

DOSSIER THÉMATIQUE « DANS LA PIPETTE », AU CŒUR DES LABORATOIRES DE L'ASSISTANCE PUBLIQUE DES HÔPITAUX DE PARIS



EPISODE 1 - REPORTAGE

DANS LES COULISSES DU CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE EN HÉMOBIOLOGIE PÉRINATALE : UN LABORATOIRE AU SERVICE DES BÉBÉS



DMU BIOGEM

Que fait-on au Centre National de Référence en HémoBiologie Périnatale ? Pour comprendre ce qui s'y trame, nous avons poussé les portes de son laboratoire, toujours situé dans les bâtiments historiques du premier centre de Transfusion Sanguine fondé par Arnault Tzanck en 1931 à l'hôpital St Antoine à Paris. D'abord pionnier, ce laboratoire s'est peu à peu imposé au niveau national et international comme expert pour le diagnostic et le suivi de la maladie hémolytique du nouveau-né, et pour la prise en charge des grossesses à risque.

Par Cécile TOLY-NDOUR

C'est une grande bâtisse en brique, imposante, typique des constructions des années 30, par laquelle on entre par le sous-sol. Au-dessus de l'escalier se dresse une pancarte « Centre National de Référence en HémoBiologie Périnatale » surplombée par une inscription « Bâtiment Rabah Deutsch ». Le nom de ce bâtiment rend hommage à Mme Deutsch de la Meurthe, une célèbre mécène, qui a financé la construction de celui-ci en 1937, pour permettre le développement du premier Centre de transfusion sanguine et de recherche hématologique dirigé par le docteur Arnault Tzanck.

Le Docteur Agnès Mailloux, responsable du laboratoire depuis près de 15 ans, vient à notre rencontre; elle nous accueille chaleureusement et nous empresses de la suivre pour nous faire découvrir le laboratoire.



Entrée du laboratoire du CNRHP, bâtiment Rabah Deutsch, Hôpital St Antoine dans le XIIème arrondissement à Paris

Des prélèvements qui arrivent sans discontinuer de toute la France

En pénétrant dans le bâtiment, nous sommes d'abord accueillis par la bonne humeur du personnel de réception qui pourtant, sans discontinuer, reçoit des prélèvements apportés par des coursiers en moto ou en voiture qui stationnent devant le bâtiment. Près de 400 prélèvements en provenance de toute la France arrivent ainsi chaque jour. C'est Rhégine Cadet, agent de réception, qui assure aujourd'hui l'accueil des prélèvements dits urgents : *« je vérifie l'étiquetage des tubes de sang et regarde les examens de biologie médicale qui sont demandés. Puis j'enregistre un dossier à l'identité du patient dans le système de gestion de laboratoire. Je dois ensuite transmettre rapidement le prélèvement aux techniciens »* explique-t-elle.

Des dosages de bilirubines, molécules toxiques pour le cerveau des nouveau-nés

Le prélèvement qu'elle vient d'enregistrer est un petit tube qui contient le sang d'un nouveau-né hospitalisé dans le service de néonatalogie de l'hôpital Trousseau. Il a développé une « jaunisse » (ictère) et le pédiatre voudrait connaître la quantité de molécules de bilirubines qui est présente dans le sang de l'enfant. La bilirubine, c'est un pigment jaune produit suite à la destruction des globules rouges : on peut la quantifier grâce à une réaction chimique, réalisée à l'aide d'un automate de biochimie. Au CNRHP, on peut doser la bilirubine totale mais aussi la Bilirubine dite "non liée", qui est une forme de bilirubine toxique pour le cerveau. En forte quantité, elle peut induire des séquelles neurologiques graves et irréversibles chez les nouveau-nés.

