

Royaume du Maroc المملكة المغربية

Sommaire :

INTRODUCTION :	5
PARTIE THEORIQUE :	15
1. GENERALITES :	16
2. HISTORIQUE :	17
3. IMPLICATION THERAPEUTIQUE DES VARIANTS STRUCTURELS DE LA CHAINE BETA-GLOBINE	17
3.1. L'HEMOGLOBINE E ANORMAL	18
3.2. L'Hb LEPORE	19
3.3. L'HEMOGLOBINE S (HbS)	19
4. LA B-THALASSEMIE	20
4.1. HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE	21
4.2. LA DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE	22
4.3. INCIDENCE	23
4.4. PREVENTION	24
5. PHYSIOLOGIE :	25
5.1. PHYSIOLOGIE DE L'HEMOGLOBINE	25
5.2. BIOSYNTHESE ET COMMUTATION	27
5.3. PHYSIOPATHOLOGIE	28
5.4. EXPRESSION GENIQUE « GENE SWITCHING » DE L'HEMOGLOBINE	30
6. ASPECTS GENETIQUES	31
6.1. LES GENES DE L'HEMOGLOBINE	31
6.2. LE GÈNE HBB	32

6.3. LES MUTATIONS DE L'HBB.....	33
6.4. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DES MUTATIONS	34
6.5. DESCRIPTION DES MUTATIONS B-THALASSÉMIQUES.....	34
6.6. CORRÉLATION GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE	38
6.7. TRANSMISSION	40
7. CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES	41
7.1. FORME MAJEURE	41
7.2. FORME INTERMÉDIAIRE	42
8. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC	43
8.1. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE :	43
8.2. TESTS DE GÉNÉTIQUES MOLÉCULAIRES	45
9. TRAITEMENT	46
9.1. LES TRANSFUSIONS DE CONCENTRÉS DE GLOBULES ROUGES	47
9.2. LE TRAITEMENT CHÉLATEUR DU FER.....	47
9.3. LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES.....	48
9.4. LA SPLÉNECTOMIE	49
9.5. TRAITEMENTS MÉDICAMENTEUX	49
9.6. LA THÉRAPIE GÉNIQUE	50
PARTIE PRATIQUE :	52
1. MATÉRIELS ET MÉTHODES :	53
1.1. CRITÈRES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION DES PATIENTS :	53
1.2. PRÉLEVEMENT :	53
1.3. ANALYSE STATISTIQUE :	53
1.4. ÉTHIQUE :	54

1.5. TECHNIQUES DE PREPARATION ET DE PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES :.....	54
1.6. AMPLIFICATION DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES PAR PCR :.....	58
1.7. SEQUENÇAGE D'ADN :	61
1.8. ANALYSE BIO-INFORMATIQUE :.....	65
2. RESULTATS	67
2.1. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	67
2.2. DONNEES CLINIQUES :	68
2.3. DONNEES BIOLOGIQUES	69
2.4. RESULTATS DE L'ETUDE MOLECULAIRE :.....	70
3. DISCUSSION	75
3.1. PARTICULARITES PHENOTYPIQUES :	76
3.2. ANALYSE DU SPECTRE MUTATIONNEL DE LA B-THALASSEMIE AU MAROC :	78
3.3. CORREATION ENTRE LE PHENOTYPE ET LE GENOTYPE DES BETA THALASSEMIE :.....	80
CONCLUSION.....	82

REMERCIEMENTS

A dieu

Je remercie le bon dieu tout puissant qui m'a donné la force et la volonté d'achever ce travail.

A mes très chers parents

Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance envers les deux personnes les plus chères à mon cœur ! Si mes expressions pouvaient avoir quelque pouvoir, j'en serais profondément heureux. Je vous dois ce que je suis. Vos prières et vos sacrifices m'ont comblé tout au long de mon existence. Puisse Dieu tout puissant vous procurer santé, bonheur et prospérité.

A mes maitres Président et membres du Jury

Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger cette thèse.

Dédicaces

Je dédie cette thèse

A mes très chers parents qui m'ont toujours entouré de leur affection sereine.

A ma très chère sœur et frère

Pour tout ce qu'ils ont enduré avec moi

Je vous aime tous et je vous remercie pour votre soutien

A chaque patient atteint de thalassémie, ceux que je connais et les centaines de personnes qui sont atteintes au Maroc et à travers le monde, leur immense courage et leur patience infinie m'ont appris comment combattre sans perdre.

LISTE DES ABREVIATIONS

AD	:	Autosomique dominant
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AR	:	Autosomique récessif
α	:	Alpha
β	:	Bêta
$\beta 0$	:	Mutant à l'origine de l'absence d'hémoglobine A
$\beta +$	:	Mutant à l'origine d'une faible production d'hémoglobine A
CCMH	:	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CSH	:	Cellules souches hématopoïétiques
Cd	:	Codon
CHU	:	Centre Hospitalier Universitaire
dNTP	:	Deoxynucleotid
ddNTP	:	Didésoxyribonucléotide Triphosphates
DG	:	Diagnostic
EDTA	:	Ethylène Diamine Tétra Acétique
DFO	:	déféroxamine
EP	:	Electrophorèse
ϵ	:	Epsilon
EPO	:	Erythropoïétine
γ	:	Gamma
g	:	Gramme
GR	:	Globule Rouge
Hb	:	Hémoglobine
HBB	:	Bêta Globine
Hb A	:	Hémoglobine adulte
Hb A1c	:	Hémoglobine A glyquée
Hb A2	:	Variante normale de l'hémoglobine adulte
Hb C	:	Variant anormale de l'hémoglobine responsable de l'hémoglobinoïde C
Hb D	:	Variant anormale de l'hémoglobine responsable de l'hémoglobinoïde D
Hb F	:	Hémoglobine fœtale
H	:	Variant anormale de l'hémoglobine responsable de l'alphathalassémie
Hb S	:	Variant anormale de l'hémoglobine responsable de la drépanocytose

LDH	:	Lactate déshydrogénase
MI	:	Millilitre mm : Millimètre
N	:	Normal
NFS	:	Numération Formule Sanguine
OMS	:	Organisation mondiale de la santé
OGE	:	organes génitaux externes
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
RAMED	:	Régime d'assistance médicale
RSP	:	Retard staturo-pondéral
RAI	:	Recherche d'agglutinine irrégulière
RPM	:	tour par minute
S/ β	:	Hétérozygote composite S/ bêta-thalassémie
S/S	:	Homozygote SS
TCMH	:	Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
TF	:	Transfusion
Thal	:	Thalassémie
TI	:	Thalassémie intermédiaire
TM	:	Thalassémie majeure
VGM	:	Volume Globulaire Moyen

LEXIQUE

Acide désoxyribonucléique (ADN) : Acide nucléique caractéristique des chromosomes et constitué de deux brins (enroulés en double hélice) formés chacun d'une succession de nucléotides. C'est le support de l'information génétique héréditaire.

Anisocytose : Inégalité anormale des diamètres des différentes hématies.

Artéfact : Altération du résultat d'un examen due au procédé technique utilisé.

Cellule cible : Globule rouge dans lequel l'hémoglobine n'est pas répartie de façon homogène, mais forme des anneaux concentriques.

Chromoprotéine : Protéine associée à un groupement prosthétique coloré, souvent de type métallifère.

Cluster : Ensemble de gènes appartenant à la même famille, groupés les uns derrière les autres au niveau d'une même région chromosomique et codant pour une protéine identique ou similaire.

Codon : Séquence de trois bases nucléotidiques dans la molécule d'un acide nucléique (ADN ou ARN). **Délétion :** Mutation génétique caractérisée par la perte d'un fragment d'ADN sur un chromosome.

Drépanocyte : Hématie de forme allongée, classiquement en forme de faucille ou de croissant (hématie falciforme).

Exon : Partie codante du gène qui détermine la structure d'une protéine. Il correspond aux fragments d'ARN primaire retrouvés dans l'ARN cytoplasmique après épissage.

Gène : Structure nucléotidique (portion d'ADN) portant l'information génétique. Il conditionne la synthèse d'une ou de plusieurs protéines et, donc, la manifestation et la transmission d'un caractère héréditaire déterminé.

Génotype : Ensemble des caractères génétiques d'un être vivant, qu'ils se traduisent ou non dans son phénotype (ensemble des caractères physiques et biologiques d'un individu).

Hémochromatose : Maladie métabolique consécutive à l'accumulation de fer dans les tissus de l'organisme.

Hétérozygote : Se dit d'un individu dont les deux copies d'un même gène (chacune portée par l'un des deux chromosomes homologues d'une paire) sont différentes. **Hétérozygote composite** : Individu possédant deux allèles mutés au même locus. **Homozygote** : Individu possédant deux copies identiques d'un même gène (chacune portée par l'un des deux chromosomes homologues d'une paire).

Intron : Fraction d'ADN présente dans un gène, intercalée entre les exons et dépourvue d'information relative à la synthèse d'une protéine (non codante). Il ne se retrouve pas dans l'ARN cytoplasmique après épissage.

Maladie monogénique : Maladie génétique qui est due à la présence d'une ou plusieurs mutations au sein d'un seul gène.

Microcytose : Diminution de la taille des globules rouges

Mutation : Modification survenant dans la séquence de l'ADN d'une cellule et pouvant entraîner la disparition d'un caractère préexistant ou l'apparition d'un caractère nouveau.

Mutation ponctuelle : la Mutation de structure portant sur une seule base (substitution d'une base par une autre). On distingue deux classes de mutations ponctuelles celles ne modifiant qu'un seul codon et celles qui modifient le cadre de lecture

Nosologie : Partie de la médecine qui étudie les critères qui servent à définir les maladies afin d'établir une classification.

Ontogénie : Développement de l'individu, depuis l'œuf fécondé jusqu'à l'état adulte. **Pathogénie** : Étude du ou des mécanismes responsables du déclenchement et du développement d'une maladie.

Syndrome anémique : Ensemble des symptômes cliniques d'une anémie (pâleur, asthénie, signes cardio-vasculaires, manifestations neurologiques [lipothymies, vertiges, céphalées] et fièvre).

Splénomégalie : Augmentation du volume de la rate.

Substitution : Mutation résultant du remplacement d'un (ou plusieurs) nucléotides par un autre (ou plusieurs autres) nucléotide comportant une base azotée différente. **Variant** : Hémoglobine structuralement anormale/ pathologique.

Références : Larousse

Introduction :

Les hémoglobinopathies sont parmi les maladies autosomiques récessives les plus communes, elles provoquent une variété de syndromes, tous avec une anémie comme caractéristique commune, avec un large spectre de sévérité clinique. Elles sont définies par la présence d'anomalies qualitatives et / ou quantitatives affectants les chaînes de la globine. Les plus importants sur le plan clinique sont ceux dans lesquels l'anémie est si grave que la vie ne peut être soutenue sans des transfusions sanguines régulières. Ceux-ci comprennent les thalassémies, qui sont les anomalies quantitatives les plus fréquentes avec une synthèse réduite ou absente causées par des mutations au niveau des gènes α et β responsables de la synthèse de l'hémoglobine et qui conduisent à des α et β -thalassémies, respectivement [1, p. 193-211].

Parmi les anomalies qualitatives (Hémoglobinoses), la plus fréquente est celle de l'hémoglobine S (HbS) causé par une substitution d'un seul résidu d'acide aminé sur la chaîne β de l'hémoglobine et qui provoque la drépanocytose (anémie falciforme) [2].

Les anomalies de l'hémoglobine constituent un énorme fardeau pour la santé publique, elles sont souvent graves dans leurs formes majeures. Leur prise en charge est lourde avec un grand impact psycho-social sur les patients et leurs familles.

Il est estimé qu'environ 7% de la population mondiale porte un gène anormal de l'Hb dont 70% sont nés avec le gène de la drépanocytose et le reste avec ceux de la thalassémie. Presque 80% des enfants touchés sont nés dans les pays en voie de développement [3, p. 1].

La prévalence des troubles de l'Hb est également en augmentation dans les régions non endémiques, telles que l'Europe du Nord et de l'Ouest et l'Amérique du Nord, ce qui représente un défi majeur pour les chercheurs et les professionnels de la santé. Environ 2000 mutations dans les gènes de l'hémoglobine ont été dépistées et stockées dans les bases des données tels que « IthaGenes » et « HbVar » [4].

Les taux d'incidence et de prévalence des hémoglobinopathies pourraient être influencés par les caractéristiques démographiques et culturelles de la population. De ce fait, Le Maroc est une région de prédilection. Les mariages consanguins sont bien acceptés par sa culture et favorisent les complications cliniques plus ou moins sévères dans les familles à risque [5], [6].

Conscient de cette situation, le Ministère de la santé a mis en place, en 2010 un plan national de prévention et de contrôle de la thalassémie et des autres hémoglobinopathies (PNPCTH), pour réduire l'incidence, la morbidité, la mortalité et l'incapacité liée à ces pathologies, et améliorer la qualité de vie chez ces patients [7].

Nous nous sommes intéressés dans ce travail aux β -thalassémies, qui présentent un problème de santé publique au Maroc, ce type d'anémie est une urgence médicale imposant dans la majorité des cas des sanctions transfusionnelles sanguines mensuelles.

Le diagnostic moléculaire des bêta thalassémies occupe actuellement une place importante dans le cadre du diagnostic, du conseil génétique et du diagnostic prénatal mais il nécessite toujours au préalable une analyse phénotypique précise.

Chaque population se caractérise par un groupe de mutations qui lui est spécifique, la connaissance du spectre de leur répartition constitue une donnée essentielle pour un diagnostic moléculaire car elles seront les premières à rechercher.

Ce travail a comme objectif la mise au point de l'étude moléculaire de la bêta thalassémie à travers l'analyse du gène HBB chez 35 patients suivis au CHU HASSANII de Fès, cette étude génétique permettra de déterminer la prévalence et le spectre des mutations de ce gène dans notre population, d'établir un phénotype clinique et de proposer un conseil génétique adéquat.

Partie théorique :

1. Généralités :

Les thalassémies constituent après la drépanocytose le second grand volet des pathologies qui touchent l'hémoglobine.

C'est un groupe des maladies héréditaires monogéniques à transmission autosomique récessive [2].

Bien que ce terme englobe un groupe très hétérogène de désordres hématologiques, la définition est unificatrice :

C'est l'absence ou la diminution de la biosynthèse d'une ou de plusieurs chaînes de l'hémoglobine. Très schématiquement on distingue donc les alpha et les Bêta- thalassémies (β -Thalassémie) [8].

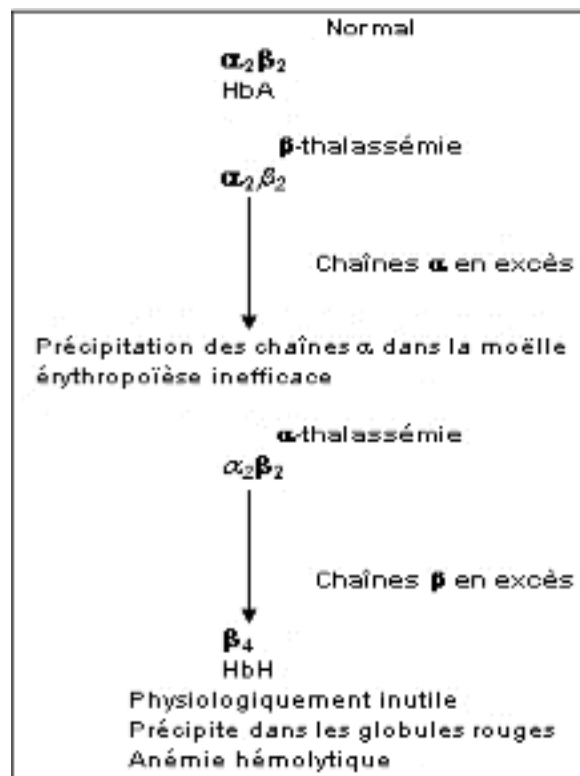


Figure 1 : Une représentation simplifiée des différences dans la composition de l'Hb entre les deux formes principales de la thalassémie. (Les symboles ombrés α et β indiquent une synthèse défectueuse de globine) [9].

2. Historique :

La première description d'un syndrome spécifique a été faite par Cooley en 1925 chez un sujet d'origine italienne. Le terme thalassémie fut introduit dans la littérature en 1932 par Wipple et Bradford, il est dérivé du grec, Thalassa (mer) et Haima (sang). Cette maladie étant apparemment distribuée sur le pourtour du bassin méditerranéen. Jusqu'à 1950 plusieurs articles démontrent le caractère génétique de la maladie.

Les formes graves initialement décrites sont homozygotes et la description clinique associe une anémie grave, une déformation osseuse et les complications d'une surcharge en fer. Les hétérozygotes présentent à des degrés divers une anémie modérée.

Les β -thalassémies ont le plus souvent pour origine moléculaire une mutation ponctuelle (le gène est présent, mais ne fonctionne pas), les α -thalassémies se distinguent le plus souvent des précédentes par une absence totale du gène, on parle alors d' α thalassémies délétionnelles [8].

