases de données, B45 Phe>Leu et B123 Thr>Ala :

- Leur masse est également proche de l'Hb S, confirmant le profil de spectrométrie de masse,
- Leur faible modification de charge peut expliquer le comportement neutre observé en CLHP-EC et en électrophorèse capillaire.

B. Diversité des variants

92% des variants retrouvés dans cette étude correspondent à 2 variants neutres. Ces deux variants sont donc probablement relativement fréquents en population générale. Il n'existe cependant pas de données sur la fréquence de ces variants dans la littérature car leur mise en évidence est difficile et souvent fortuite.

La présence de 4 autres variants dans cette étude souligne néanmoins la grande diversité des variants neutres. On ne peut restreindre les variants issus de ces discordances aux 2 seuls variants majoritaires.

L'identification de 2 variants non répertoriés est surprenante en comparaison du nombre de patients inclus, et attire l'attention sur la multitude de variants d'hémoglobine encore inconnus. Il est probable qu'une étude plus large mettrait en évidence des variants connus et inconnus supplémentaires.

C. Impact clinique

Hb Yaoundé et Beirut

Pour les deux hémoglobines majoritaires Yaoundé et Beirut, aucune des sources étudiées n'a mis en évidence de symptomatologie liée au variant, à l'état hétérozygote ou en association.

Dans le cas d'association Yaoundé/Hb S rencontré dans notre laboratoire, aucune manifestation clinique n'était à relier à l'Hb Yaoundé. Ceci est corroboré par des descriptions d'associations de l'Hb Yaoundé à une autre hémoglobinopathie : par Faustino *et al* (84) (associé à l'Hb C), Vinciguerra *et al* (86) (associé à une triplification alpha), ou par Yapo *et al* (83) (associé à l'Hb Kenitra).

Le cas d'hétérozygotie composite Beirut/ β^0 (nouveau-né de notre étude) présentera vraisemblablement un phénotype similaire à un trait bêta thalassémique sans aggravation liée à la présence d'Hb Beirut.

Il s'agit donc de variants silencieux seuls et en association avec des hémoglobines stables.

Hb Franklin Park

Un cas reporte l'Hb Franklin Park (Kim *et al.* (90)) et ne retrouve aucune particularité clinique ou hématologique. La mutation est localisée sur un site de liaison avec le 2,3-DPG, l'altération de ce site peut donc conduire à une altération de l'affinité pour l'oxygène. Pour d'autres variants d'hémoglobine à la même position (92,93), une hyperaffinité est notée, sans répercussions cliniques à l'état hétérozygote.

Devant les données restreintes (1 seul cas clinique) et la position de la mutation (sensible à l'affinité avec l'oxygène), ce variant ne peut donc pas être qualifié de silencieux avec certitude.

Homozygote, associé à un autre variant hyperaffin ou d'autres mutations héréditaires ou acquises, l'Hb Franklin Park pourrait aggraver la symptomatologie.

Hb Athens-Georgia

Malgré la localisation de la substitution dans une zone de haute importance, le variant ne présente que des modifications mineures de ses propriétés biochimiques, probablement en lien avec la similarité entre les deux résidus impliqués. Ceci ne semble pas avoir de répercussions cliniques, même associé à une β^0 thalassémie (94) ou à l'Hb S (patient suivi au CHU de Lille).

Hb B45 Phe>Leu

Les variants connus en même position ont été décrits hypoaffins et sont fréquemment associés à une anémie chronique légère, voir une cyanose légère. De plus, le cas d'association Hb Arta/ β^0 thalassémie étudié par Vassilopoulos *et al.* (98), reporte une anémie modérée, davantage marquée que pour une Hb Arta ou un trait thalassémique seul.

Il est probable que le variant retrouvé dans cette étude présente des caractéristiques similaires aux autres variants hypoaffins instables, qui sont généralement asymptomatiques à l'état hétérozygote et sans prise en charge nécessaire. Toutefois l'association avec un autre variant peut entraîner une majoration de l'anémie.

Hb B123 Thr>Ala

Les cas précédemment décrits de mutation à cette position laissent à penser que ce variant sera également silencieux et sans altérations fonctionnelles, malgré un changement de polarité. Par extension, une association avec un autre variant n'aggraverait probablement pas le phénotype.

En prenant en compte l'ensemble des cas retrouvés dans notre étude et la possibilité de rencontrer d'autres variants avec le même profil de discordance : les variants silencieux prédominent très largement bien qu'un variant pathologique ne puisse jamais être exclu. De plus, l'association avec un autre variant, notamment instable, ne peut exclure un effet délétère.

Un conseil génétique pour les couples à risque, avec une étude des gènes de globine peut être conseillée en fonction des résultats hématologiques et de l'étude de l'hémoglobine (particulièrement avec un taux d'HbA2 limite ou un variant de l'hémoglobine détecté).