Dounia Aissa, la technicienne de laboratoire qui s'occupe aujourd'hui des dosages de bilirubines prend en charge le prélèvement : *« je dois d'abord le centrifuger, c'est-à-dire séparer le sang en 2 parties : une qui contient les cellules présentes dans le sang et l'autre qui contient le liquide dans lequel baignent ces cellules et qu'on appelle le plasma. Ensuite j'irai prélever le plasma à l'aide d'une pipette et le transférerai dans un tube adapté à l'automate de biochimie. Dans l'automate, une aiguille viendra prélever le plasma et le mettre en contact avec différents réactifs pour que la réaction chimique puisse avoir lieu. A la fin de la réaction chimique, un composé est généré : on mesure sa densité optique, qui est proportionnelle à la concentration de bilirubines dans le plasma. Au total, la centrifugation plus l'analyse sur l'automate dure une bonne trentaine de minutes. Cela me laisse le temps de réaliser le groupe sanguin de l'enfant à partir des cellules qui sont restées dans le premier tube »*.

Dounia va déterminer le groupe ABO de l'enfant, c'est-à-dire rechercher la présence de petites molécules A et/ou B à la surface de ses globules rouges, puis regarder s'il y a une situation d'incompatibilité ABO avec sa maman. Une incompatibilité, c'est quand la maman a produit des petites molécules appelées anticorps, qui vont reconnaître et se fixer sur les molécules A ou B exprimées par les globules rouges du nouveau-né.

LE CNRHP EN QUELQUES DATES

1931 : Création du Centre National de Transfusion Sanguine à l'hôpital St Antoine à Paris par Arnault Tzanck, pionnier de la transfusion sanguine en France et dans le monde.

1940 : Découverte aux Etats-Unis par Landsteiner et Wiener du facteur « Rhésus » comme étant la cause principale d'une maladie qu'ils appellent l'érythroblastose foetale.

1949 : Description en France de la maladie « redoutable » qu'est la « maladie hémolytique du nouveau-né » par Lucien Febvre dans *Les Annales*, qui s'avérera ensuite correspondre à la maladie décrite par Landsteiner et Wiener quelques années plus tôt.

1951 : Lucien Febvre et son fils Henri développent la technique d'exsanguino-transfusion, traitement révolutionnaire pour les nouveau-nés atteints par la maladie hémolytique. Ils montent avec Arnault Tzanck à l'hôpital St Antoine le "service de la maladie hémolytique du nouveau-né" géré par l'association "l'Œuvre de la transfusion sanguine d'urgence" avec un laboratoire et une équipe mobile qui réalise des exsanguino-transfusions.

1960 : Mise au point des dosages de la bilirubine dans le liquide amniotique par le laboratoire de l'hôpital St Antoine.

1962 : Réalisation par les médecins du "service de la maladie hémolytique du nouveau-né" des premières transfusions foetales à travers le péritoine (membrane qui tapisse les parois intérieures de l'abdomen) selon le mode opératoire sous radioscopie décrit par Liley. Il s'agit du premier traitement permettant d'éviter les morts foetales *in utero*.

1962 : Découverte par deux groupes de chercheur Outre-Atlantique d'un moyen de prévenir la maladie par administration d'un médicament aux patientes qui ne possèdent pas le facteur Rhésus : les immunoglobulines anti-D.

1975 : Création du Centre d'Hémobiologie Périnatale (CHP). Promotion et généralisation de la prévention Rhésus en France. Avancées technologiques dans le domaine, au niveau de la biologie (dosages de bilirubines, quantification des anticorps, génotypage des groupes sanguins ...), de l'obstétrique (progrès de l'échographie foetale et arrivée de la technologie Doppler pour diagnostiquer l'anémie foetale, évolution des thérapies transfusionnelles *in utero* avec accès par le cordon ombilical...) et de la néonatalogie (développement de la « photothérapie », (traitement par la lumière qui permet de détruire la bilirubine sanguine), arrivée de nouveaux médicaments, poursuite des exsanguino-transfusions...).

2004 : Le CHP « historique » est transformé par la circulaire DHOS/DGS/n°156 du 29 mars 2004 en Centre national de référence en hémobiologie périnatale ou CNRHP. Le centre est intégré à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris.

2021 : Intégration du département d'immunologie plaquettaire de l'ex - Institut National de Transfusion Sanguine et élargissement des compétences du CNRHP dans le domaine des incompatibilités plaquettaires entre la mère et l'enfant.