3. Implication thérapeutique des variants structurels de la chaîne

Beta-globine

En tant qu'une maladie autosomique récessive, les hétérozygotes de l' α ou de la β -thalassémie sont habituellement asymptomatiques et ne nécessitent aucun traitement.

Par ailleurs, l'association d'une thalassémie à une autre mutation de l'hémoglobine, comme l'Hb E, Hb C ou Hb S avec la β -thalassémie, ou l'Hb

Constant Spring (Hb CS) avec l' α -thalassémie donne aussi des tableaux de syndromes thalassémiques variables [9].

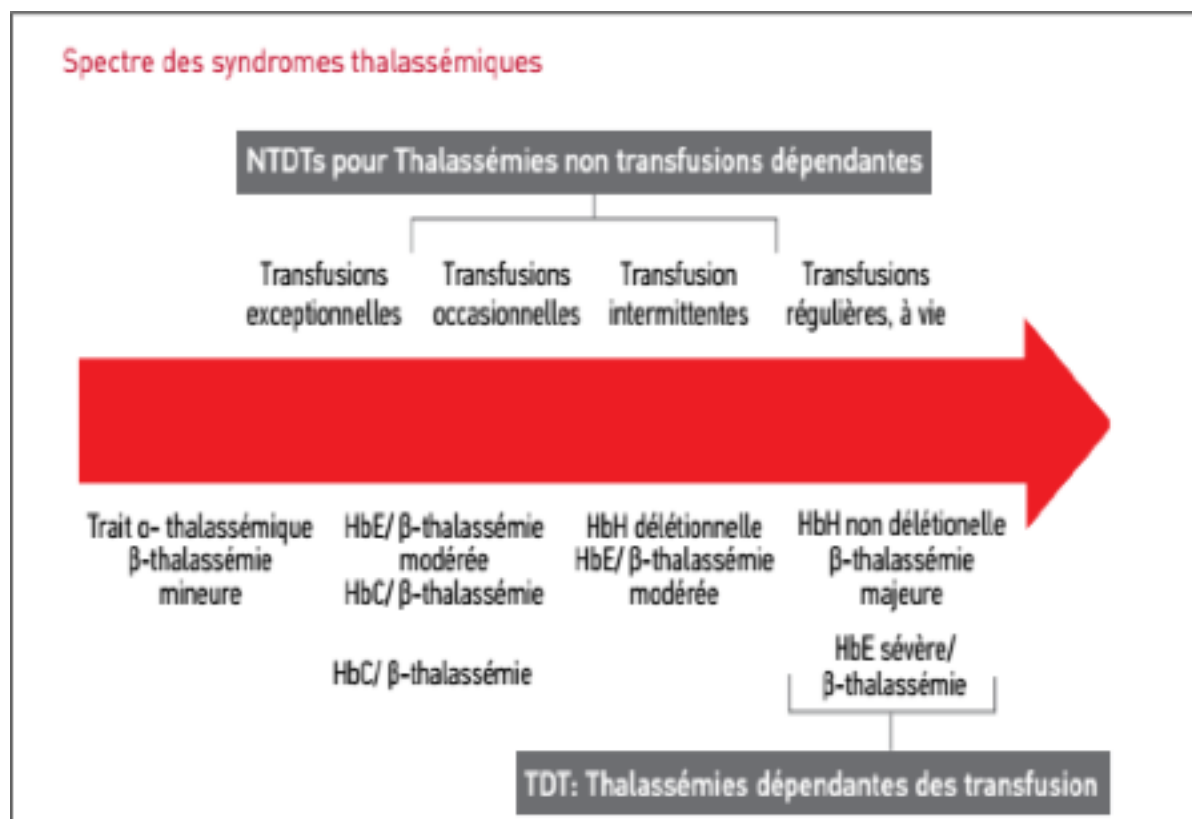


Figure 2 : Spectre phénotypique des syndromes thalassémiques basée sur leur sévérité clinique et la nécessité du recours à la transfusion [10].

3.1. L'hémoglobine E anormal

C'est le variant structural le plus important dans les thalassémies. L'HbE est caractérisé par la substitution d'une lysine pour un acide glutamique en position 26 sur le gène de la chaîne β -globine. Il en résulte une production réduite de variant d'hémoglobine HbE. Autrement dit la mutation du codon 26 G→A abouti à un défaut qualitatif et quantitatif du gène β -globine.

L'association entre l'HbE et la β -Thal a des manifestations cliniques variables [9], elle peuvent inclure un retard de croissance, un gonflement de la rate (splénomégalie) et du foie (hépatomégalie), une jaunisse, des anomalies

osseuses et des problèmes cardiovasculaires [10].

3.2. L'Hb Lepore

C'est un autre variant structurel qui résulte de la fusion entre les gènes δ et β globine. L'état homozygote pour l'Hb Lepore ou l'association Hb Lepore et β thalassémie peut induire un syndrome thalassémique à transfusion dépendant modéré à sévère [9].

3.3. L'hémoglobine S (HbS)

Le variant de l'hémoglobine le plus fréquent au monde. Il est la conséquence d'une substitution d'une valine pour un acide glutamique en position 6 de la chaîne β -globine. L'interaction entre la β -thalassémie et l'HbS induit un syndrome proche de la drépanocytose (Sickle cell-beta-thalassemia disease syndrome) [9].

Les patients avec ce syndrome peuvent présenter des crises douloureuses similaires à celles des patients atteints d'une drépanocytose [11], avec souvent des signes de lésions cérébrales silencieuses, appelées également « AVC silencieux » [12].

Actuellement, en fonction de leur sévérité clinique et de leurs besoins transfusionnels, ces syndromes de thalassémie peuvent être classés phénotypiquement en deux groupes principaux ; thalassémies dépendantes des transfusions (TDT) et thalassémies non dépendantes des transfusions (NTDT). Les TDT nécessitent une transfusion sanguine régulière pour survivre, les patients souffrent de plusieurs complications et d'une courte durée de vie. Cette catégorie comprend surtout les patients atteints de β -thalassémie majeure [9].

4. La β -thalassémie

Par définition, c'est une anomalie sanguine héréditaire monogénique qui peut provoquer une anémie. Elle affecte la capacité d'une personne à produire l'hémoglobine, la protéine des globules rouges qui transporte l'oxygène à toutes les parties du corps [9].

Elle est causée par des mutations au niveau du gène HBB localisé sur le chromosome 11 et transmis de façon autosomique récessive. La gravité de la maladie dépend de la nature de la mutation.

L'incapacité du corps à construire les chaînes β conduit à une sous-production de l'HbA, ce qui provoque une anémie microcytaire. En raison de cette anomalie, le patient peut nécessiter des transfusions sanguines régulières pour compenser la quantité insuffisante de l'hémoglobine normale.

Les transfusions sanguines répétées peuvent mener à une surcharge en fer, entraînant finalement une toxicité ferreuse qui peut causer divers problèmes, y compris la sidérose myocardique et l'insuffisance cardiaque avec un risque de mortalité. Les nouveau-nés non traités ont un risque plus élevé de mourir pendant les deux premières années de leur vie [13].

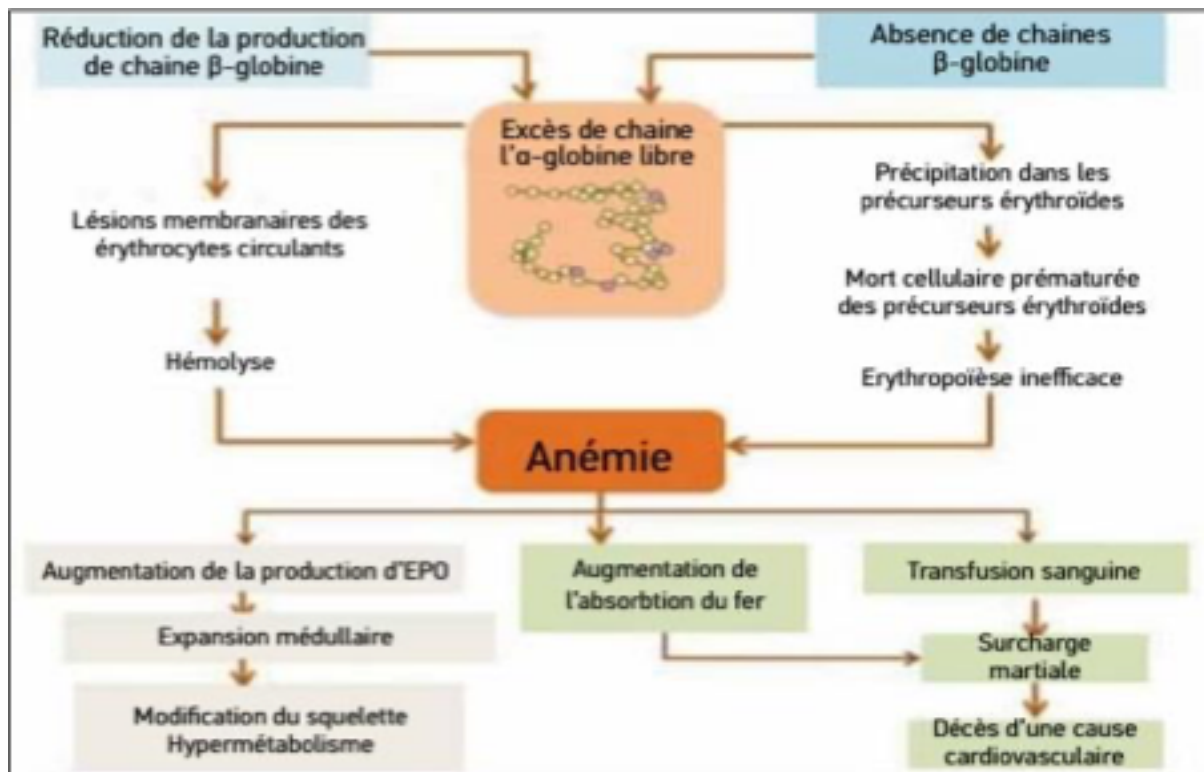


Figure 3 : Conséquences de l'excès de production de chaînes d'α-globines libres dans la bêta- thalassémie [10].

4.1. Hétérogénéité phénotypique

Le syndrome comprend trois formes principales de niveaux de sévérités différents : la thalassémie majeure qui est parfois nommée « anémie de Cooley » ou « anémie Méditerranéenne », la thalassémie intermédiaire, et la thalassémie mineure aussi appelée « trait β-thalassémique », « porteur β-thalassémique » ou « β-thalassémie hétérozygote » [9].

Les symptômes de la β-Thal sont graves dans la forme majeure et moins grave sous la forme intermédiaire [14]. Les signes cliniques de la forme majeure apparaissent au cours des deux premières années de la vie. Les personnes atteintes de β-Thal intermédiaire peuvent ne présenter aucun symptôme ou uniquement signes légers pendant l'enfance et l'adolescence [15].

4.2. La distribution Géographique

La fréquence maximale est observée dans les pays à forte endémie paludéenne car les porteurs hétérozygotes de β -Thal (trait thalassémiques) semblent être protégés contre les formes graves de paludisme [16].

La β -Thal a été observé dans presque tous les groupes ethniques. Cependant, elle est plus fréquente dans les régions tropicales et les régions proches, l'Asie, l'Afrique et la région méditerranéenne. Ainsi, les régions géographiques de la Méditerranée, certaines parties de l'Afrique du Nord et de l'Ouest, le Moyen-Orient, le sous-continent indien, l'Extrême-Orient et l'Asie du Sud-Est sont appelées la ceinture de thalassémie du monde (Fig.4).

Au Maroc, comme dans le reste de l'Afrique du Nord, le syndrome a été sélectionné à cause du paludisme et amplifié par l'endogamie [17]. Le paludisme exerce une pression sélective par procuration d'un avantage de survie aux porteurs des hémoglobinopathies [18].



Figure 4 : Répartition mondiale des origines des thalassémies α et β . (De Weatherall et Clegg 2001) [9].

4.3. Incidence

L'incidence la plus élevée a été signalée à Chypre et en Sardaigne avec une fréquence de 14,0 et 12,0%, respectivement [19].

Globalement, l'OMS a estimé qu'il y a environ 150 millions porteurs d'un gène de la β -Thal. L'incidence annuelle totale des individus symptomatiques est estimée à 1 sur 100 000. Des enquêtes récentes suggèrent que 23 000 bébés naissent avec une β -TM et que jusqu'à 90% de ces naissances surviennent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire [20].

L'épidémiologie actuelle de la thalassémie est étonnamment différente de celle du passé. La thalassémie est maintenant un groupe hétérogène de maladies avec des ethnies, des phénotypes et des traitements variés [21]. Aucune donnée épidémiologique précise n'est disponible pour la population marocaine, la fréquence du gène est estimée entre 1,5 à 3,0 [22], [23].

Le centre de référence des thalassémies est installé à l'hôpital d'enfants de Rabat, au sein du service d'hématologie et d'oncologie pédiatrique dirigé par le Professeur Mohammed Khattab. Le nombre de patients atteints de thalassémies majeures recensés et traités par ce centre depuis sa création, en 1990, s'élève à 300, avec 15 à 20 nouveaux cas par an enregistrés chaque année et quelques 105 patients traités actuellement. Malheureusement, au Maroc comme ailleurs, tous les malades ne sont pas encore diagnostiqués et traités [24].

4.4. Prévention

La β -Thal est une maladie évitable, un fait bien démontré par des pays tels que l'Italie, la Grèce et Chypre, qui ont été parmi les premiers à établir avec succès des programmes nationaux, en réduisant de manière significative la naissance d'enfants touchés, dans certains cas, à près de zéro (Figure5) [14].

L'OMS a montré que, sans les programmes de prévention pour limiter le nombre de naissances d'enfants affectés ; la plupart des pays ne pourra pas se permettre d'offrir un traitement optimal à tous les patients atteints de thalassémie. Un programme de prévention efficace est donc indispensable pour couvrir les coûts de traitement des patients existants [14].

Au Maroc, la principale difficulté pour les patients réside dans l'accessibilité aux soins (distance) et aux traitements chélateurs (coûteux). Pour permettre une meilleure prise en charge des patients qui coûte des millions de dirhams , le ministère de la Santé a mis en place un plan d'action national de lutte contre les maladies héréditaires de l'hémoglobine du sang qui vise la généralisation de leur prise en charge [7].

Ce programme national est indispensable pour éradiquer cette maladie grâce à une sensibilisation et à un dépistage de masse ou, à défaut, des personnes à risque [24].

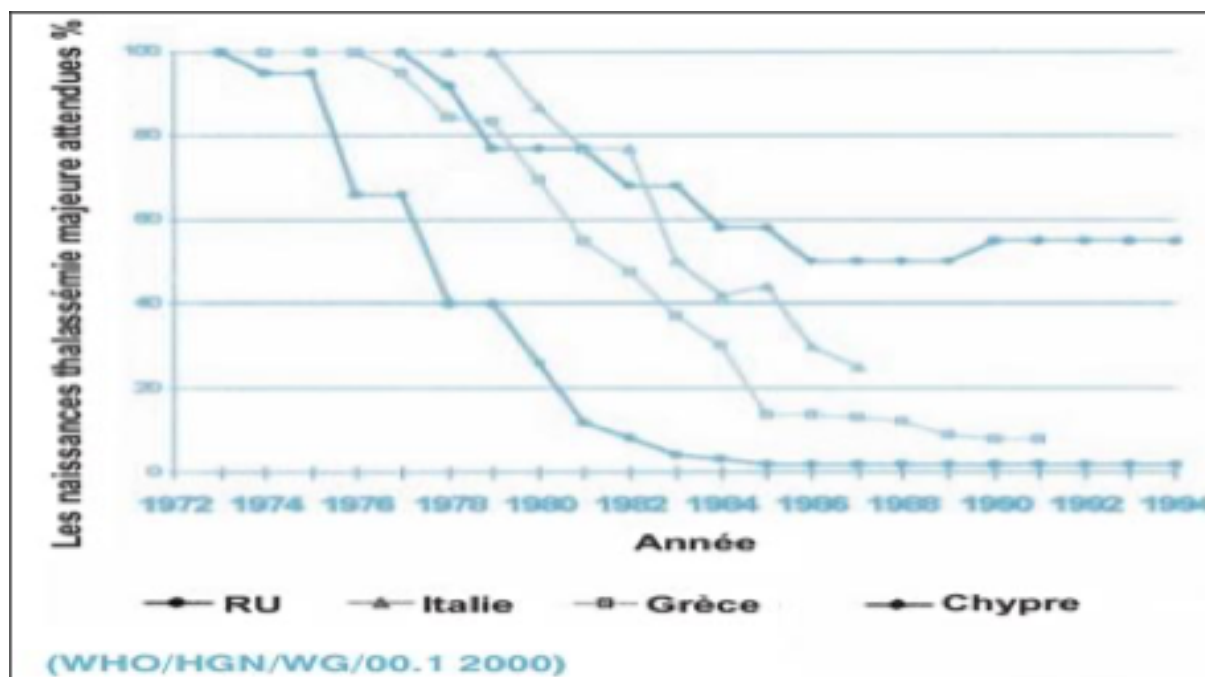


Figure 5 : Le taux de naissances d'enfants touchés au cours des années [15].