II. Apports de l'étude, applications

A. Apport à l'interprétation du dépistage néonatal

Ce travail apporte la confirmation qu'un variant d'hémoglobine est à l'origine des discordances analytiques jusqu'à présent inexplicables. Ces discordances sont fréquemment rencontrées (2,5% des échantillons envoyés en confirmation, évalué à 120 cas par an) et posaient problème à l'interprétation.

Grâce à cette information, pour tous les cas similaires à venir, la discordance est interprétée comme un variant neutre.

Devant un cas doublement discordant (FS > FA), les nouvelles informations apportées par cette étude montrent qu'il s'agit soit d'un variant neutre à l'état homozygote, soit d'une association variant neutre/ β^0 thalassémie.

Le résultat rendu est à adapter au cas par cas, en fonction du profil de discordance observé et de la présence d'un autre variant associé. Par exemple, il peut être davantage pertinent de signaler le variant si l'enfant est hétérozygote composite sans Hb normale (ex : variant neutre/Hb S) que s'il est hétérozygote variant neutre /Hb A.

B. Intérêt clinique et intérêt secondaire du dépistage néonatal

L'étude n'a pas retrouvé de variant décrit avec certitude comme pathologique à l'état hétérozygote. Néanmoins l'association à l'état hétérozygote composite augmente le risque d'être cliniquement significatif.

Dans la pratique de routine du dépistage néonatal, un rendu de résultat mentionnant une hémoglobine X permet d'alerter le prescripteur pour déboucher vers une consultation et une étude de l'hémoglobine. La plupart de ces variants étant neutres, un génotypage va s'avérer nécessaire.

Si à l'inverse le dépistage est rendu « normal », cela peut éviter un stress supplémentaire pour la famille dans l'attente des résultats complémentaires.

L'objectif de ce dépistage néonatal est de repérer les syndromes drépanocytaires majeurs, il n'y a donc aucune obligation de signaler les autres variants. Ceci est laissé à l'appréciation du biologiste, en concertation avec les cliniciens qui prendront en charge les enfants atteints.

III. Limites de l'étude

A. Limitations liées à l'échantillon

Les échantillons de travail étaient en quantité limitée. Certains ont dû être exclus faute de matériel suffisant, limitant la population d'étude. Cette limite est contournée par la fréquence des cas, qui a permis de rassembler plus de 50 échantillons compatibles avec l'analyse.

Du fait de la nature du prélèvement, l'ADN est de basse qualité et en quantité faible. Ceci est à l'origine d'échecs lors de l'amplification ou du séquençage. En adaptant la technique d'extraction et en apportant des modifications au protocole utilisé pour le sang liquide, il a été possible d'obtenir des résultats interprétables pour chacun des échantillons étudiés.

A cause de la faible quantité d'ADN, nous nous sommes limités au séquençage du gène HBB. Ceci s'est avéré suffisant. Tous les variants explorés sont des variants bêta et aucune discordance n'est restée inexplicée.

B. Influence de la population sélectionnée sur les variants retrouvés

Le dépistage néonatal de la drépanocytose est ciblé selon l'origine géographique des parents. Ceci induit un biais dans la nature et la fréquence des variants retrouvés.

Une étude bibliographique de ces variants, bien que peu décrits du fait de leur absence de retentissement clinique, retrouve effectivement des origines géographiques superposables aux populations ciblées par le dépistage néonatal de la drépanocytose. L'Hb Beirut est décrite dans une famille algérienne, alors que l'Hb Yaoundé est retrouvée à plusieurs reprises en Afrique.

D'autres variants neutres décrits dans la littérature mais non retrouvés dans cette étude correspondent en théorie au même profil de discordance (ex : Hb Zoeterwoude).

L'Hb Zoeterwoude est décrite chez une femme d'origine néerlandaise (100), l'Hb Djelfa chez des caucasiens, populations effectivement non couvertes par le dépistage.

Nous ne pouvons pas évaluer si leur absence résulte d'une fréquence faible ou d'un biais de sélection.

C. Limitations liées à l'absence de données cliniques

Les échantillons étant anonymisés, nous ne pouvons pas obtenir d'informations cliniques sur les nouveau-nés. De plus, un retentissement clinique devrait s'évaluer grâce à un suivi de plusieurs années, qui ne rentre pas dans le cadre de cette étude.

C'est pourquoi, pour évaluer l'impact clinique, nous nous sommes majoritairement tournés vers les données de la littérature. Elles ont été informatives dans la plupart des cas mais restent limitées. Peu de cas sont décrits, encore moins concernent les associations de variants. Pour les variants non décrits, les informations sont extrapolées à partir de variants similaires. Pour toutes ces raisons, les informations regroupées donnent des pistes sur l'impact du variant sans pouvoir apporter de certitude.