On peut la mettre en évidence grâce à un examen que l'on appelle l'examen direct à l'antiglobuline ou encore test de Coombs direct. « Vous voyez, là le résultat est positif » explique Dounia. « L'enfant est de groupe B, sa maman est de groupe O, et des anticorps de la maman se sont fixés sur les molécules B portées par les globules rouges de l'enfant. ».

Le docteur Mailloux qui nous accompagne ajoute : « la fixation de ces anticorps sur les globules rouges du nouveau-né a eu lieu quand le bébé était encore dans le ventre de sa mère. C'est ce phénomène qui est responsable de la destruction des globules rouges, que l'on appelle « hémolyse » et qui engendre la production d'un taux important de bilirubines. Cliniquement, cela se manifeste par une « jaunisse » chez l'enfant : sa peau, ses yeux et ses muqueuses se teintent en jaune. Les anticorps maternels peuvent être aussi dirigés contre les molécules dites « Rhésus » et dans cette situation, les symptômes peuvent être encore plus sévères, avec parfois des atteintes du bébé quand il est encore dans le ventre de sa mère. Il peut se développer une anémie très profonde, due à un manque de globules rouges ; cela peut conduire à la mort du bébé : on parle alors de mort fœtale in utero. Heureusement des thérapeutiques existent. ».

Les résultats du dosage de la bilirubine sont maintenant disponibles. Dounia a vérifié au préalable le bon fonctionnement de la machine grâce à des contrôles de qualité : ce sont des échantillons contenant une concentration connue en bilirubines et pour lesquels l'automate doit trouver un résultat correct.

Le résultat trouvé montre une concentration très élevée de bilirubines pour l'enfant. La technicienne s'empresse d'aller transmettre le résultat à Lance Augier, l'interne en biologie médicale qui effectue son stage au laboratoire ce semestre.

Ce dernier nous explique « Je dois vérifier la cohérence du résultat trouvé. Je regarde ensuite si la concentration en bilirubines trouvée dépasse les valeurs dangereuses (pathologiques) en fonction de l'âge (en heures) du nouveau-né. C'est effectivement le cas ici : je dois donc rapidement alerter le pédiatre par téléphone, car un traitement doit être entrepris pour prendre en charge l'enfant et éviter que le taux élevé de bilirubines n'ait des conséquences graves sur son cerveau. »



Dounia Aissa, technicienne, devant l'automate de biochimie (Indiko) qui réalise les dosages de bilirubine



“Les anticorps produits par la mère perdurent toute la vie, laissant des parents souvent désespérés devant le risque, sans traitement adapté, d’avoir des décès répétés de leurs bébés ou d’avoir des enfants lourdement handicapés.”

Dr Agnès MAILLOUX, responsable médicale du laboratoire du CNRHP

Des conseils pour la prise en charge des bébés apportés par les pédiatres du CNRHP

Une fois les résultats téléphonés, Lance les « valide », c'est-à-dire qu'il certifie l'exactitude des résultats en apposant sa signature électronique dans le logiciel du laboratoire : les résultats sont alors télétransmis directement dans l'informatique du service de néonatalogie de l'hôpital Trousseau. En parallèle, au vu des valeurs pathologiques, les résultats sont faxés automatiquement au niveau de la permanence pédiatrique du CNRHP. Là, des pédiatres du CNRHP vont pouvoir prendre le relai pour conseiller les pédiatres prenant en charge l'enfant, afin que celui-ci ait le traitement le plus adapté possible.

Le Dr Mailloux ajoute « les pédiatres du CNRHP pourront notamment conseiller d'administrer de l'albumine pour faire diminuer la concentration de la forme de bilirubine toxique pour le cerveau, ou préconiser de faire de la photothérapie (traitement par la lumière): L'enfant est exposé à de la lumière bleue, ce qui permet de « casser » les molécules de bilirubines présentes dans son sang. Dans les cas sévères, ils peuvent aller jusqu'à conseiller de réaliser une exsanguino-transfusion, procédure qui permet d'enlever le sang de l'enfant qui contient des taux élevés de bilirubines et de le remplacer par du sang reconstitué à partir de produits sanguins fournis par la banque de sang »

D'autres examens urgents réalisés 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7