5. Physiologie :

5.1. Physiologie de l'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb), qui constitue environ 98% de la protéine totale dans le cytoplasme des érythrocytes, est responsable du transport de l'oxygène dans la circulation sanguine. L'Hb est un tétramère constitué de deux chaînes polypeptidiques α et deux β associées à l'hème (Figure 6).

Il existe généralement plusieurs formes d'Hb qui diffèrent par la composition des chaînes polypeptidiques et sont ajustées pour le transport de l'oxygène dans différentes conditions et à différents stades du développement embryonnaire (HbA1, HbA2 et HbF) [25].

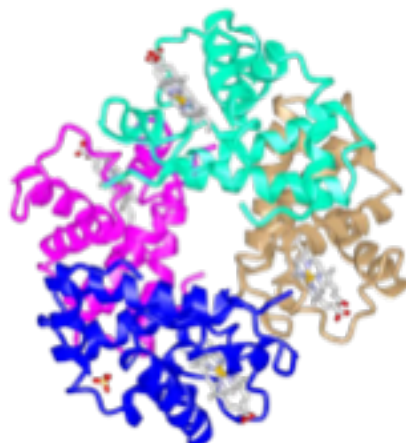


Figure 6 : Structure 3D du protéine Hb (PDB).

Les différentes chaînes des globines apparaissent de façon séquentielle lors de l'ontogénèse (α , β , δ , γ). Elles forment après association des différentes paires ; les quatre classes majeures d'hémoglobine (Figure 7) [9]:

Chaîne « α »	Chaîne « non- α »	Hb	Nom de l'hémoglobine	Produite durant
ζ	ϵ	$2\epsilon 2$	Gower 1	8 premières semaines de gestation
α	ϵ	$\alpha_2\epsilon_2$	Gower 2	8 premières semaines de gestation
ζ	γ	$\zeta_2\gamma_2$	Hb Portland	Premières semaines de gestation et dans l'érythroblastose fœtale due à la thalassémie α homozygote
α	γ	$\alpha_2\gamma_2$	HbF	Hb dominante dès 6 semaines de gestation jusqu'à la naissance, < 1% dans les adultes sains
α	β	$\alpha_2\beta_2$	HbA	Jusqu'à 10% dans les fœtus normaux dès 8 semaines de gestation. Hb dominante dans les adultes sains
α	δ	$\alpha_2\delta_2$	HbA2	Hb mineure formée 30 fois moins que l'HbA et reliée à elle. <3% dans les adultes

Figure 7 : L'assemblage des différentes chaînes entre elles est responsable de la synthèse de différents types d'hémoglobine [26].

5.2. Biosynthèse et Commutation

La synthèse de l'hémoglobine fait intervenir un ensemble complexe d'étapes. L'hème est issu d'une suite de réactions qui commencent dans les mitochondries et se poursuivent dans le cytosol d'érythrocytes immatures, tandis que l'apoprotéine est produite au niveau du ribosomes du cytosol. La production d'Hb se produit aux premiers stades de l'érythropoïèse, depuis le stade proérythroblaste jusqu'au stade réticulocyte dans la moelle osseuse [26].

La production séquentielle de différents sous-types d'hémoglobine selon les périodes de développement est appelée commutation ou « hemoglobin switching » (Fig.8) et « gene switching » lorsqu'on parle de gène.

Sous les conditions standards, les érythrocytes d'un adulte contiennent approximativement 97–98% d'HbA, 2–3% d'HbA2 et des traces d'HbF [9]. Chez l'adulte l'Hb normale majoritaire est l'HbA. Les valeurs normales des fractions hémoglobiniques mineurs de l'HbA2 et de l'Hb fœtale sont mesurées avec précision par la technique de chromatographie liquide de haute performance (HPLC). Ces valeurs varient en fonction de l'âge et permettent le diagnostic des anomalies de l'Hb.

Chez l'homme, la commutation de l'Hb (Fig.8) se déroule en trois étapes successives de l'érythropoïèse au cours des stades embryonnaires, fœtaux et adultes de l'ontogenèse. L'altération de l'expression équilibrée des gènes de la globine, qui se produit habituellement en raison de la détérioration des gènes de la β -globine adulte, conduit au développement des hémoglobinopathies [25].

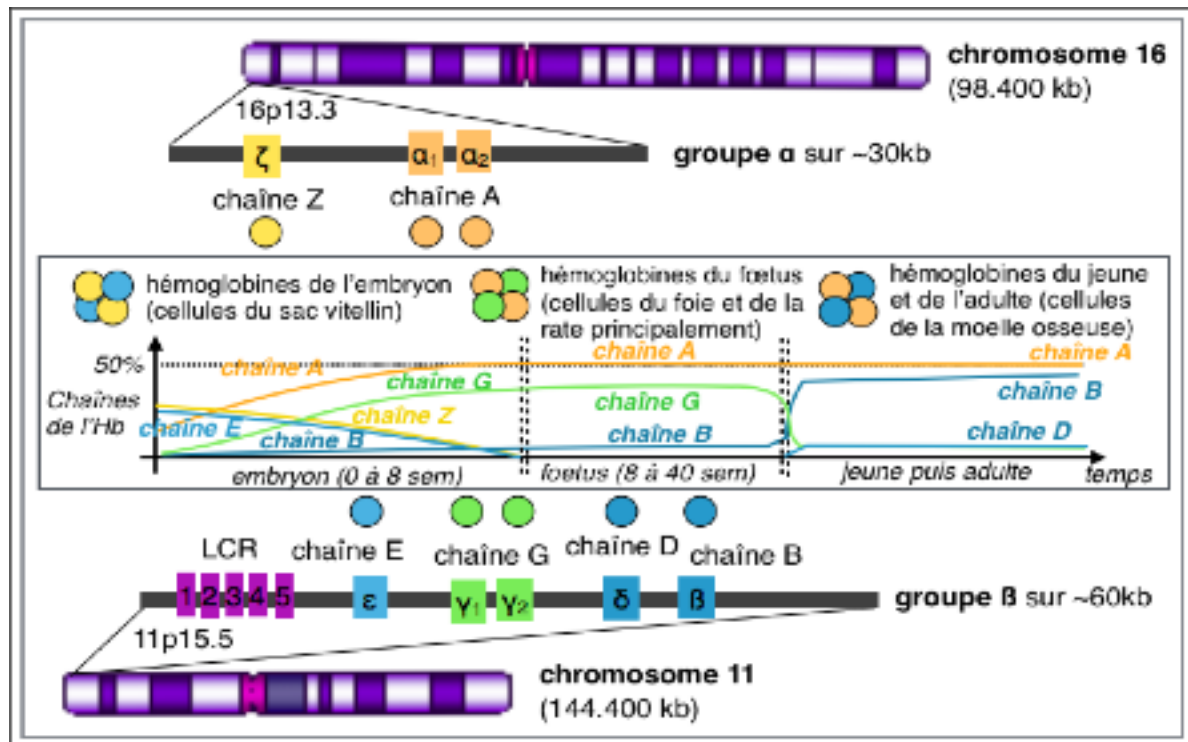


Figure 8 : Commutation de l'Hb avant et après la naissance [28](Wood W.G.).

5.3. Physiopathologie

La β -Thal correspond à un déficit ou une absence de production de la chaîne de la β - globine associé à un excès relatif des chaînes α -globines. Les conséquences directes sont une vraie diminution de la production d'hémoglobine et un déséquilibre de la synthèse des chaînes des globines, ce qui provoque une réduction de la concentration intracellulaire d'hémoglobine et du volume globulaire moyen. Le déséquilibre de la production des chaînes des globines a des conséquences importantes sur les précurseurs érythrocytaires ce qui aboutit au final à leur destruction précoce et massive à la fois dans la moelle osseuse mais aussi dans les sites extra-médullaires. Cette érythropoïèse inefficace est la caractéristique principale de la thalassémie. La première réponse à l'érythropoïèse inefficace et à l'anémie est l'augmentation de la production d'érythropoïétine aboutissant à une

hyperplasie érythroïde dont les conséquences potentielles sont une majoration de la splénomégalie, des déformations osseuses et du squelette, une ostéoporose et dans certains cas à la survenue de masses extra médullaires.

Les patients avec une thalassémie majeure non-traitée ou sous-traitée ont un retard de croissance résultant de l'anémie, mais aussi du surcroît de charge sur le métabolisme imposée par l'expansion des lignées érythroïdes. L'anémie peut induire une hypertrophie cardiaque et dans certains cas une insuffisance cardiaque. L'érythropoïèse inefficace est aussi associée à une augmentation de l'absorption du fer, via principalement une augmentation de l'absorption intestinale consécutive à une inhibition de la synthèse d'hepcidine. L'hepcidine est un peptide qui joue un rôle central dans l'homéostasie martiale [9].

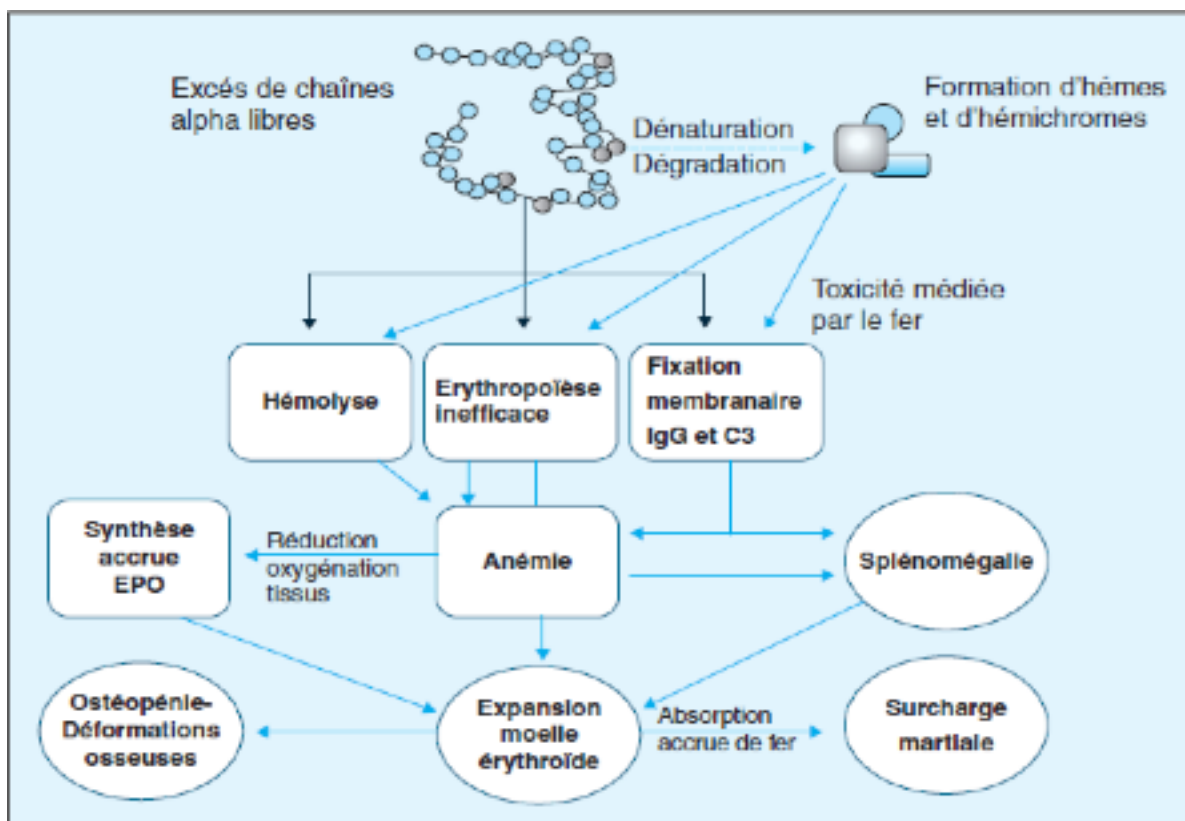


Figure 9 : Schéma de la physiopathologie des β -Thal [29].

5.4. Expression génique « Gene Switching » de l'hémoglobine

Les molécules d'Hb sont constituées de sous-unités de type globine dont la séquence diffère selon les espèces. Chez l'homme, la forme prépondérante de l'Hb est l'HBA ; elle est codée par les gènes HBA1, HBA2 et HBB situés sur le chromosome 16 pour les deux premiers, et sur le chromosome 11 pour le dernier [27].

Les gènes de la globine de type α et de type β dérivent donc tous d'un ancêtre unique (il y a environ 450 millions d'années), ce qui explique leur structure globale identique : 3 exons et 2 introns. Tous les différents gènes de globine sont issus de recombinaisons et/ou de duplications de ce gène ancestral unique [28].

Les gènes de la globine sont activés de façon séquentielle au cours du développement, passant de 5' à 3' sur le chromosome (Fig. 10). La combinaison de deux gènes alpha et de deux gènes gamma forme l'hémoglobine fœtale, ou l'hémoglobine F (HbF). Au moment de la naissance, la production de gamma globine diminue avec une augmentation de la synthèse de la bêta-globine. La combinaison de deux gènes alpha et deux gènes bêta comprend l'hémoglobine adulte normale, l'hémoglobine A (HbA) [29].

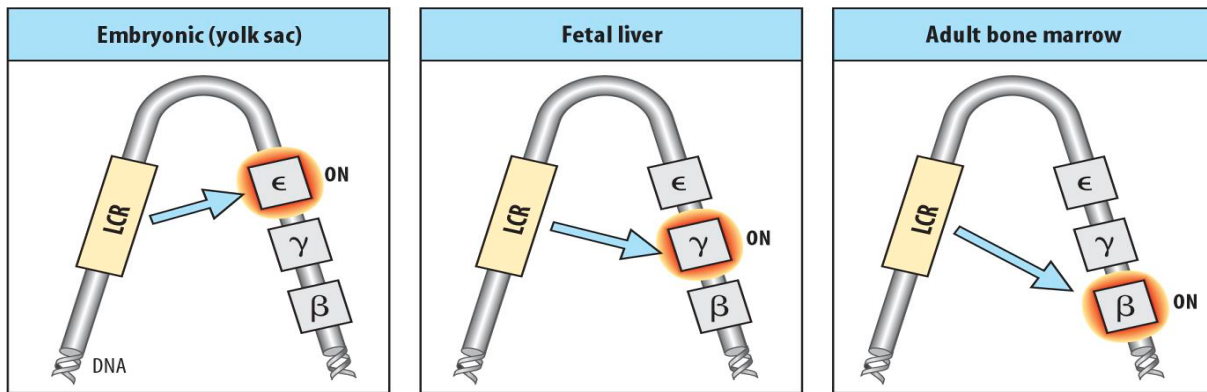


Figure 10 : L'expression séquentielle des gènes au cours du développement [33].

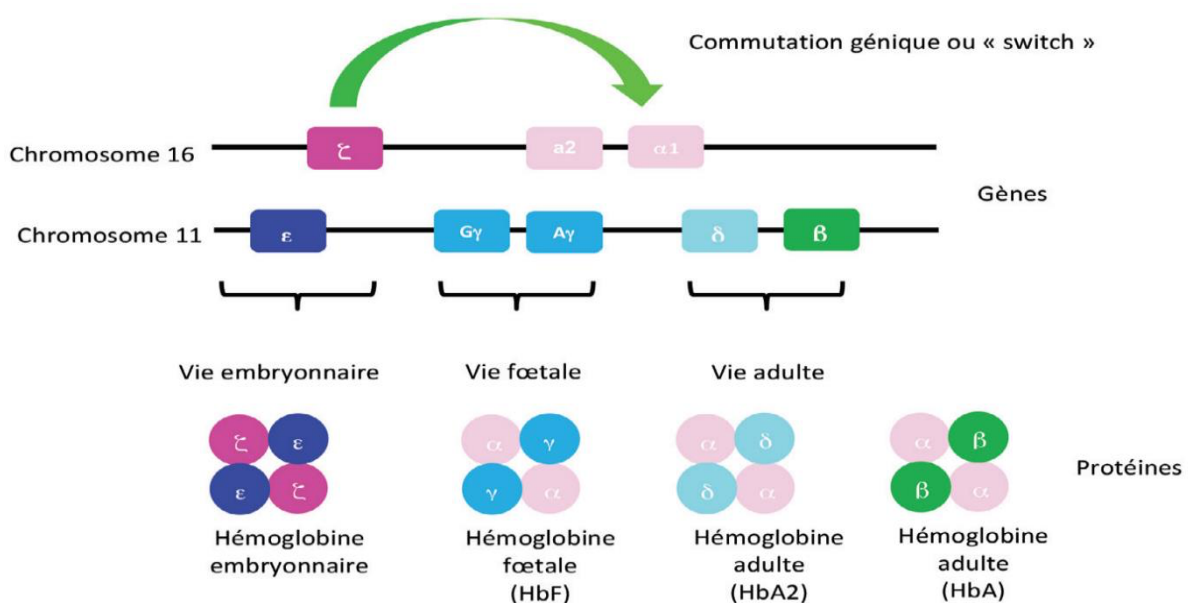
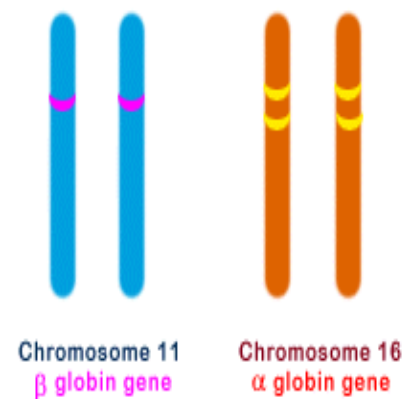


Figure 11 : Les différents gènes de globines et les différentes hémoglobines synthétisées [29].