D. L'étude ne s'applique qu'à une forme de discordance

D'autres profils de discordance sont retrouvés. Ils n'ont pas été étudiés ici car dans un premier temps il était plus pertinent d'examiner les discordances liées à des variants de masse similaire à l'Hb S. Ce sont ces discordances qui posent le plus de problèmes lors de l'interprétation puisqu'elles sont les plus fréquentes et qu'elles miment le variant β^s , celui ciblé par le dépistage.

Une étude plus large avec une plus grande diversité de profils de discordance est prévue dans un prochain travail.

CONCLUSION

L'objectif principal de l'étude était l'exploration des discordances retrouvées entre les techniques de spectrométrie de masse MALDI-TOF et de chromatographie liquide haute performance, dans le cadre du dépistage néonatal de la drépanocytose. La fréquence de tels cas est significative.

Le séquençage du gène bêta globine HBB a mis en évidence des variants neutres d'hémoglobine qui sont à l'origine de ces discordances.

Ces variants sont asymptomatiques dans la majorité des cas, mais certains peuvent potentiellement être à l'origine d'anémie ou de polyglobulie, notamment s'ils sont associés à d'autres variants d'hémoglobine.

Ce travail apporte une compréhension supplémentaire face à des discordances analytiques jusqu'à présent inexplicables. Toute discordance retrouvée dans le cadre du dépistage néonatal doit appeler à la prudence.

Dans l'état actuel des connaissances, on ne peut pas justifier d'un signalement systématique de ces variants, qui pourrait être source d'anxiété inutile pour les familles. Aujourd'hui, au même titre que l'HbC, ils ne sont pas signalés. Cette position sera revue si de nouvelles données le justifient.

Les discordances étudiées dans ce travail ne concernent qu'une partie des discordances observées. D'autres profils de discordance plus complexes, moins fréquents, mais tout aussi problématiques à l'interprétation seront explorés dans un prochain travail. L'objectif étant d'affiner l'interprétation des résultats du dépistage néonatal de la drépanocytose et de rechercher des variants d'intérêt médical.

BIBLIOGRAPHIE

1. HbVar [Internet]. [cited 2020 May 25]. Available from: <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>
2. Centre National de Coordination du Dépistage Néonatal. Rapport d'activité, programme national du dépistage néonatal. Année 2019. 2019.
3. 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*. 2011 Aug;5(7–8):405–14.
3. Wilson JMG, Jungner G, Organization WH. Principles and practice of screening for disease. 1968
4. Guessous I, Gaspoz JM, Paccaud F, Cornuz J. Dépistage : principes et méthodes. *Revue Médicale Suisse*. 2010
6. Roussey M. Les principes et l'organisation du dépistage néonatal en France. *Arch Pédiatrie*. 2008 Jun 1;15(5):734–7.
7. Haute Autorité de Santé. Rapport d'orientation. Dépistage néonatal de la drépanocytose en France. Pertinence d'une généralisation du dépistage à l'ensemble des nouveau-nés. 18 Déc 2013. :130.
8. Pollitt RJ. Different Viewpoints: International Perspectives on Newborn Screening. *J Med Biochem*. 2015 Jan;34(1):18–22.
9. Haute Autorité de Santé. Évaluation a priori de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs erreurs innées du métabolisme par spectrométrie de masse en tandem. Volet 2 [Internet]. 2020 [cited 2020 May 10]. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2866458/fr/evaluation-a-priori-de-l-extension-du-depistage-neonatal-a-une-ou-plusieurs-erreurs-innees-du-metabolisme-par-spectrometrie-de-masse-en-tandem-volet-2
10. Pauling L, Itano HA. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*. 1949 Nov 25;110(2865):543–8.
11. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primer*. 2018 15;4:18010.
12. Ochocinski D, Dalal M, Black LV, Carr S, Lew J, Sullivan K, et al. Life-Threatening Infectious Complications in Sickle Cell Disease: A Concise Narrative Review. *Front Pediatr*. 2020;8:38.
13. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963 Sep;32:338–43.
14. Bickel H, Gerrard J, Hickmans E. Preliminary Communication. *The Lancet*. 1953 Oct 17;262(6790):812–3.