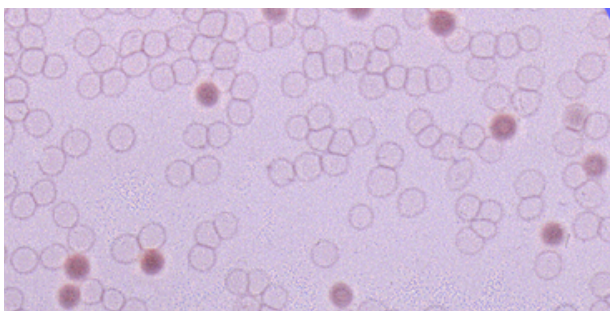
Dans la pièce, cernés par les portoirs de tubes de sang et berçés par le ronronnement des centrifugeuses, d'autres techniciens s'affairent. Ils réalisent eux aussi des examens urgents dont le résultat doit être rendu en quelques heures.

Nous sommes interpellés par Valérie Zorayan, une autre technicienne du laboratoire. Elle veut nous montrer quelque chose sur son microscope. Nous découvrons alors, à travers l'objectif, des petites cellules rondes, transparentes, accompagnées d'autres cellules, plus rares, de couleur rose. Ce sont des globules rouges. Le test de Kleihauer permet de dépister des hémorragies dites foeto-maternelles c'est-à-dire quand le sang du fœtus passe dans le sang de la maman. Normalement, les circulations sanguines de la mère et de l'enfant sont indépendantes et séparées grâce à la barrière que constitue placenta.

Mais dans certains cas (chocs sur le ventre, gestes obstétricaux, anomalie du placenta...), du sang du bébé peut se déverser dans le sang de sa maman. Les conséquences peuvent être fatales pour l'enfant si l'hémorragie est massive. Valérie nous explique : « Le principe du test de Kleihauer est fondé sur la différence de solubilité en milieu acide de la molécule d'hémoglobine dite fœtale présente dans les globules rouges du bébé par rapport à la molécule d'hémoglobine dite adulte présente dans les globules rouges de la maman. Ces deux molécules vont se comporter différemment vis-à-vis d'un colorant, l'éosine : on pourra ainsi, par observation au microscope, voir s'il y a des globules rouges du fœtus qui circulent dans le sang de la maman car elles prennent une coloration rose. Là encore si le résultat est fortement positif, nous alerterons l'interne ou un biologiste qui se chargera de communiquer le résultat à l'obstétricien ou à la sage-femme qui suit la patiente pour que celle-ci soit suivie de près. »

Il y a également les examens utiles à la prévention de l'allo-immunisation Rhésus : ils vont guider l'administration d'un médicament donné aux patientes « Rhésus négatif » pour éviter qu'elle ne développe des anticorps contre la molécule Rhésus de leur enfant.

Ces examens urgents sont réalisés 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Une équipe de techniciens et de biologistes de garde est formée et prend le relai la nuit au niveau du laboratoire de biologie d'urgence de l'hôpital. Ils peuvent contacter un biologiste du CNRHP d'astreinte à tout moment en cas de difficultés ou de commentaires spécifiques à mettre sur les résultats.



Observation d'une lame au microscope. Test de Kleihauer montrant la présence de globules rouges fœtaux (couleur rose) dans le sang maternel

Des examens ultra-spécialisés pour le suivi des grossesses compliquées par la présence d'anticorps dirigés contre les cellules du sang des bébés.

Le Dr Mailloux nous invite à poursuivre la visite.

« Là, vous n'avez vu que le laboratoire d'urgence. D'autres examens sont réalisés dans d'autres pièces pour le suivi des grossesses compliquées par la présence d'anticorps dirigés contre les cellules du sang des bébés. Par exemple au premier étage, nous réalisons des techniques de quantification des anticorps dans le plasma des mamans : ce sont des techniques de titrage. Nous avons également des chaînes de dosage pondéral, qui sont des systèmes semi-automatisés qui nous permettent de doser les anticorps anti-Rhésus : moins de dix laboratoires dans le monde réalisent cet examen.