6. Aspects génétiques

6.1. Les gènes de l'hémoglobine

La structure des chaînes des globines est codée par des gènes localisés sur les chromosomes 16 (cluster de gène α) et 11 (cluster de gène β).



La β -Thal résulte des mutations dans et autour du gène de la β -globine

(HBB) situé sur le bras court du chromosome 11 (11p15.4). Coordonnées génomiques (GRCh38) : 11 : 5 225 465–5 227 070 (NCBI).

La structure de tous les gènes de globine est similaire, **trois exons** et **deux introns** avec une taille d'environ **1600bp**, la principale différence étant que le deuxième intron est beaucoup plus long que le premier dans la famille β ; (intron 1 = 120 à 140 pb, intron 2 = 900 pb) alors qu'ils sont du même ordre de grandeur, moins de 150 pb (paires de bases), dans la famille α (Fig.12) [30].

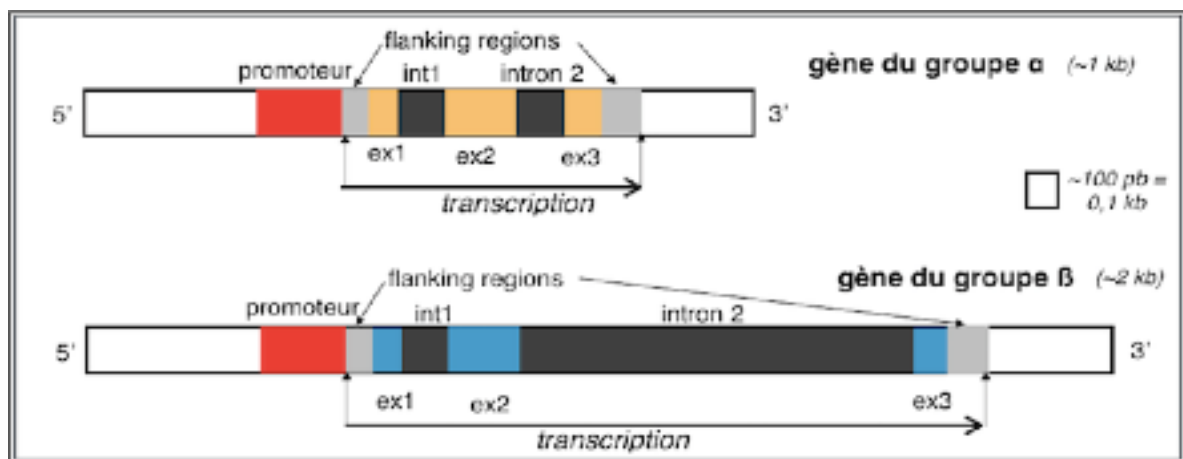


Figure 12 : Structure des gènes HBB et HBA [26].

6.2. Le gène HBB

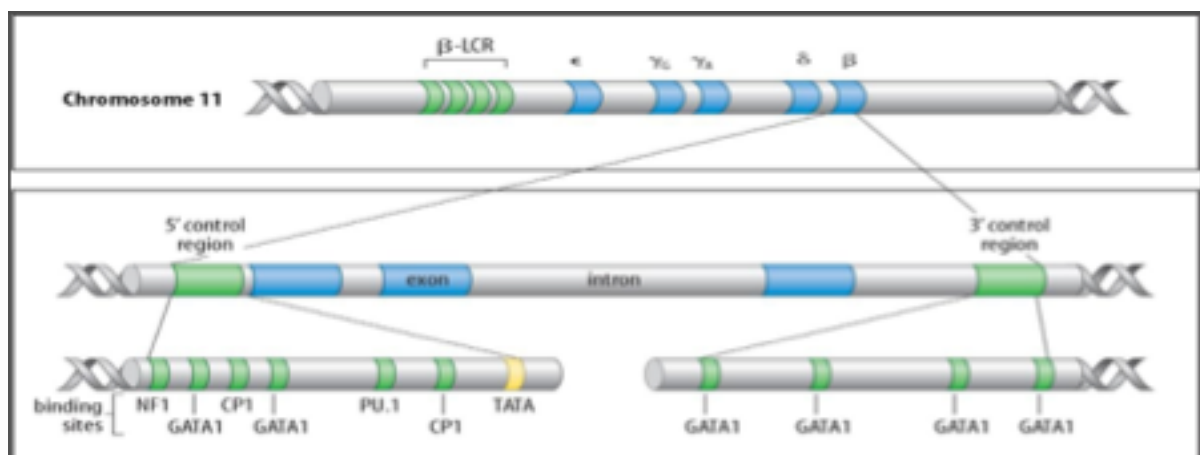


Figure 13 : Structure du gène HBB et des séquences régulatrices [26, p. 3].

Le gène HBB est régulé par un promoteur 5' adjacent dans lequel des boîtes TATA, CAAT et CACCC sont situées sous formes de séquences dupliquées (Fig.12–13).

Une région régulatrice majeure, contenant également un amplificateur fort et prend 50 Kb du gène .Cette région, appelée Région de Contrôle du Locus (LCR), contient quatre sites hypersensibles (HS) spécifiques à l'érythroïde (HSs), et qui ont une caractéristique de l'interaction ADN–protéine (Fig.13–14) [13].

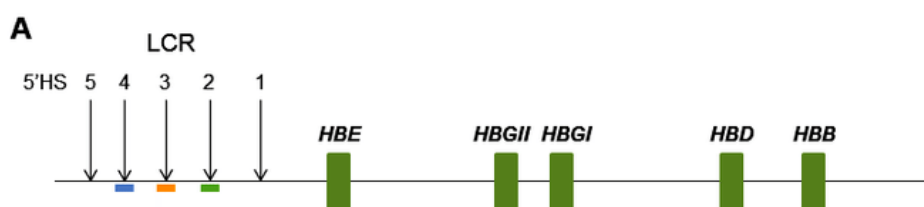


Figure 14 : la Région LCR du gène HBB [34].

6.3. Les mutations de l'HBB

Les β -Thal ont été parmi les premières maladies génétiques humaines à être examinées au moyen de nouvelles techniques d'analyse de l'ADN recombinant. Plus de 1800 mutations causatives dans les gènes responsables pour la synthèse de l'Hb ont été identifiées jusqu'à ce jour, environ 450 sont attribuées pour les thalassémies, dont 280 sont des mutations causatives pour les β -thalassémies (ITHANET 2018) [31].

Les mutations diminuent la production du gène de la β -globine en affectant divers stades de l'expression des gènes, partant de la transcription, et de la synthèse de l'ARNm, jusqu'à la traduction de l'ARNm et la stabilité de la protéine [32].

6.4. Distribution géographique des mutations

La répartition mondiale des différentes mutations est corrélée avec la distribution régionale et ethnique. En Méditerranée et au Moyen-Orient, IVS1 – 110 (G > A) et CD39 (C > T) sont signalés comme des mutations communes. IVS1–5 (G> C) est fréquemment trouvé en Asie du Sud et la mutation CD41 / 42 (–TTCT) est la plus commune en Asie du Sud-Est [33].

6.5. Description des mutations β -thalassémiques

Presque 300 mutations [34] dans et autour du gène de la β - globine et qui affectent les différentes étapes de l'expression génique provoquent la β -thalassémie [32]. La grande majorité des cas il s'agit de mutations ponctuelles (Point mutations) représentées dans plus de 90% par des substitutions, délétions ou insertions courtes (< 3 bases généralement). Les 10 % restants sont rares et sont constituées par des formes délétionnelles larges emportant tout ou une partie du locus HBB ou de la région LCR du β -globine qui gouverne la transcription de l'ensemble des gènes du cluster [28], [35]. Ces mutations peuvent être responsables de :

β^0 -Thal qui conduit à l'absence totale d'expression des chaînes β -globine.

β^+ -Thal responsable d'une diminution de l'expression des chaînes β -globine.

Selon l'intensité de la réduction de la synthèse du chaîne β , les mutations β -Thal peuvent être divisées en sévère, légère et silencieuse [13].

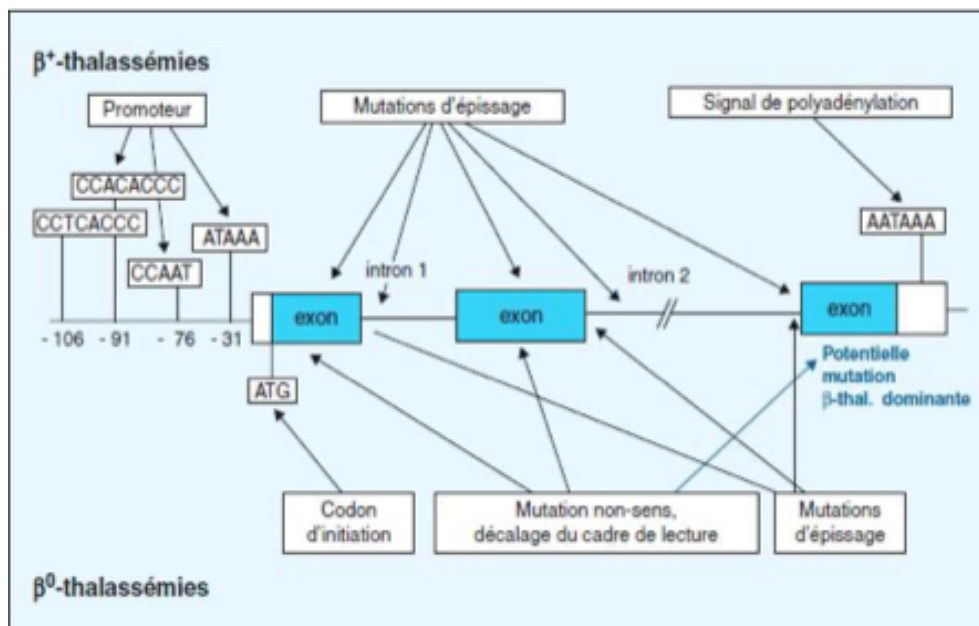


Figure 15 : Les différents types de mutations bêta-thalassémiques [31].

6.5.1. Les mutations ponctuelles

Mutations affectent l'expression de la β -globine, et appartiennent à trois catégories principales :

- Les mutations qui provoquent une transcription déficiente du gène β (promoteur et mutations 5'UTR).
- Les mutations qui affectent la synthèse de l'ARN messager (ARNm) (jonction d'épissage et mutations de séquences consensus, polyadénylation et autres mutations de 3'UTR),
- Les mutations qui donnent une traduction d'ARNm anormale (non-sens, décalage de cadre de lecture, et mutations de codon d'initiation) [13].

Ils sont présentés dans la Figure 16 selon le type, la position et la sévérité [36]:

Mutations transcriptionnelles

Mutations impliquants les séquences d'ADN conservées qui forment le promoteur du β - globine (100 pb en amont du site d'initiation de la transcription, y compris les boîtes CACCC, CCAAT et ATAA) et l'étirement de 50 nucléotides dans les 5'UTR. En général, les mutations du promoteur du gène de la β -globine dans la boîte CCAAT provoquent le phénotype léger de la β -Thal.

Mutations affectants la synthèse d'ARNm

Une grande variété de mutations interfère avec le processus de synthèse d'ARNm primaire. Celles qui affectent les dinucléotides invariants GT ou AG à la jonction d'épissage exon-intron abolissent complètement l'épissage normal et produisent le phénotype de la β^0 - Thal.

Mutations affectants la traduction d'ARNm

- Mutations affectants le codon d'initiation

Les mutations affectants le codon d'initiation (ATG) produisent toutes une β^0 -Thal. La plus commune est une mutation qui implique une insertion de 45 pb entre les positions -22 à +23, affectant ainsi le codon d'initiation. Les autres sont des substitutions de base unique, deux affectants le premier (A), trois le deuxième (T) et trois le troisième (G) d'ATG.

- Codons stop prématurés

Environ la moitié des allèles β^0 -Thal résultent de l'introduction de codons de terminaison prématurés, soit en raison de mutations directes

créant un codon stop, soit d'une modification du cadre de lecture par insertion ou délétion d'un singulet de quelques nucléotides. L'une des premières mutations non-sens à caractériser et à étudier de manière approfondie est la mutation au niveau du codon 39 (CAG à TAG).

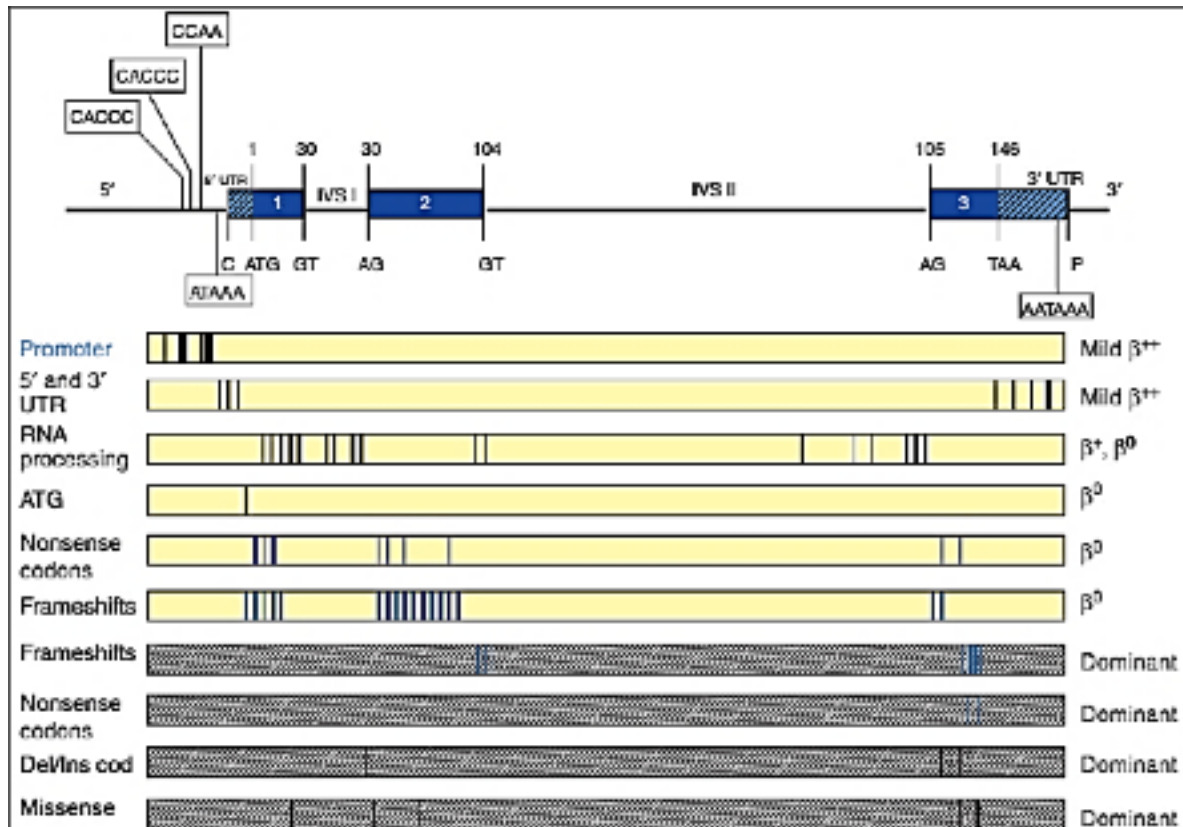


Figure 16 : Mutations ponctuelles responsables de β -Thal. Le gène de la β -globine est représenté dans le panneau supérieur avec des séquences conservées dans les 5' et 3' UTR, et les dinucléotides invariants dans les jonctions exon-intron du gène, importants dans le contrôle de l'expression des gènes. Les boîtes représentent les différentes catégories de mutations. Les lignes verticales à l'intérieur des boîtes représentent les sites des différentes mutations. Les mutants hérités de manière dominante se trouvent dans des cases ombrées [39].