15. Dhondt J-L, Farriaux J-P. La fabuleuse histoire du dépistage néonatal. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2000 Jun 9;58(3):267–76.
16. Allaf B, Couque N, De Montalembert M. Newborn screening of sickle cell disease and management of care. *Rev Prat*. 2019;69(4):411–6.
17. Haute Autorité de Santé. Évaluation de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs erreurs innées du métabolisme par spectrométrie de masse en tandem. 1er volet: déficit en MCAD [Internet]. 2011 [cited 2020 May 10]. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_1069254/fr/evaluation-de-l-extension-du-depistage-neonatal-a-une-ou-plusieurs-erreurs-innees-du-metabolisme-par-spectrometrie-de-masse-en-tandem-1er-volet-deficit-en-mcad
18. Arrêté du 22 février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale.
19. Roussey M, Delmas D. Plus de 40 ans de dépistage néonatal en France : des données épidémiologiques majeures pour plusieurs maladies rares. *Bull Epidemiol Hebd*. 2015;(15-16):230-8. :9.
20. Appel à candidatures 2017. Création du Centre National de Coordination du Dépistage Néonatal. [Internet]. [cited 2020 May 25]. Available from: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/appel_a_candidatures_cncdn.pdf
21. Lehmann S, Delaby C, Vialaret J, Ducos J, Hirtz C. Current and future use of “dried blood spot” analyses in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Oct;51(10):1897–909.
22. Corne C, Faure P. Le dépistage néonatal en France : approche biologique. *Rev Francoph Lab*. 2018 Mar 1;2018(500):30–5.
23. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr*. 2001 May;131(5):1631S-6S.
24. Wagner M, Tonoli D, Varesio E, Hopfgartner G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrom Rev*. 2016 Jun;35(3):361–438.
25. Makowski GS, Davis EL, Hopfer SM. The effect of storage on Guthrie cards: implications for deoxyribonucleic acid amplification. *Ann Clin Lab Sci*. 1996 Oct;26(5):458–69.
26. Diepstraten ST, Hart AH. Modelling human haemoglobin switching. *Blood Rev*. 2019 Jan;33:11–23.
27. Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem*. 2020;94:345–82.
28. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie*. 2005 Dec;2(4):220–39.
29. Karlsson S, Nienhuis AW. Developmental regulation of human globin genes. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:1071–108.
30. Wajcman H. Hémoglobines : structure et fonction. *EMC - Hématologie*. 2019 Aug;14(3).
31. Farashi S, Hartevelde CL. Molecular basis of α -thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;70:43–53.

32. Traeger J, Wood WG, Clegg JB, Weatherall DJ. Defective synthesis of HbE is due to reduced levels of beta E mRNA. *Nature*. 1980 Dec 4;288(5790):497–9.
33. Bardakdjian-Michau J, Dhondt J-L, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet F-X, et al. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2003 Jul 1;61(4):401–9.
34. Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés. *Biologie Médicale - Nomenclature des Actes*. 2020 p. 124.
35. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol*. 1972 Nov;23(5):615–9.
36. Louahabi A, Philippe M, Lali S, Wallemacq P, Maisin D. Evaluation of a new Sebia kit for analysis of hemoglobin fractions and variants on the Capillarys system. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(3):340–5.
37. Chakravorty S, Williams TN. Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. *Arch Dis Child*. 2015 Jan;100(1):48–53.
38. Elion J, Laurance S, Lapoumériou C. Physiopathologie de la drépanocytose. *Médecine Trop Rev Corps Santé Colon*. 2010 Dec;70(5–6):454–8.
39. Bernaudin F. Physiopathologie de la drépanocytose homozygote. *EM-Consulte*. 2020 Mar 30;31(2).
40. Embury SH. The clinical pathophysiology of sickle cell disease. *Annu Rev Med*. 1986;37:361–76.
41. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol*. 2019 24;14:263–92.
42. Naik RP, Smith-Whitley K, Hassell KL, Umeh NI, de Montalembert M, Sahota P, et al. Clinical Outcomes Associated With Sickle Cell Trait: A Systematic Review. *Ann Intern Med*. 2018 06;169(9):619–27.
43. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet Lond Engl*. 2010 Dec 11;376(9757):2018–31.
44. Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. *Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Pediatrics*. 1989 Sep;84(3):500–8.
45. Desselas E, Thuret I, Kaguelidou F, Benkerrou M, de Montalembert M, Odièvre M-H, et al. Mortality in children with sickle cell disease in mainland France from 2000 to 2015. *Haematologica*. 2020 Jan 9;
46. Gaston MH, Verter JI, Woods G, Pegelow C, Kelleher J, Presbury G, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N Engl J Med*. 1986 Jun 19;314(25):1593–9.
47. Haute Autorité de Santé. *Recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge de la drépanocytose chez l'enfant et l'adolescent*. 2005 Sep [cited 2020 Sep 10]; Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/Drepanocytose_reco.pdf
48. Hoppe C, Neumayr L. Sickle Cell Disease: Monitoring, Current Treatment, and Therapeutics Under Development. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019;33(3):355–71.

49. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sick cell disease. *Lancet Lond Engl.* 2017 15;390(10091):311–23.
50. Haute Autorité de Santé. Guide affection de longue durée. Syndromes drépanocytaires majeurs de l'adulte. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. Janvier 2010. [Internet]. [cited 2020 Sep 10]. Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-04/ald_10_guide_drepano_adulte_web.pdf
51. Nardo-Marino A, Brousse V, Rees D. Emerging therapies in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2020 Jul;190(2):149–72.
52. Herity LB, Vaughan DM, Rodriguez LR, Lowe DK. Voxelotor: A Novel Treatment for Sickle Cell Disease. *Ann Pharmacother.* 2020 Jul 16;1060028020943059.
53. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017 02;376(5):429–39.
54. Pecker LH, Naik RP. The current state of sickle cell trait: implications for reproductive and genetic counseling. *Blood.* 2018 29;132(22):2331–8.
55. de Torhout Lehougre M-P, Gérard B. Drépanocytose : aspects actuels du conseil génétique en France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire. Numéro thématique – La drépanocytose en France.* 2012 Jul 3;27–28:328–9.
56. Itano HA. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. *Arch Biochem Biophys.* 1953 Nov;47(1):148–59.
57. La stratégie nationale de santé 2018-2022 [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020 [cited 2020 May 10]. Available from: <http://solidarites-sante.gouv.fr/systeme-de-sante-et-medico-social/strategie-nationale-de-sante/article/la-strategie-nationale-de-sante-2018-2022>
58. Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood.* 2010 Apr 29;115(17):3447–52.
59. Lobitz S, Telfer P, Cela E, Allaf B, Angastiniotis M, Backman Johansson C, et al. Newborn screening for sickle cell disease in Europe: recommendations from a Pan-European Consensus Conference. *Br J Haematol.* 2018;183(4):648–60.
60. Bardakdjian-Michau J. Le dépistage néonatal de la drépanocytose en France. *Arch Pédiatrie.* 2008 Jun;15(5):738–40.
61. Thuret I, Sarles J, Merono F, Suzineau E, Collomb J, Lena-Russo D, et al. Neonatal screening for sickle cell disease in France: evaluation of the selective process. *J Clin Pathol.* 2010 Jun;63(6):548–51.
62. Renom G, Mereau C, Maboudou P, Périni J-M. Potential of the Sebia Capillarys neonat fast automated system for neonatal screening of sickle cell disease. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(11):1423–32.
63. Daniel YA, Henthorn J. Newborn screening for sickling and other haemoglobin disorders using tandem mass spectrometry: A pilot study of methodology in laboratories in England. *J Med Screen.* 2016;23(4):175–8.
64. Théberge R, Dikler S, Heckendorf C, Chui DHK, Costello CE, McComb ME. MALDI-MS Mass Spectrometry Analysis of Hemoglobin Variants: a Top-Down Approach to the

- Characterization of Hemoglobinopathies. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2015 Aug;26(8):1299–310.
65. Wild BJ, Green BN, Stephens AD. The potential of electrospray ionization mass spectrometry for the diagnosis of hemoglobin variants found in newborn screening. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Dec;33(3):308–17.
66. Suarez S, Nassif X, Ferroni A. Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathol Biol.* 2015 Feb 1;63(1):43–52.
67. Kalotychou V, Tzanetea R, Konstantopoulos K, Papassotiriou I, Rombos I. Erythrocytosis due to a combination of the high oxygen affinity hemoglobin variant, Hb Olympia [β 20(B2)Val \rightarrow Met] with beta- and alpha-thalassemia mutations: first case in the literature. *Hemoglobin.* 2010;34(4):383–8.
68. Kamseng P, Trakulsrichai S, Trachoo O, Yimniam W, Panthan B, Jittorntam P, et al. Low oxygen saturation and severe anemia in compound heterozygous Hb Louisville [β 42(CD1)Phe \rightarrow Leu] and Hb La Desirade [β 129(H7)Ala \rightarrow Val]. *Hematol Amst Neth.* 2017 Mar;22(2):114–8.
69. Luo H-Y, Heeney M, Wang WC, Eung SH, Ware RE, Steinberg MH, et al. Hemoglobinopathies mimicking Hb S/beta-thalassemia: Hb S/S with alpha-thalassemia and Hb S/Volga. *Am J Hematol.* 2006 May;81(5):361–5.
70. Groff P, Kalmes G, Golinska B, Miyazaki A, Riou J, Carte N, et al. Hb Ernzt [β 123(H1)Thr \rightarrow Asn] and Hb Renert [β 133(H11)Val \rightarrow Ala]: two new neutral variants revealed by reversed phase high performance liquid chromatography analysis. *Hemoglobin.* 2000 Nov;24(4):287–97.
71. Shackleton CH, Witkowska HE. Characterizing abnormal hemoglobin by MS. *Anal Chem.* 1996 Jan 1;68(1):29A-33A.
72. Dodé C, Rochette J, Krishnamoorthy R. Locus assignment of human alpha globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br J Haematol.* 1990 Oct;76(2):275–81.
73. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet.* 2001 Apr;2(4):245–55.
74. Serjeant GR, Vichinsky E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;70:66–77.
75. Hanna N, Parfait B, Vidaud D, Vidaud M. Mécanismes et conséquences des mutations. *MS Médecine Sci.* 2005;21(11):969–80.
76. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463–7.
77. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986 Jun 12;321(6071):674–9.
78. Zurbriggen K, Schmutz M, Schmid M, Durka S, Kleinert P, Kuster T, et al. Analysis of minor hemoglobins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005 Jun;51(6):989–96.
79. Naubourg P, El Osta M, Rageot D, Grunewald O, Renom G, Ducoroy P, et al. A Multicentre Pilot Study of a Two-Tier Newborn Sickle Cell Disease Screening Procedure with a

First Tier Based on a Fully Automated MALDI-TOF MS Platform. *Int J Neonatal Screen*. 2019 Mar;5(1):10.