LE CNRHP EN QUELQUES CHIFFRES :

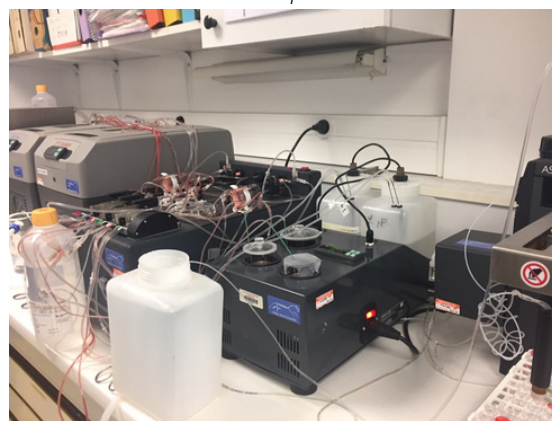
Unité clinique :

150 grossesses à risque suivie / an
70 actes de transfusion fœtales *in utero* / an
1500 consultations néonatales / an

Laboratoire :

15000 groupes sanguins / an
15000 identifications d'anticorps anti-globules rouges / an
25000 tests de quantification d'anticorps anti-globules rouges / an
6000 dosages de bilirubines / an
13000 test de Kleihauer / an
6500 recherche d'anticorps anti-plaquettes / an

Au fond, il y a une pièce dédiée aux examens dits de « biologie moléculaire ». On peut ainsi déterminer le groupe « rhésus » du bébé à partir de son ADN que l'on retrouve à l'état de traces dans le sang de sa maman. Cela permet de savoir si le bébé est à risque de faire une maladie hémolytique. Ce sont des techniques en plein développement que nous sommes, pour certaines, les seuls à réaliser en France. Les ingénieurs du laboratoire nous aident à les mettre en place.



Les chaînes Astoria pour le dosage pondéral des anticorps anti-Rhésus

Plus loin, il y a aussi la pièce d'immunologie plaquettaire. D'autres examens spécialisés y sont réalisés pour rechercher la présence d'anticorps dirigés non pas contre les globules rouges mais contre les plaquettes sanguines. Les plaquettes sont des petites cellules impliquées dans le phénomène de coagulation du sang. Selon le même principe que pour les globules rouges, les mères peuvent développer des anticorps qui vont aller détruire les plaquettes de leur enfant *in utero*, avec le risque d'induire une hémorragie dans le cerveau, pouvant elle aussi être à l'origine de séquelles neurologiques graves et irréversibles. »

Une prise en charge des grossesses les plus à risque par les obstétriciens du CNRHP

« Pour tous ces examens, là encore, le biologiste appelle directement l'obstétricien lorsqu'on trouve des résultats pathologiques (présence ou taux élevé d'anticorps).

Nous prévenons en parallèle les obstétriciens de l'unité clinique du CNRHP qui vont ensuite apporter leurs conseils pour la prise en charge de la grossesse. Ils peuvent, dans les cas les plus sévères, faire venir la patiente pour son suivi à l'hôpital Trousseau, qui est l'hôpital référent. La surveillance consiste essentiellement en la réalisation d'échographies fœtales et de dosages d'anticorps réguliers. Des transfusions de globules rouges in utero peuvent être réalisées pour compléter le bébé en globules rouges et éviter son décès si l'anémie est très profonde. C'est une technique réalisée au bloc opératoire, sous anesthésie locale et sous contrôle échographique. Le médecin transfuse des globules rouges dans le cordon ombilical du bébé à l'aide d'une aiguille très fine qui traverse le ventre de sa mère. Des médicaments peuvent également être donnés pour limiter les effets néfastes des anticorps anti-globules rouges et anti-plaquettes » continue de nous expliquer Agnès Mailloux.

Nous prenons alors la mesure de l'importance de la bonne coordination du laboratoire avec les unités pédiatrique et obstétricale du CNRHP. Le Dr Mailloux nous explique que des réunions hebdomadaires de toute l'équipe ont lieu pour discuter des patientes suivies pour une grossesse compliquée par ce qu'on appelle une « allo-immunisation » érythrocytaire (pour les globules rouges) ou plaquettaire.