6.5.2. Les mutations délétionnelles

Contrairement au α -Thal, les β -Thal sont rarement causées par des délétions majeures de gènes à deux exceptions près : un groupe de délétions limitées au gène de la β -globine et un second groupe de délétions plus larges affectant l'amont β LCR avec ou sans le gène de la β -globine [36].

- Les délétions qui affectent seulement le gène de la β -globine vont de 105 pb à ~ 67 kb. Le phénotype associé à ces délétions est celui de la β^0 -Thal.
- Les délétions en amont du gène, ce groupe de délétions affecte la région de contrôle du locus régulateur en amont (β LCR).

L'expression du gène de la β -globine est perturbée avec tous les gènes de globine liés dans le groupe sur le chromosome 11p, en tant que partie de la (ϵ , γ , δ , β) β^0 -Thal [1].

Deletions

Deletions confined to β -globin gene	β^0	- 619 bp deletion
Deletions extending to other genes	β^0	($\epsilon\gamma\delta\beta$) 0 -thalassemia, ($\delta\beta$) 0 -thalassemia
Deletions of the LCR	β^0	

Figure 17 : Les formes des mutations délétionnelles [36].

6.5.3. β -Thalassémie silencieuse

Les hétérozygotes pour les β -Thal "silencieuses" n'ont pas de phénotype hématologique évident, la seule anomalie étant un léger déséquilibre de la synthèse de la chaîne globine. Les allèles β -Thal "sil" ne sont pas communs sauf pour le C→T mutation à la position -101 du gène de la β -globine, responsable de la plupart des formes légères pour les Méditerranéens [32].

6.6. Corrélation génotype-phénotype [35]

Les mutations de la β -Thal sont classées en 3 types d'allèles thalassémiques β^0 , β^+ et β^S (Silencieuse), selon le niveau d'expression du gène muté (Tableau 1). Certaines mutations diminuent beaucoup la production de la β -globine, d'autres moins, ce qui aboutit à des formes plus ou moins sévères de β -Thal.

Les mutations qui abolissent complètement la production du β -globine sont connues sous le nom de β^0 -Thal (sévère) et qui comprennent des mutations du codon d'initiation, des mutations non-sens, des décalages de cadre de lecture « frameshift » et des mutations impliquants l'épissage et la synthèse de l'ARN.

En revanche, les allèles β^+ -Thal sont caractérisés par une réduction légère à modérée des chaînes β causées par des mutations dans la zone du promoteur (CACCC ou boîte TATA), le signal de polyadénylation et les régions 5' ou 3' non traduites ou des anomalies d'épissage.

En outre, dans les mutations silencieuses, le déficit en chaînes β est tellement faible qu'il n'a quasiment aucune traduction biologique en termes d'indices érythrocytaires ou d'augmentation d'HbA2 [28].

Phénotype	Génotype	Sévérité clinique
β-Thal mineure	β^s / β^s ou β^s / β^+	Silencieuse
β-Thal intermédiaire	β^+ / β^+ ou β^+ / β^0	Modérer
β-Thal majeure	β^+ / β^0 ou β^0 / β^0	Sévère

Tableau 1 : La corrélation Phénotype- Génotype et la sévérité clinique [31].

Il faut distinguer ici les hétérozygotes des homozygotes ou hétérozygotes composites pour des mutations du gène HBB [35].

- Les patients porteurs d'une mutation hétérozygote dans le gène HBB sont des porteurs asymptomatiques qui présentent des indices érythrocytaires modifiés avec la présence d'une pseudo-polyglobulie, d'une microcytose et d'une hypochromie et à l'étude de l'hémoglobine, une fraction d'HbA2 > 3,2 %.

- Les patients porteurs d'une mutation homozygote ou de 2 mutations (hétérozygote composite) présentent une β -Thal de sévérité variable en fonction de la nature des mutations, pouvant aller d'une forme **intermédiaire β^+** à une forme **majeure β^0** .

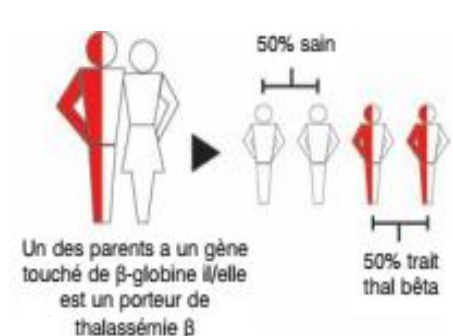
Il existe un continuum de sévérité entre le porteur sain et le patient β -TM en fonction de la nature des mutations dans le gène.

6.7. Transmission

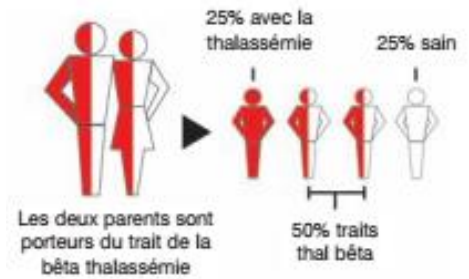
Les β -Thal ont une **transmission autosomique récessive**. Les personnes qui héritent d'une mutation β^+ de chacun de leurs parents développent à priori une forme atténuée de thalassémie. A l'opposé, ceux qui héritent de chacun de leur parent une mutation β^0 ne produiront quasiment pas de chaîne β et développeront sans doute une forme grave de thalassémie.

Si le patient hérite de deux mutations de gravité différentes, il est difficile de prédire quelle sévérité aura la maladie [14].

- Lorsque l'un des parents porte un allèle muté (porteur sain) et l'autre porte l'allèle normal ; chaque enfant né dans ce cas a une chance sur deux ou 50% de chance d'hériter le gène de la thalassémie du parent porteur, comme illustré.



- Si les deux parents sont hétérozygotes pour l'allèle muté ; pour chaque grossesse il y a une probabilité sur quatre (25% de chance) que l'enfant sera entièrement sain.



7. Caractéristiques cliniques [34]

Les β -Thal sont caractérisées par une synthèse réduite du β -globine entraînant une anémie hypochrome microcytaire, un frottis sanguin périphérique anormal avec des globules rouges nucléés et une réduction de l'HbA.

7.1. Forme majeure

Les personnes atteintes de β -Thal majeure ont une anémie sévère et une hépato-splénomégalie. Le diagnostic se fait en général dans les deux premières années de leur vie. Sans traitement, les enfants atteints ont un retard de croissance important et une espérance de vie minime.



Figure 18 : Hépato-splénomégalie [9].

Les manifestations cliniques sont des problèmes d'alimentation avec diarrhée et irritabilité. Des accès de fièvre récurrents associés à une splénomégalie. Chez les enfants on note une restriction de la croissance et un retard pubertaire. Le tableau chez l'adulte comprend une atteinte cardiaque (cardiomyopathie dilatée), hépatique (fibrose et cirrhose) et des glandes endocrines (insuffisance de la parathyroïde, de la thyroïde, de l'hypophyse et, plus rarement, des glandes surrénales).

7.2. Forme intermédiaire

Les personnes atteintes de β -Thal intermédiaire souffrent d'une anémie légère, par définition, les transfusions ne sont pas nécessaires ou seulement occasionnellement requises.

Les manifestations cliniques sont : pâleur, ictère, Cholélithiase, hépatomégalie et splénomégalie, anomalies squelettiques, ulcères de jambe, ostéopénie et ostéoporose, complications thrombotiques résultants de l'accumulation de fer...

8. Techniques de diagnostic

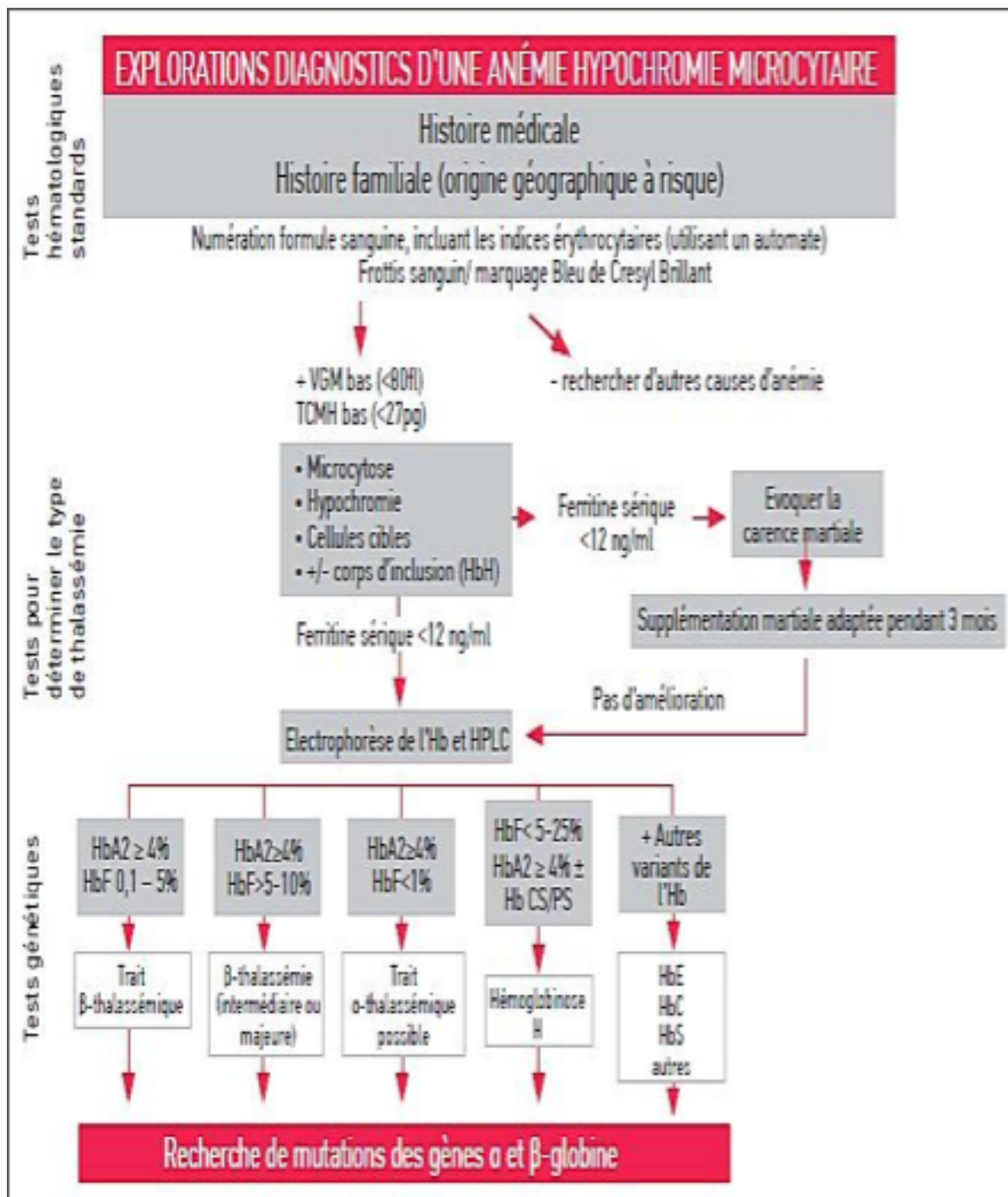


Figure 19 : Algorithme de diagnostic d'une hypochromie et d'une microcytose [10].

8.1. Techniques de diagnostic phénotypique :

8.1.1. Diagnostic hématologique [37]

Hémogramme : La numération sanguine ; un examen essentiel mettant

en évidence un éventuel dysfonctionnement de la moelle osseuse ou des perturbations dites "périphériques". Il est le premier examen donnant des renseignements utiles permettant de suspecter une anomalie hémoglobinique. Il s'effectue à distance de toute transfusion. Par ailleurs, le frottis sanguin, précieux outil de diagnostic cytologique permet de déceler les anomalies morphologique (taille, forme, coloration, inclusions) des hématies.

Les individus atteints montrent des aspects morphologiques de la microcytose, de l'hypochromie, de l'anisocytose, de la Poïkilocytose et des globules rouges nucléés (érythroblastes). Le nombre d'érythroblastes est lié au degré d'anémie et augmente de façon marquée après une splénectomie [34].

Les porteurs sains présentent une réduction du Volume Globulaire Moyen (VGM), de la Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH) et des changements morphologiques des érythrocytes moins sévères que chez les individus atteints. Les érythroblastes ne sont pas observés normalement [34]. Les valeurs habituellement retrouvées chez les patients thalassémiques figurent ci-dessous :

<u>β-Thalassémie Majeur :</u>	<u>β-Thalassémie Mineur :</u>
☐ Taux d'Hémoglobine <7 (Hb g/dL)	☐ Hommes : 11.5-15.3 (Hb g/dL) ☐ Femmes : 9.1-14 (Hb g/dL)
☐ Volume Globulaire Moyen 50-70 (VGM fl)	☐ <79 (VGM fl)
☐ Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine 12-20 (pg)	☐ <27 (TCMH pg)

Tableau 2 : Indices des globules rouges dans la bêta-thalassémie [38].

8.1.2. Analyse qualitative et quantitative de l'hémoglobine : biochimie

L'étude de l'Hb par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou par électrophorèse doit être pratiquée avant toute transfusion. Elle permet

le diagnostic de la β^- Thal : le pourcentage de l'HbF est constamment très augmenté pour l'âge : 50 à 98%.

Dans la maladie de Cooley, l'HbA est absente (β^0 -Thal), alors que dans les formes intermédiaires, il existe une basse concentration de l'HbA (1 à 70%) (β^{+-} -Thal). Le pourcentage de l'HbA₂ est souvent légèrement élevé (3 à 5%) [37].

<u>β-Thal Majeur :</u>	<u>β-Thal Intermédiaire :</u>	<u>β-Thal Mineur</u>
☐ HbA 0%	☐ HbA 10%-30%	☐ HbA 92%-95%
☐ HbF 95%-98%	☐ HbF 70%-90%	☐ HbF 0.5%-4%
☐ HbA ₂ 2%-5%	☐ HbA ₂ 2%-5%	☐ HbA ₂ >3.5%

Tableau 3 : Electrophorèse de l'HB chez les beta-thalassémiques : (Age >12 Mois) [38].

8.2. Tests de génétiques moléculaires

Le diagnostic des β -Thal est très compliqué en raison de la diversité génétique du gène HBB dans différentes régions géographiques et ethniques du monde [38].

Les mutations courantes du gène HBB sont détectées par un certain nombre de techniques basées sur la **réaction en chaîne par polymérase (PCR)**. Les méthodes les plus utilisées sont la technique du **dot blot** ou des amplifications avec des **amorces spécifiques** avec un set de **sondes** ou d'amorces complémentaires des mutations les plus fréquentes dans la population d'origine du patient évalué. Si l'approche ciblée échoue, un **séquençage des gènes** de la β -globine peut être réalisé [13].

D'autres méthodes en alternative au séquençage, sont aussi employées

pour la recherche d'une mutation connue, notamment la **PCR-RFLP** (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction), la **PCR en temps réel** avec révélation par **sondes fluorescentes spécifiques**, L'**HRM** (High Resolution Melting), présentée comme une méthode rapide, coûteuse mais efficace pour l'étude du profil de dénaturation d'un amplicon, **DGGE** (Denaturing gradient gel electrophoresis), **dHPLC** (denaturing high performance liquid chromatography) et **SSCP** (single-strand conformation polymorphism) sont parfois utilisée pour le génotypage des mutations ponctuelles [19].

Les délétions β -Thal les plus fréquentes sont identifiées par **Gap-PCR** ou **Reverse dot-blot** au moyen de trousse commerciales ou par des techniques comme la **QMPSF** (quantitative multiplex PCR of short fragments) [39]. La **PCR semi-quantitative** et la **MLPA** (multiplex ligation probe amplification) sont actuellement de plus en plus utilisées pour le criblage des délétions rares ou non encore décrites [40]. Les kits commerciaux de MLPA (comme ceux de MRC Holland) ciblent sélectivement les familles de gènes α et β -globine [39].

9. Traitement [28]

Dans les formes majeures, le principal objectif du traitement est de corriger l'anémie et de freiner l'érythropoïèse inefficace par un régime transfusionnel adapté, pour assurer à la fois une croissance staturo-pondérale et une vie normale.

Dans les formes intermédiaires, la prise en charge est moins bien définie

et l'intensité du traitement sera adaptée à la sévérité plus ou moins importante de la maladie.

9.1. Les transfusions de concentrés de globules rouges

Pour les patients atteints de forme majeure, l'administration de concentrés de globules rouges déleucocytés et phénotypés RH-KEL toutes les 3 à 5 semaines, associée au traitement chélateur du fer, constitue le traitement conventionnel. Le but est de maintenir en permanence un taux d'Hb > 9-10 g/dL chez l'enfant et > 8-9 g/dL chez l'adulte.