80. El Osta M, Naubourg P, Grunewald O, Renom G, Ducoroy P, Périni JM. The Reliable, Automatic Classification of Neonates in First-Tier MALDI-MS Screening for Sickle Cell Disease. *Int J Neonatal Screen*. 2019 Sep;5(3):31.

81. Bouva MJ, Mohrmann K, Brinkman HBJM, Kemper-Propert EA, Elvers B, Loeber JG, et al. Implementing neonatal screening for haemoglobinopathies in the Netherlands. *J Med Screen*. 2010;17(2):58–65.

82. Bouva MJ, Sollaino C, Perseu L, Galanello R, Giordano PC, Harteveld CL, et al. Relationship between neonatal screening results by HPLC and the number of α -thalassaemia gene mutations; consequences for the cut-off value. *J Med Screen*. 2011;18(4):182–6.

83. Yapo AP, Promé D, Claparols C, Riou J, Galactéros F, Wajcman H. Hb Yaoundé [beta134(H12)Val-->Ala], a new neutral variant found in association with Hb Kenitra. *Hemoglobin*. 2001 Feb;25(1):97–101.

84. Faustino P, Miranda A, do Céu Silva M, Alves C, Picanço I, Ferreira C, et al. Hb Yaoundé [beta134(H12)Val-->Ala] in association with Hb C [beta6(A3)Glu-->Lys] in a Caucasian Portuguese family. *Hemoglobin*. 2004 Aug;28(3):229–35.

85. Motos Gallardo A, Hernández JA, Hernández JM, Rovira JM, Fluvà L, Bosch A, et al. Identification and characterization by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry of a new variant hemoglobin, Mataro [beta134(H12) Val > Ala. *J Mass Spectrom JMS*. 2001 Aug;36(8):943–9.

86. Vinciguerra M, Passarello C, Leto F, Cassarà F, Cannata M, Maggio A, et al. Co-inheritance of the rare β hemoglobin variants Hb Yaounde, Hb Görwihl and Hb City of Hope with other alterations in globin genes: impact in genetic counseling. *Eur J Haematol*. 2015 Apr;94(4):322–9.

87. Strahler JR, Rosenbloom BB, Hanash SM. A silent, neutral substitution detected by reverse-phase high-performance liquid chromatography: hemoglobin Beirut. *Science*. 1983 Aug 26;221(4613):860–2.

88. Blibech R, Mrad H, Kastally R, Brissart MA, Potron G, Arous N, et al. Hemoglobin Beirut [alpha 2 beta 2(126)(H4)Val----Ala] in an Algerian family. *Hemoglobin*. 1986;10(6):651–4.

89. Cossu G, Manca M, Strahler JR, Manash SM, Righetti PG. Detection of electrophoretically silent mutations by immobilized pH gradients. *J Chromatogr A*. 1986 Jan;361:223–9.

90. Kim JT, Winter WE, Luo H, Chui DHK, Harris NS. Interference of Hemoglobin A1c Due to Hemoglobin Franklin Park. *J Appl Lab Med*. 2019 Mar 1;3(5):911–3.

91. HbVar ID 2955: Hb Franklin Park [Internet]. [cited 2020 Sep 16]. Available from: http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3?mode=output&display_format=page&i=2955&.cgifields=histD

92. Harano T, Harano K, Ueda S, Imai K, Ohkuma A, Koya Y, et al. Hb Fukuoka [beta 2(NA2)His----Tyr]: a new mutation at the 2,3-diphosphoglycerate binding site. *Hemoglobin*. 1990;14(2):199–205.