Du personnel très investi

A l'étage, nous passons par le secrétariat qui est en pleine effervescence: sonneries du téléphone, bips émis par le fax, bruits de papier dûs à la mise sous pli des compte-rendus de résultats.

Les secrétaires répondent aux nombreuses sollicitations de biologistes et de médecins de toute la France qui veulent récupérer leurs résultats ou parler avec un biologiste du CNRHP pour avoir une explication ou des conseils spécifiques.

Il y a plus de 40 personnes qui travaillent au laboratoire. Chacun a une fonction bien définie qui s'articule avec les autres. Les plannings des agents de réception, des secrétaires et des techniciens - qui changent régulièrement de postes de travail - sont gérés par la cadre du service.

Les plannings de validation de l'interne et des biologistes sont établis par le Dr Mailloux. « Nous avons un certain nombre d'autres activités à mener en parallèle de la validation d'examen et du conseil associés aux résultats. En effet, nous donnons des cours, effectuons des formations. Nous avons également des activités de développement de techniques, d'assurance qualité et de veille sanitaire. Nous participons aussi à des protocoles de recherche menés avec l'unité clinique du CNRHP. Toutes ces activités font partie des missions que la circulaire DHOS/DGS de 2004 a confié à notre Centre » souligne Agnès Mailloux.

LES DIFFÉRENTS MÉTIERS AU LABORATOIRE DU CNRHP

Agent de réception : Acteur/actrice de la phase dite préanalytique, il/elle assure l'ensemble des activités techniques et administratives nécessaires au traitement des examens de biologie qui lui sont confiés. Formation : BEP sanitaire et social, diplôme d'aide-soignant ou niveau bac.

Secrétaire médicale : actrice de la phase dite post-analytique, elle est en charge de l'accueil téléphonique, de la transmission des résultats et de diverses autres tâches administratives. Formation : niveau bac avec recrutement sur concours pour travailler en milieu hospitalier.

Technicien(ne) de laboratoire : il/elle effectue les tests de contrôle qualité et les examens sur les prélèvements des patients. Formation : niveau BTS / DEUST (bac +2) ou licence professionnelle (bac +3)

Ingénieur en biologie médicale : il/elle élabore des protocoles et expérimente de nouvelles technologies et méthodes dans le domaine de la biologie médicale. Formation : école d'ingénieur ou Master spécialisé (bac +5)

Cadre de santé en laboratoire: Il/elle anime et encadre les équipes techniques et organise leurs activités au sein du laboratoire. Formation d'un an après recrutement sur concours avec au moins 4 années d'expérience requises en tant que technicien(ne).

Interne en biologie médicale : étudiant en pharmacie ou en médecine qui se destine à devenir biologiste médical. Il/elle effectue des tâches comparables aux biologistes dits « seniors » sous leur supervision. Formation : après le tronc commun des études de médecine (bac+6) ou de pharmacie (bac+5), et après une sélection par un concours, il/elle bénéficie d'une formation théorique et pratique de 4 années dans les différentes spécialités de la biologie médicale (biochimie, hématologie, microbiologie, parasitologie, immunologie...)

Biologiste médical : il/elle réalise ou contrôle la réalisation d'actes de biologie médicale, interprète et valide les résultats avec une prestation de conseils. Il/elle participe au diagnostic médical et au suivi des patients. Formation : Médecin ou pharmacien, titulaire du DES de Biologie médicale obtenu à la fin de l'internat.

Nous terminons notre visite en saluant et remerciant l'ensemble du personnel qui nous a accueilli.

« Nous sommes tous très investis dans notre travail car nous avons conscience que derrière ces tubes de sang, ce sont des bébés et des mamans qui souffrent. Les examens que nous réalisons ici contribuent à les soigner et à éviter le pire. Quelle satisfaction lorsqu'une patiente suivie par notre centre pendant toute sa grossesse nous envoie ensuite des photos de son enfant, tout sourire et plein de vie ! C'est une vraie victoire et un sentiment de fierté pour nous tous » conclut Agnès Mailloux.

Force est de constater qu'avec tous leurs efforts, les membres du CNRHP arrivent en effet souvent à vaincre cette maladie que Lucien Febvre décrivait pourtant comme « redoutable » il y a plus de 70 ans.