9.2. Le traitement chélateur du fer

Les patients atteints de TM et la majorité de ceux atteints de TI sont exposés à une hémochromatose plus ou moins importante, en raison respectivement des transfusions itératives ou de l'hyper-absorption intestinale de fer. Le but du traitement chélateur est donc de maintenir des concentrations tissulaires en fer n'induisant pas de lésions cellulaires. Il est débuté après 10 à 20 transfusions ou lorsque la ferritinémie dépasse 1 000 g/L, en règle après l'âge de 2 ans. Les différentes molécules disponibles pour la chélation du fer :

Type de mutation	Déféroxamine (DFO)	Défériprone (DFP)	Déférasirox (DFX)
1/2 vie/voie d'administration	20-30 min/voie parentérale (sous-cutanée ou IV)	2 à 3 h/voie orale	8 à 16 h/voie orale
Efficacité chélation foie/coeur	+++ / + Bonne tolérance à très long terme. Administration continue sur 24 h pour traiter les atteintes cardiaques	++ / +++ Cardio-protection supérieure au DFO avec amélioration de la fraction d'éjection systolique	+++ / ++ Maintient ou réduit la charge globale en fer avec contrôle du fer non lié à la transferrine
Toxicité	Principalement locale Quelques troubles neuro-sensoriels, sur la croissance et une augmentation des infections à <i>Yersinia E.</i> ont été aussi décrites	Agranulocytose : 1,7 % imposant une NFS hebdomadaire ; arthropathie : 15 % ; troubles gastro-intestinaux : 33 % ; augmentation des ALAT	Rash : 10 % ; troubles gastro-intestinaux : 20 % ; augmentation de la créatinine avec protéinurie : 36 % imposant une surveillance mensuelle ; augmentation des ALAT

Tableau 4 : Principales caractéristiques des trois molécules chélatrices du fer [31].

9.3. La greffe de cellules souches hématopoïétiques

La greffe allogénique de CSH (voir Figure 19 en bas) reste actuellement la seule thérapeutique curative de la maladie et les premières greffes de patients TM remontent à plus de 30 ans.

La moelle osseuse ou le sang de cordon donnent des résultats à peu près équivalents, mais on évitera en revanche d'utiliser des CSH obtenues à partir de sang périphérique en raison d'un risque accru de réaction chronique du greffon contre l'hôte.

Aujourd'hui, la recommandation est de greffer dès que possible un enfant TM dès lors qu'il a un frère ou une sœur HLA-compatible puisque la probabilité de survie sans maladie après greffe géno-identique dépasse les 80 % pour les enfants de moins de 14 ans [28].

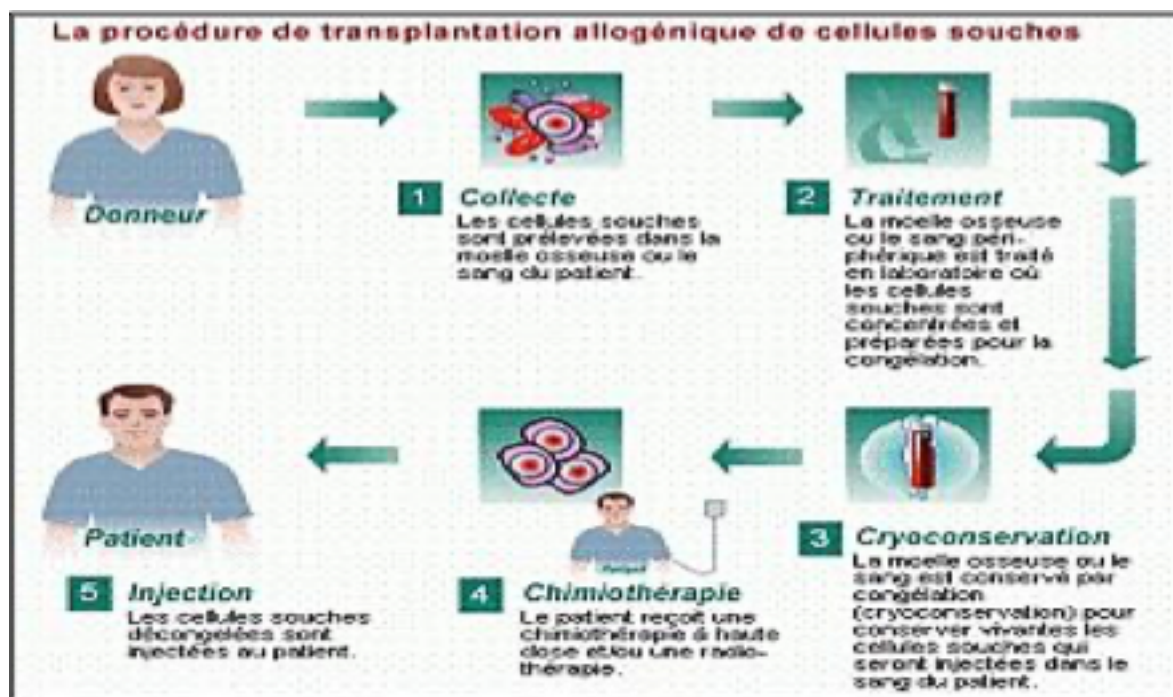


Figure 20 : Schéma représentant La greffe de cellules souches hématopoïétiques [31].

9.4. La splénectomie

Elle est rarement indiquée dans la TM, puis que le régime transfusionnel adapté permet dans une grande majorité de cas de réduire la splénomégalie. Elle est néanmoins proposée en cas d'hypersplénisme (thrombopénie, neutropénie, splénomégalie) ou pour abaisser les besoins transfusionnels quand ceux-ci dépassent 200 ml/kg/an (volume calculé pour des concentrés globulaires à 75 % d'hématocrite). Elle a pendant longtemps été fréquemment proposée dans les TI, pour réduire le degré d'anémie et donc limiter ou stopper les transfusions occasionnelles [28].

9.5. Traitements médicamenteux

Swee Lay Thein a écrit en 2012 une excellente revue générale décrivant les grandes classes de médicaments qui induisent une augmentation de la synthèse d'HbF.

On distingue schématiquement 3 classes avec des mécanismes d'action distincts :

- Les agents cytotoxiques et/ou hypométhylants parmi lesquels on trouve l'hydroxyurée (HU), la décitabine et la 5-azacytidine.
- Les dérivés des acides gras à chaîne courte avec un effet inhibiteur des histones déacétylases (HDAC). Les principales molécules de cette classe sont le phénylbutyrate de sodium, le butyrate d'arginine et l'isobutyrate.
- L'érythropoïétine recombinante.

Toutes ces molécules ont montré une capacité d'augmentation du taux d'HbF de 1 à 5 g/L par rapport au taux de base après un traitement d'au moins 3 à 6 mois.

9.6. La thérapie génique [41]

La première tentative réussie de thérapie génique dans la β -Thal a été réalisée en 2007 chez un patient thalassémique transfusion dépendant [35]. La thérapie génique est l'une des approches les plus prometteuses pour le traitement futur des patients β -Thal, le domaine est arrivé à la croisée des chemins avec l'initiation d'essais cliniques, le plafonnement possible des améliorations progressives de la thérapie d'augmentation de gènes et l'application préclinique croissante de nouveaux outils d'édition du génome.

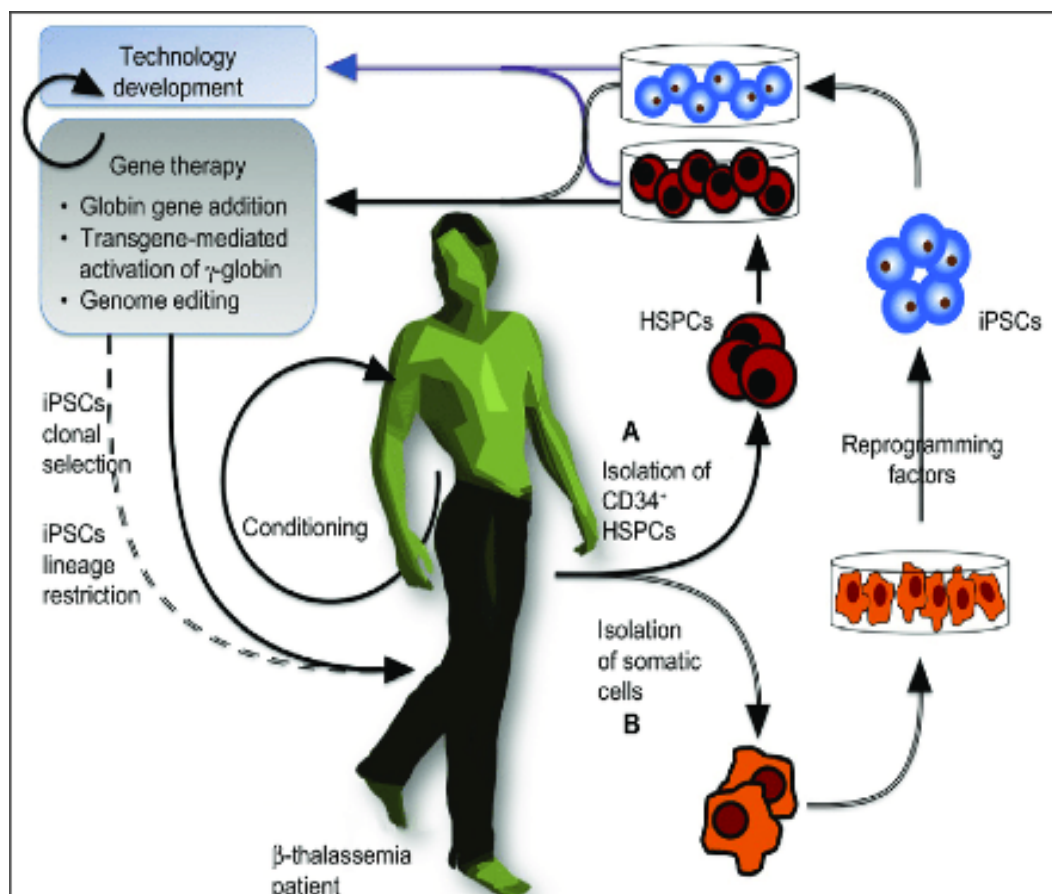


Figure 21 : Vue générale d'une approche de thérapie génique pour la β -Thal [44].

Les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques adultes (HSPC) ou les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) peuvent faire l'objet d'approches de thérapie génique. (A) Les HSPC et les sous-populations CD34⁺ peuvent être corrigés directement par thérapie génique. (B) En variante, les cellules somatiques peuvent être isolées et reprogrammées en pluripotence, les CSPi résultants étant alors un substrat spécifique au patient pour la thérapie génique, la sélection clonale et la différenciation spécifique de la lignée. À l'exception des flèches circulaires, les flèches pleines indiquent les procédures pour les HSPC et les flèches creuses pour les CSPi. Les flèches circulaires s'appliquent aux HSPC et aux iPSC. L'application des CSPi de β -Thal aux patients est toujours en attente, comme indiqué par des flèches en pointillé.

PARTIE PRATIQUE :

1. MATERIELS ET METHODES :

1.1. Critères d'inclusion et d'exclusion des patients :

Notre travail est une étude rétrospective portant sur 35 patients atteints de β -thalassémie recrutés durant la période s'étalant entre Mars 2018 et Mars 2019. 34 patients sont suivis à l'unité d'hémo-oncologie du service de pédiatrie du CHU Hassan II alors qu'un seul cas nous a été adressé du service de médecine interne du même CHU. Le diagnostic a été posé devant les signes cliniques, les données de l'hémogramme et de l'électrophorèse de l'hémoglobine. La majorité des patients ont bénéficié d'une consultation génétique.

Ont été exclus de l'étude les patients atteints d'autres hémoglobinopathies telles que la drépanocytose et l'hémoglobinoase C et aussi ceux dont le diagnostic a été évoqué mais non confirmé par l'électrophorèse de l'hémoglobine et ceux n'ayant pas accepté de participer à notre étude.

1.2. Prélèvement :

Avant tout prélèvement, une fiche qui porte les renseignements du patient, son consentement ou celui de son tuteur, s'il est mineur, est remplie. Deux tubes EDTA de sang sont prélevés pour l'extraction de l'ADN, extraction qui peut se faire par kit ou par sel. Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou -20°C pour utilisation ultérieure.

1.3. Analyse statistique :

Tous les paramètres ont été recueillis dans un tableau Excel (Microsoft Office Excel 2010), permettant l'analyse statistique descriptive afin d'analyser

les particularités épidémiologiques, cliniques, biologiques, thérapeutiques, et évolutives des patients porteurs de cette affection ainsi que les complications à court et à long terme.

1.4. Ethique :

Le recueil des données a été fait à partir des dossiers médicaux des patients.

Un consentement oral pour l'inclusion des enfants de cette étude a été obtenu des parents ou tuteurs légaux. La confidentialité des données a été respectée tout au long de notre étude.

1.5. Techniques de préparation et de purification des acides nucleiques :

L'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Au niveau du laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique, l'extraction se fait selon deux méthodes : soit par SEL ou par KIT commercialisé (Invitrogen). Nous avons effectué l'extraction d'ADN par Kit pour obtenir une meilleure qualité de l'ADN et aussi pour rendre un résultat rapide aux patients.

1.5.1. Par Kit :

•Principe

C'est une méthode simple, rapide et avantageuse lorsqu'il y a un faible volume de sang. Le système utilise la technologie de la membrane de silice pour l'isolation simple et rapide de l'ADN génomique sans phénol-chloroforme.

•Réactifs nécessaires

Kit Pure Link™ Genomic DNA Kits contenant les solutions suivantes:

- Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer
- Pure Link™ collection tubes (2ml)
- Pure Link™ spin columns with collection tubes
- Pure Link™ Genomic Elution Buffer
- Pure Link™ Genomic Wash Buffer 1 (concentré)
- Pure Link™ Genomic Wash Buffer 2 (concentré)
- RNase A (20 mg/ml)
- Protéinase K (20 mg/ml)

•Protocole expérimental

- Lyse des cellules avec la protéinase K et le tampon de lyse :

Un bain marie à 55°C ou une étuve à 55°C doit être prévu(e)

- Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml :
- Ajouter 200 µL de sang ;
- Ajouter 20 µL de Protéinase K ;
- Ajouter 20 µL de RNase A ;
- Vortexer environ 15 secondes ;
- Incuber 2 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 200 µL de Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer

- Vortexer environ 15 secondes ;
 - Incuber 10 minutes à 55°C ;
 - Ajouter 200 µL d'éthanol absolu, Vortexer environ 5 secondes
- Adsorption de l'ADN sur la membrane :
- Mettre le mélange dans la colonne Pure Link™ et centrifuger 1 minute à 8000 rpm ;
 - Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2 ml (fourni dans le Kit) et jeter le tube contenant le filtrat;
- Elimination des contaminants résiduels :
- Ajouter 400 µL de tampon Wash Buffer 1 et centrifuger 1 minute à 8000rpm ;
 - Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat.
;
 - Ajouter 400 µL de tampon Wash Buffer 2 et centrifuger 3 minutes à 14000 rpm
 - Mettre la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 ml
;
 - Mettre 50 ou 100 µL de tampon Pure Link™ Genomic Elution Buffer et incuber 1 à 5 minutes à température ambiante ;
 - Centrifuger 1 minute à 8000 rpm ;

- Faire une 2^{ème} élution : remettre les 50 µL dans la colonne et centrifuger 1 min à 8000 rpm.
- Le stockage de l'ADN : à +4°C pour toute utilisation ultérieure (notons que pour un stockage prolongé il est préférable de conserver l'ADN à -20°C).

1.5.2. Dosage de L'ADN :

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet. Le maximum de cette absorption se situe à 260nm. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A_{260}/A_{280} est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8, tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0.

Au laboratoire, le « NANODROP » (Figure 22) est utilisé pour réaliser le dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté.



Figure 22 : Spectrophotomètre NANODROP (UGMO).

1.6. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR :

1.6.1. Principe :

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes :

- a. Dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ;
- b. Hybridation des amorces spécifiques

c. Polymérisation du brin complémentaire par l'enzyme polymérase.

A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

1.6.2. Conditions de la PCR :

Nous avons utilisé la technique PCR Séquençage (PCR Classique), en employant le KIT commercialisé « DreamTaq Green PCR », Master Mix prêt à l'emploi et qui contient un tampon optimisé, les dNTP, du MgCl₂, la Taq polymérase et l'eau (Water nuclease free).

Pour procéder à l'amplification de notre gène, la PCR a été réalisée et optimisée sur de l'ADN génomique préalablement dilué à 100 ng/μl en utilisant des amorces spécifiques pour la région étudiée. (Tableau 5)

Amorces	Séquence	Nombre de bases	T _m [°C]	Taux de GC
Sens	5'– CTGACACAACCTGTGTTCACT–3'	20	55.3	45%
Antisens	5'– TTCACCTTAGGGTTGCCC –3'	18	56.0	55.6%

Tableau 5 : Propriétés des amorces utilisées pour la réaction de PCR.