93. Liu JS, Molchanova TP, Gu LH, Wilson JB, Hopmeier P, Schnedl W, et al. Hb Graz or

- alpha 2 beta 2(2)(NA2)His-->Leu; a new beta chain variant observed in four families from southern Austria. *Hemoglobin*. 1992;16(6):493–501.
94. Mrad A, Kister J, Feo C, Poyart C, Kastally R, Blibech R, et al. Hemoglobin Athens-Georgia [alpha 2 beta 2 40(C6)Arg----Lys] in association with beta 0-thalassemia in Tunisia. *Am J Hematol*. 1989 Oct;32(2):117–22.
95. Moo-Penn WF, Johnson MH, Bechtel KC, Jue DL, Therrell BL, Schmidt RM. Hemoglobins Austin and Waco: two hemoglobins with substitutions in the alpha 1 beta 2 contact region. *Arch Biochem Biophys*. 1977 Feb;179(1):86–94.
96. Brown WJ, Niazi GA, Jayalakshmi M, Abraham EC, Huisman TH. Hemoglobin Athens-Georgia, or alpha 2 beta 2 40(C6)Arg replaced by Lys, a hemoglobin variant with an increased oxygen affinity. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Jul 19;439(1):70–6.
97. Wils J, Caneiro P, Lebourg L, Lahary A, Chagraoui A, Brunel V. Fortuitous detection of a case of unknown haemoglobin Athens-Georgia from atypical HbA1c electropherogram. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2015 Feb 2;440:6–7.
98. Vassilopoulos G, Papassotiriou I, Voskaridou E, Stamoulakatou A, Premetis E, Kister J, et al. Hb Arta [beta 45 (CD4) Phe-->Cys]: a new unstable haemoglobin with reduced oxygen affinity in trans with beta-thalassaemia. *Br J Haematol*. 1995 Nov;91(3):595–601.
99. Wajcman H, Mrad A, Blouquit Y, Parmentier C, Riou J, Galacteros F. Hemoglobin Villejuif [β 123(H1) Thr→Ile]: A new variant found in coincidence with polycythemia vera. *Am J Hematol*. 1989;32(4):294–7.
100. Hartevelde CL, Groeneveld JHM, van Dam B, Van Delft P, Akkerman N, Arkesteijn S, et al. Hb zoeterwoude [beta23(B5)Val-->Ala]: a new beta-globin variant found in association with erythrocytosis. *Hemoglobin*. 2005;29(1):11–7.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Buvard Perkin Elmer 226 (recto et verso).



Ne pas toucher la surface de dépôt de l'échantillon. 2 gouttes maximum. Assurez-vous que le sang a bien traversé.

CODE MATERNITÉ

ENFANT N-NÉ À RISQUE DE DRÉPANOCYTOSE: Oui Non

NOM :
(Patronyme déclaré à l'état civil): _____

Prénom: _____ Sexe: M F

Nom de naiss. de la mère: _____

Né(e) le: _____ à: _____ h _____ min

Poids: _____ g Terme: _____ SA + _____ jours

Accouchement à domicile

Maternité naissance: _____

Grossesse multiple Si oui, Rang de naissance: /

PRÉLÈVEMENT INITIAL 2^e PRÉLÈVEMENT

Prélevé le: _____ à: _____ h _____ min

Nom Préleveur: _____

Lieu prélèvement: Maternité de naissance Domicile Autre

si autre Lieu / Code:

Transfusion globules rouges Date: _____

N° NAISSANCE ANNUEL

VÉRIFICATION AUDITION

N-né à risque de surdité. Si OUI, précisez: _____

1 ^{er} test		Re-test	
Date: _____	Date: _____		
Lieu: _____	Lieu: _____		
OEA <input type="checkbox"/>	PEA <input type="checkbox"/>	OEA <input type="checkbox"/>	PEA <input type="checkbox"/>
Normal	À surveiller	Normal	À surveiller
OD <input type="checkbox"/>	OG <input type="checkbox"/>	OD <input type="checkbox"/>	OG <input type="checkbox"/>

Rendez-vous le: _____

Lieu: _____

Avec: _____

Tél: _____

Le dépistage auditif n'a pas pu être réalisé car: _____

PerkinElmer 226 2021-01-31 PerkinElmer Health Sciences, Inc. 177 arcN One, Omaha, NE 68111 USA

LOT 111064 / 30470001 Anlistrom ECT REP 2014 JP The Hague, The Netherlands

PARENTS

Adresse des parents: _____

CP: Ville: _____

Tél (1): _____ Tél (2): _____

Email: _____

Médecin déclaré CPAM: _____

Ville: _____

CONSENTEMENT PARENTAL MUCOVISCIDOSE

Après avoir été informés, nous soussignés, (noms, prénoms): _____

Mère , Père de l'enfant: _____

Né(e) le (date de naissance de l'enfant): _____

Autorisons N'autorisons pas les médecins responsables du dépistage à réaliser, si nécessaire, un test génétique pour le dépistage de la mucoviscidose.

Fait le: _____ Signature(s) obligatoires(s)

INFORMATIONS MÉDICALES

Perfusion d'acides aminés

Surcharge iodée

Autres facteurs de risques

Précisez: _____

Pour Drépanocytose (si connu):

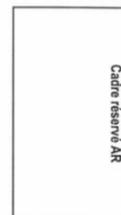
Type Hb

Mère _____

Père _____

1800058575

AFDPHE
38 Rue Cauchy
75015 PARIS
Tél : 01 53 78 12 82



ANNEXE 2 : Résultats.