La réaction PCR a été effectuée et optimisée dans un volume final de 25 μl pour le mélange réactionnel (Tableau 6) qui est déposé au niveau d'un thermocycleur (Applied Biosystem) (Figure 23) selon un programme déterminé (Tableau 7).

Composants	Concentration	Volume (µl)
Tampon Green Taq	5 UI/µl	10
Eau (Water nuclease Free)	–	12
Amorce F	10 mM	1
Amorce R	10 mM	1
ADN (100ng/µl)	100 ng/µl	1

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel (volume totale de 25µl).

Etape	T[°C]	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	94	3 min	X1
Dénaturation	94	30 sec	
Hybridation	57	30 sec	X35
Elongation	72	1 min	
Elongation Finale	72	3 min	X1

Tableau 7 : Programme de cycle de température au niveau du thermocycleur (Applied Biosystem).



Figure 23 : Thermocycleur Applied Biosystem 2700 (UGMO).

1.6.3. Témoins de la réaction PCR :

Les témoins inclus pour chaque réaction PCR comprennent :

- ✓ Témoin positif qui a pour fonction de s'assurer des bonnes conditions de la PCR, ce témoin est représenté par l'ADN d'un sujet normal sain.
- ✓ Témoin négatif qui permet de s'assurer de l'absence de contamination, auquel il n'y a pas d'ADN.

1.6.4. Contrôle des produits PCR :

Les produits PCR sont contrôlés sur gel d'agarose 2 % en présence d'un marqueur de taille, qui permet de vérifier la taille et la spécificité du produit amplifié.

1.7. Séquençage d'ADN :

Pour dépister les différentes mutations dans le gène HBB, nous avons réalisé le séquençage des exons 1 et 2 ainsi que la partie intronique située entre ces deux exons. Le séquençage de la 1^{ère} génération : "Séquençage de Sanger automatisé" est la technique par laquelle nous avons séquencé notre gène.

Avant de séquencer nos produits PCR, il faut les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, de dNTPs et d'ADN polymérase est nécessaire, pour cela une réaction essentielle de purification doit être effectué.

1.7.1. Purification par ExoSAP® :

ExoSAP-IT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I(Exo)

qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres et en excès sans interférence avec les applications en aval.

1.7.2. Réaction de séquence par BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing:

Cette étape se déroule selon la réaction de Sanger qui repose sur l'incorporation aléatoire de didésoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP), présents dans le milieu réactionnel dont chacun est marqué par un fluorophore et dont le spectre d'émission lui est spécifique.

Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal, on les appelle des terminateurs d'élongation ou "BigDyeTerminators" ou "Dye-Labeled Terminator". Nous avons utilisé la technologie BigDye Terminator version 2 (Applied Biosystem : ABI).

La technologie BigDye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur. (Figure 24).

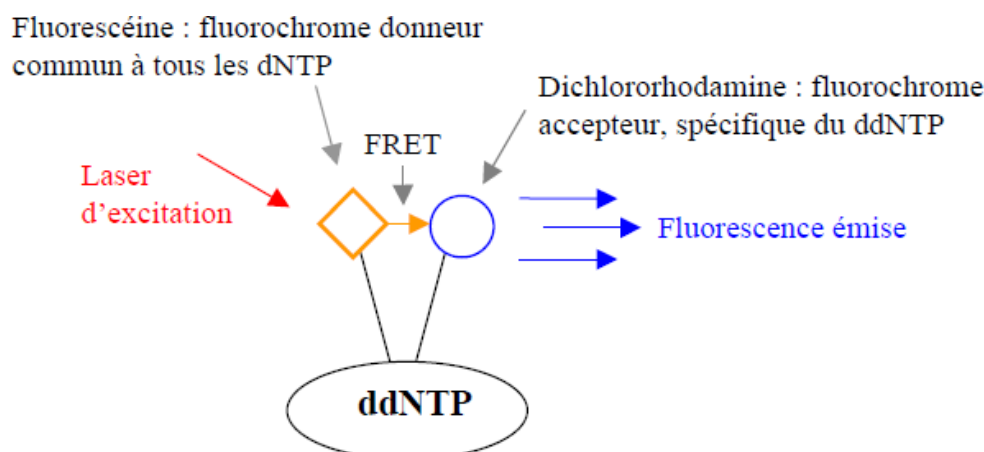


Figure 24 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515–520 nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP. (Figure 25).

ddNTP	dichloroRhodamines utilisées	Spectre d'émission maximum
A	dR6G	560-565nm
T	dROX	615-620nm
C	dR110	530-535nm
G	dTAMRA	590-595nm

Figure 25 : Caractéristiques des différents ddNTPs

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique.

25 cycles d'amplification sont effectués sur le thermocycleur dans des conditions spécifiques à la réaction de séquence. Un cycle correspond à :

- Une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 secondes pour obtenir l'ADN sous forme simple brin.
- Une étape d'hybridation à 50°C pendant 5 secondes (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées).
- Une étape d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase à 60°C pendant 3 min. Cette température faible ralentit la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP. Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence.

1.7.3. Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye–XTerminator :

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire.

1.7.4. Détermination de la séquence :

La plaque est placée dans le séquenceur (Figure 26) qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en

séquence par le logiciel d'analyse des séquences.

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur à 8 capillaires applied biosystem 3500 DX)



Figure 26 : Analyseur génétique Applied Biosystem 3500Dx (UGMO)

1.8. Analyse bio-informatique :

L'analyse des données de séquence a été réalisée par le logiciel Sequence Analysis (Figure 27)

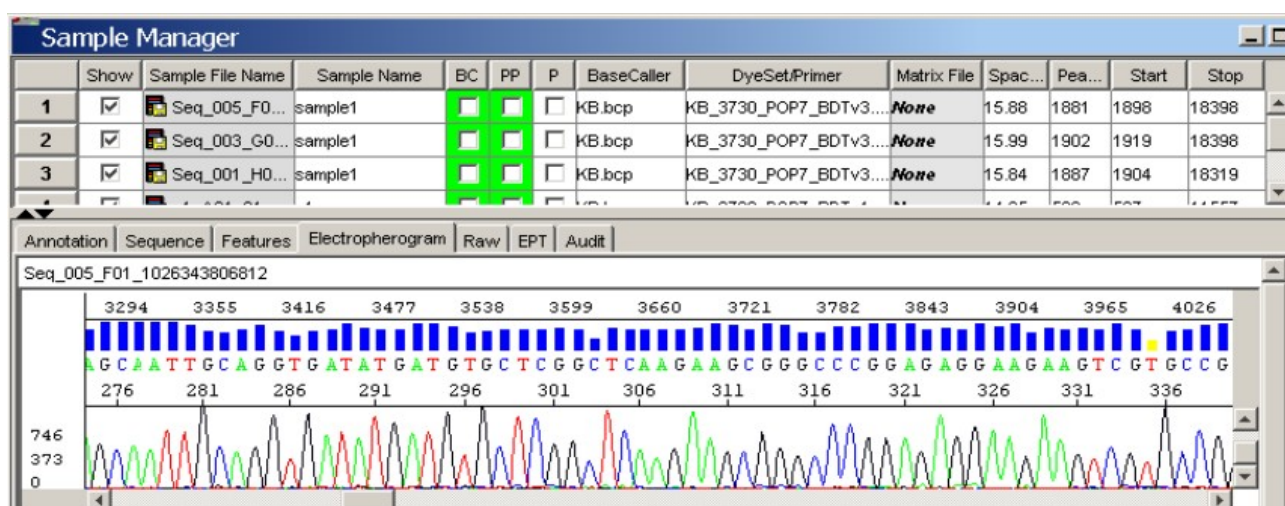


Figure 27 : Interface de Sequence Analysis Software.

Les données obtenues ont bénéficié d'une analyse par les outils suivants :

1.8.1. Logiciel BLAST (nucléotide BLAST)

Le logiciel blast permet de comparer une séquence nucléique dite requête à une banque de séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin+) et son complémentaire inversé (brin -).

1.8.2. Logiciel NCBI (CCDS database)

Ce logiciel permet de localiser la mutation au niveau de la partie codante du gène étudié et éventuellement de connaître l'acide aminé touché par la mutation sur la séquence protéique correspondante.

1.8.3. Logiciel NCBI (CCDS variation viewer)

Dès que la mutation est localisée, ce logiciel permet d'évaluer l'impact clinique de celle-ci (pathogénique ou pas), son origine (germinale ou somatique), son positionnement sur le génome entier et si elle a déjà été rapportée dans la littérature.

2. RESULTATS

2.1. Données épidémiologiques

2.1.1. Répartition des patients selon l'âge :

L'âge de nos patients varie entre 1 an et 37 ans, avec une moyenne de 8,68 ans. 80 % des cas ont un âge compris entre 0 et 12 ans. (Figure 28).

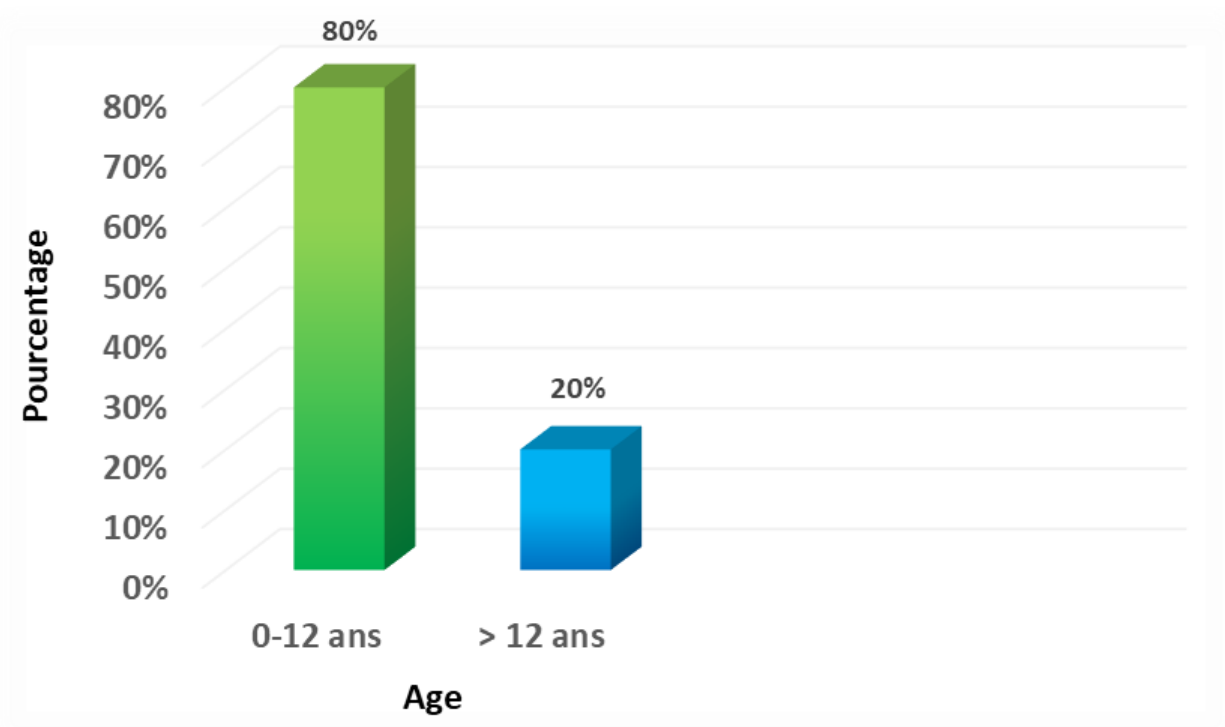


Figure 28 : Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction de l'âge.

2.1.2. Répartition des patients selon le sexe :

Les cas de notre série sont répartis en 19 patients de sexe féminin (54,3 %) et 16 patients de sexe masculin (45,7%). On note une prédominance féminine avec un sexe ratio M/F de 0,84.

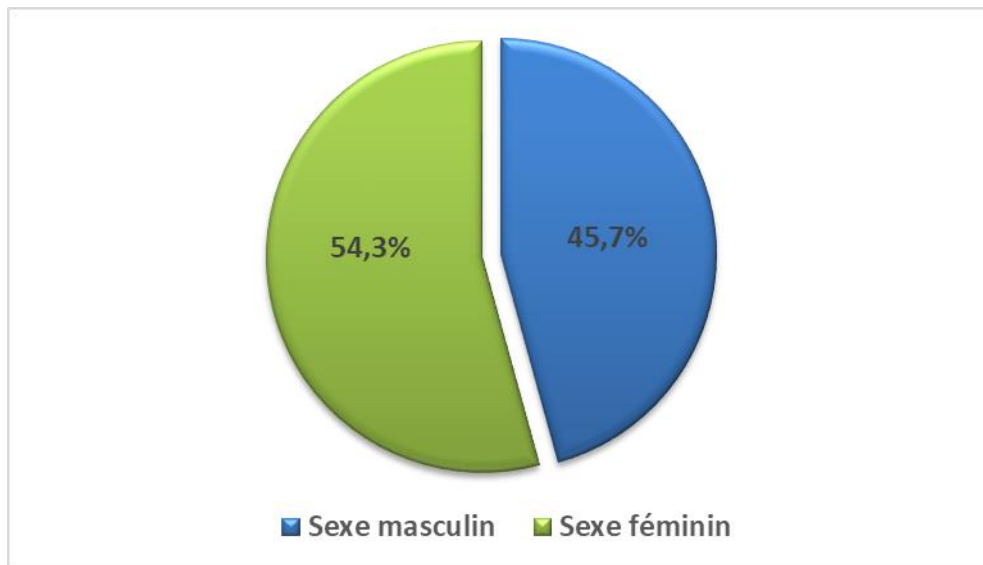


Figure 29 : Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction du sexe.

2.1.3. Consanguinité et antécédents familiaux :

La notion de consanguinité a été retrouvée dans 54% des cas. Le nombre de sujets atteints de β -thalassémie par famille était variable allant jusqu'à 3 sujets par famille.

2.2. Données cliniques :

Différents signes cliniques ont été retrouvés chez nos patients, ils étaient dominés par la pâleur cutanéomuqueuse et la dysmorphie faciale retrouvées respectivement chez 31 et 24 cas, la fréquence des autres signes cliniques est représentée dans la (Figure 30).

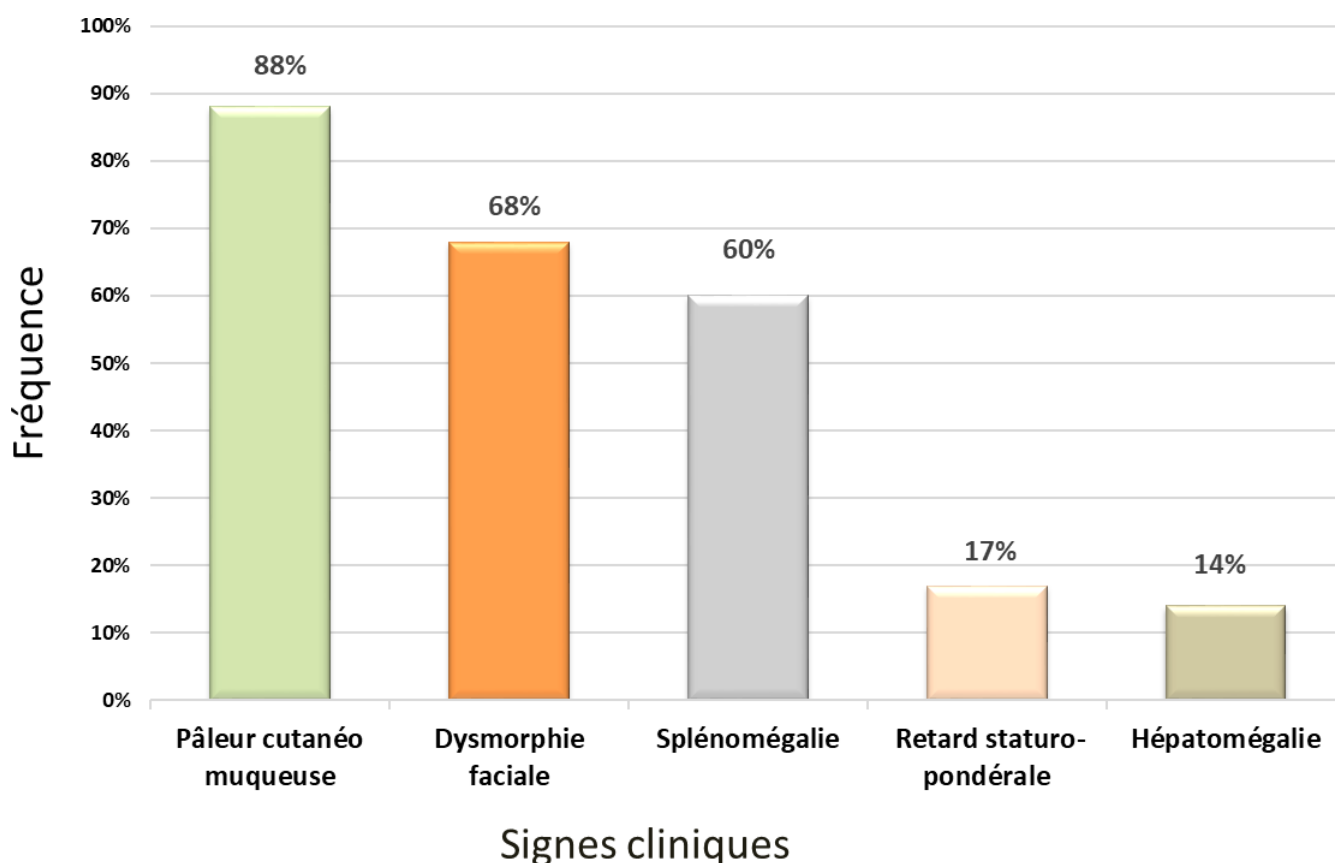


Figure 30 : Fréquence des différents signes cliniques retrouvés chez nos patients.