Échantillon n°	Interprétation MALDI-TOF	Interprétation CLHP	Variant retrouvé par séquençage
1	FAS	FA	Yaoundé
2	FAS	FA	Yaoundé
3	FAS	FA	Beirut
4	FAS	FA	Yaoundé
5	FAS	FA	Beirut
6	FAS	FA	Yaoundé
7	FAS	FA	Beirut
8	FAS	FA	Yaoundé
9	FAS	FA	Yaoundé
10	FAS	FA	Yaoundé
11	FAS	FA	Beirut
12	FAS	FA	Beirut
13	FAS	FA	Yaoundé
14	FAS	FA	Beirut
15	FAS	FA	Yaoundé
16	FAS	FA	Yaoundé
17	FAS	FA	Yaoundé
18	FAS	FA	Yaoundé
19	FAS	FA	Yaoundé
20	FAS	FA	Yaoundé
21	FAS	FA	Yaoundé
22	FAS	FA	Beirut
23	FAS	FA	Beirut
24	FAS	FA	Yaoundé
25	FAS	FA	Yaoundé
26	FAS	FA	Yaoundé
27	FAS	FA	Yaoundé
28	FAS	FA	Franklin Park
29	FAS	FA	Beirut
30	FAS	FA	Yaoundé
31	FAS	FA	Beirut
32	FAS	FA	Beirut
33	FAS	F=A	Yaoundé
34	FAS	FA	Beirut
35	FAS	FA	B45 Phe>Leu
36	FAS	FA	Athens-Georgia
37	FAS	FA	Beirut
38	FAS	FA	Yaoundé

39	FAS	FA	Yaoundé
40	FAS	FA	Yaoundé
41	FAS	FA	Yaoundé
42	FAS	FA	Beirut
43	FAS	FA	B123 Thr>Ala
44	FS	FAS	Yaoundé/S
45	FAS	FA	Yaoundé
46	FAS	FA	Beirut
47	FAS	FA	Beirut
48	FAS	FA	Yaoundé
49	FAS	FA	Yaoundé
50	FAS	FA	Beirut
51	FS	FA	Beirut/BO

DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : ROLAND Estelle INE : 0903012906T

Date, heure et lieu de soutenance :

Le

03	12	2020
jour	mois	année

 à 17h00 Amphithéâtre ou salle : Pauling

Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :



Avis du directeur de thèse

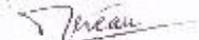
Nom : MÉREAU

Prénom : Claude

- Favorable
 Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 10/11/2020

Signature: 



Avis du président du jury

Nom : BOUSSÉAN

Prénom : Thierry

- Favorable
 Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 10 Nov 2020

Signature: 

Décision du Doyen

- Favorable
 Défavorable

24/11/2020
Le Doyen

B. DÉCAUDIN

NB La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2019/2020

Nom : ROLAND
Prénom : Estelle

Titre de la thèse : Étude par biologie moléculaire des discordances entre MALDI-TOF et CLHP observées dans le cadre du dépistage néonatal de la drépanocytose. Mise en évidence de variants neutres.

Mots-clés : Dépistage néonatal, drépanocytose, hémoglobinopathies, variants neutres

Résumé : L'objectif principal de cette thèse est l'exploration des discordances retrouvées entre les techniques de spectrométrie de masse MALDI-TOF et de chromatographie liquide haute performance, dans le cadre du dépistage néonatal de la drépanocytose. Les objectifs secondaires sont d'identifier les variants d'hémoglobine à l'origine des discordances et de déterminer leur pathogénicité. Ce travail est le résultat d'une collaboration entre le laboratoire de dépistage périnatal et le secteur des hémoglobinopathies.

Les discordances ont été explorées par séquençage du gène bêta globine HBB chez 51 nouveau-nés. La technique de séquençage du gène HBB a été adaptée pour permettre l'utilisation de tache de sang séché comme échantillon.

Des variants neutres d'hémoglobine ont été mis en évidence pour les 51 patients. Ces variants sont asymptomatiques dans la majorité des cas, mais certains peuvent potentiellement être à l'origine d'anémie ou de polyglobulie, notamment s'ils sont associés à d'autres variants d'hémoglobine.

Ce travail apporte une compréhension supplémentaire face à des discordances analytiques jusqu'à présent inexplicables. Dans l'état actuel des connaissances, on ne peut pas justifier d'un signalement systématique de ces variants. Aujourd'hui, ils ne sont pas signalés. Cette position sera revue si de nouvelles données le justifient.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH, CHU de Lille

Directeur de thèse : Madame le Docteur Claude MEREAU, MCU-PH, CHU de Lille

Assesseur(s) : Monsieur le Docteur Patrice MABOUDOU, PH, CHU de Lille
Monsieur le Docteur Jean-Marc PERINI, MCU-PH, CHU de Lille