2.3. Données biologiques

2.3.1. L'hémogramme :

Tous les patients présentaient au moment du diagnostic une anémie avec des taux d'Hb qui variaient entre 2,3 et 10,8 g/dl (moyenne de 7,5 g/dl). Cette anémie était hypochrome microcytaire chez 33 patients soit 94,3% des cas et normochrome normocytaire chez seulement 2 patients soit 5,7% des cas.

2.3.2. L'électrophorèse :

Elle a été réalisée chez tous les patients au moins une fois. En corrélation avec les données cliniques et les besoins transfusionnelles propres à chaque patient elle a objectivé la présence d'une thalassémie majeure chez la quasi-totalité des patients, 2 cas seulement présentaient une thalassémie

intermédiaire.

2.4. Résultats de l'étude moléculaire :

2.4.1. Résultats de l'extraction d'ADN :

L'extraction d'ADN a été réalisée par kit. Le rapport de l'absorbance DO260/DO280, était compris pour la plupart des échantillons entre les valeurs 1,8 et 2, ce qui laisse conclure que ces extraits ne sont pas contaminés par les protéines et peuvent être qualifiés de purs.

2.4.2. Résultats de l'amplification du gène HBB par PCR :

La PCR du gène HBB a été réalisée pour l'exon 1 et l'exon 2 chez chacun des 35 patients de notre série, elle a été suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier les amplifications.

Le résultat retrouvé dans le profil électrophorétique de tous les patients montrait que le produit amplifié dans le but d'être séquencé ne contenait pas de contaminants, le séquençage pouvait alors être réalisé. (Figure 31)



Figure 31 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose 2 % des produits d'amplification.

2.4.3. Résultats du séquençage :

✓ Profil des mutations retrouvées dans la population étudiée :

Après l'analyse des résultats, on a pu identifier huit différents types de mutations responsables du phénotype de β -thalassémie distribuées en différentes fréquences. Outre ces mutations, l'étude du gène HBB a identifié un polymorphisme qui n'a pas été pris en compte dans l'analyse des données.

Il s'agit du variant bénin c.9T>C. (Tableau 8).

Mutation	HGVS nomenclature	Mutation protéique	Localisation	Phénotype	Origine
Cd39 (C>T)	c.118C>T	p. Gln40Ter	Exon 2	β^0	Ouest de la méditerranée
IVS-I-110 (G>A)	c.93-21G>A	-	Intronique	β^+	Est de la méditerranée
IVS-I-6 (T>C)	c.92+6 T>C	-	Intronique	β^+	Ouest de la méditerranée
Cd6 (-A)	c.20del A	p. Glu7Glyfs	Exon 1	β^0	Nord-Africaine
IVS-I-2 (T>C)	c.92+2T>C	-	Intronique	β^0	Algérienne
Cd5 (-CT)	c.17-18delCT	p. Pro6Argfs	Exon 1	β^0	Méditerranéen
IVS-I-1 (G>A)	c.92+1G>A	-	Intronique	β^0	Méditerranéen
Cd8 (-AA)	c.25-26delAA	p. Lys9Valfs	Exon 1	β^0	Turque
His3His	c.9T>C	(p.His3=)	Exon 1	Variant bénin	-

Tableau 8 : Caractéristiques des mutations du gène HBB identifiées dans notre étude.

Des Electrophérogrammes montrant quelques exemples de mutations du gène HBB sont représentés ci-dessous.

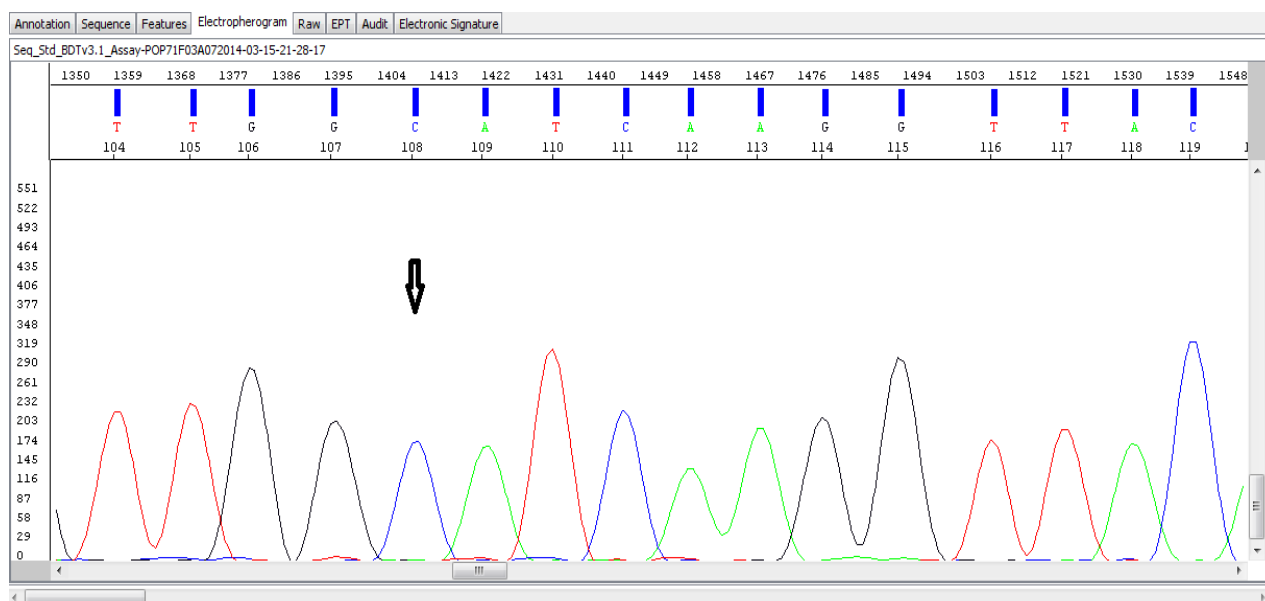


Figure 32 : Mutation c.92+6T>C à l'état homozygote.

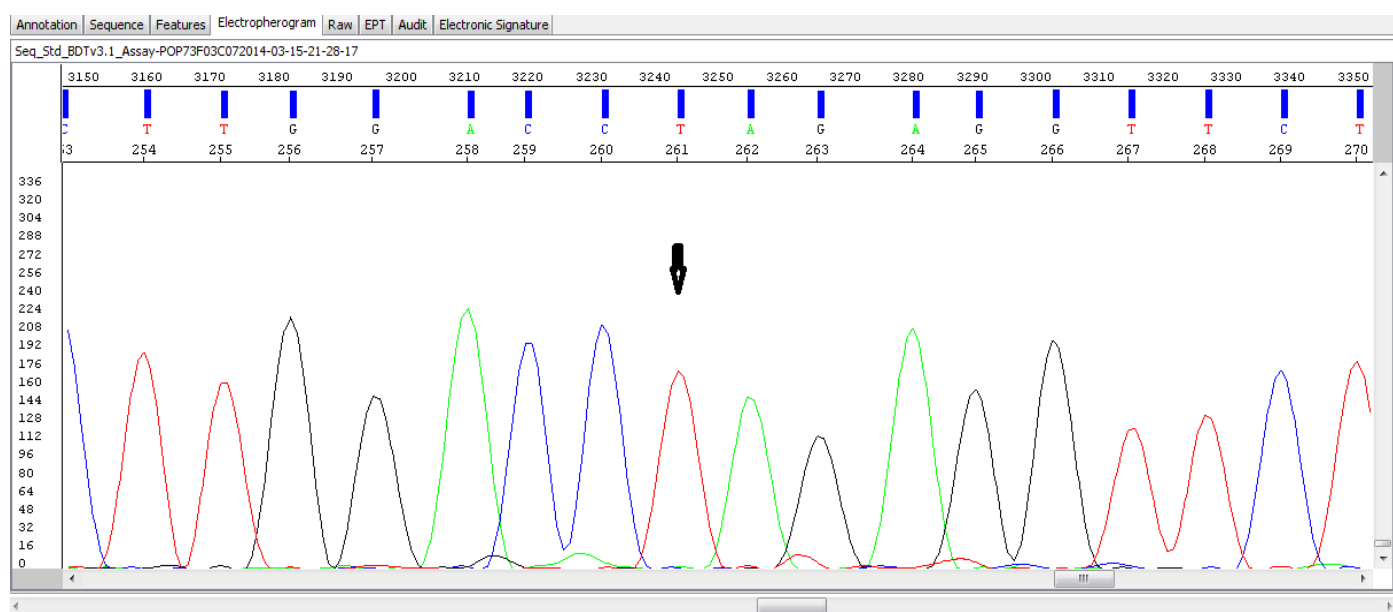


Figure 33 : mutation c.118C>T à l'état homozygote.

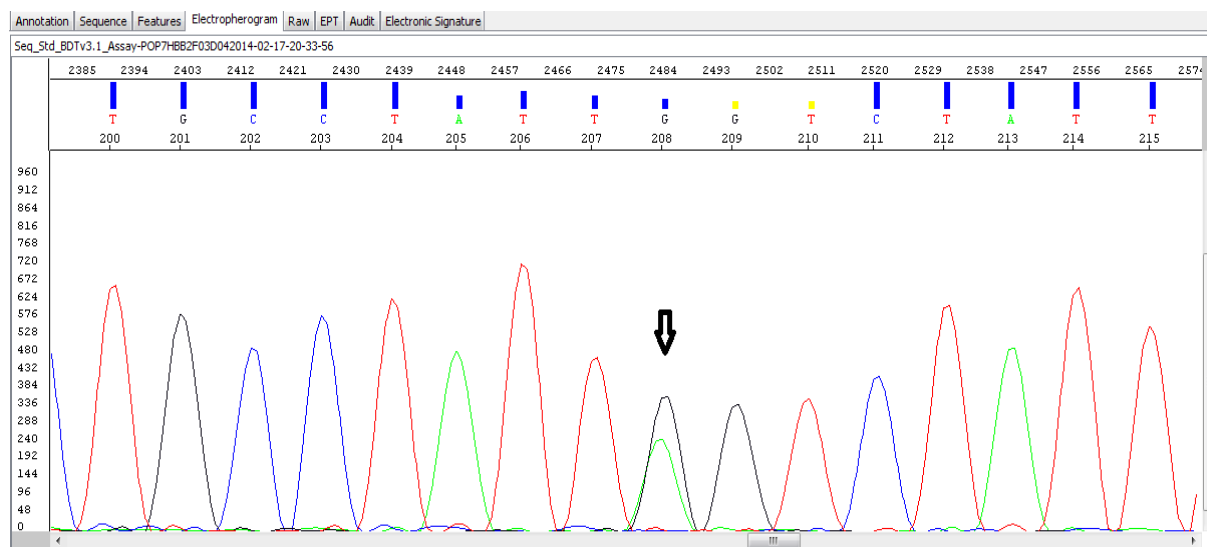


Figure 34 : mutation c.93-21G>A à l'état hétérozygote sur la séquence F.

Les deux mutations les plus retrouvées sont lac.118 C>T située au niveau de l'exon 2 et la mutation intronique c.93-21G>A. A elles deux, elles représentent 52,54 % de l'ensemble des anomalies retrouvées. La distribution des différentes mutations est résumée dans la figure 35.

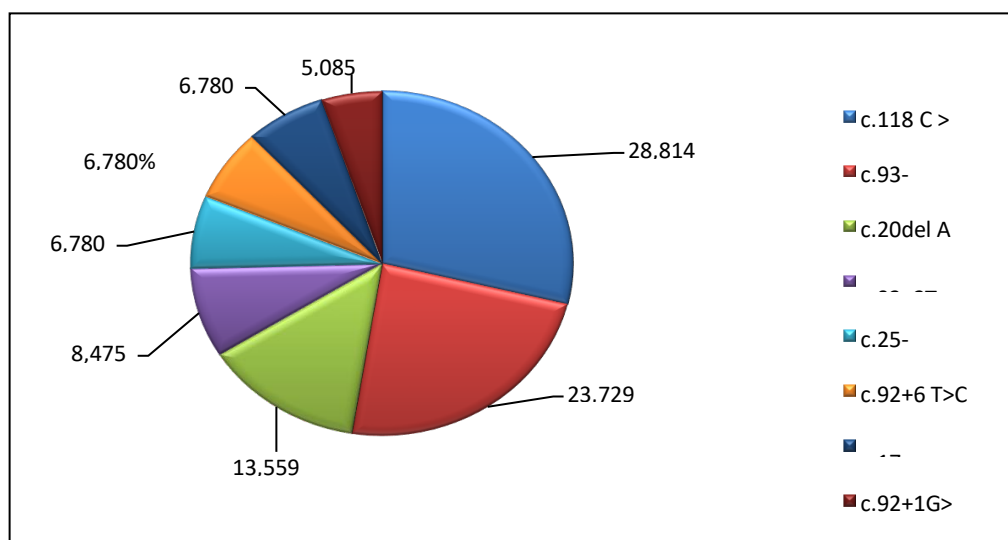


Figure 35 : Spectre et fréquence allélique des mutations du gène HBB dans la population étudiée.

Sur les 35 patients testés 32 présentaient une mutation du gène HBB sur au moins un chromosome. 16 de ces patients mutés, soit la moitié, avaient une mutation à l'état homozygote, 10 patients (31,25 %) avaient une mutation à l'état hétérozygote composite et seulement 6 cas (18,75%) l'avaient à l'état hétérozygote.

Au total, 17 génotypes ont été retrouvés dans la population étudiée. Le plus fréquent est le génotype c.93-21G>A/c.118 C>T avec une fréquence de 15,15%. (Tableau 9).

Génotypes	Nombres	Fréquence
c.93-21G>A/c.118 C>T	5	15,15%
c.93-21G>A / c.93-21G>A	4	12,12%
c.118 C>T / c.118 C>T	4	12,12%
c.20del A / c.20del A	3	9,09%
c.17-18delCT / c.17-18delCT	2	6,06%
c.92+2T>C / c.20del A	2	6,06%
c.92+6 T>C / c.92+6 T>C	2	6,06%
c.25-26delAA / -	2	6,06%
c.92+2T>C / c.92+2T>C	1	3,03%
c.92+6 T>C / c.118 C>T	1	3,03%
c.25-26delAA / c.118 C>T	1	3,03%
c.92+1G>A / c.25-26delAA	1	3,03%
c.92+6 T>C / -	1	3,03%
c.93-21G>A / -	1	3,03%
c.92+2T>C / -	1	3,03%
c.118 C>T / -	1	3,03%
c.92+1G>A / c.92+1G>A + c.118 C>T	1	3,03%

Tableau 9 : Génotypes retrouvés dans la population étudiée

Chez 3 patients nous n'avons trouvé aucune mutation pathogène, tandis que chez 6 patients un seul allèle était porteur d'une anomalie moléculaire. Tous ces patients sont des cas de β -thalassémie majeure.

3. DISCUSSION

Les β -thalassémies constituent un groupe hétérogène d'anomalies moléculaires qui a en commun un défaut quantitatif de synthèse de la chaîne de globine de type β . Sur le plan physiopathologique, ces anomalies sont à l'origine d'un déséquilibre de synthèse avec accumulation de chaînes non appariées responsable de dysérythropoïèse. Elles sont causées par des mutations au niveau du gène HBB localisé sur le chromosome 11 et transmises de façon autosomique récessive. La gravité de la maladie dépend de la nature de la mutation.[42]

Sur les 330 000 naissances annuelles d'individus atteints d'hémoglobinopathies majeures dans le monde, environ 17 % d'entre eux sont atteints de β thalassémie.[43]

Comme dans la drépanocytose, la distribution géographique de la β -thalassémie correspond à celle du paludisme ce qui suggère que les porteurs d'un trait β -thalassémique sont eux aussi en partie protégés contre le neuro-paludisme. Les allèles β -thalassémiques sont fréquents dans le bassin méditerranéen, en Afrique de l'Ouest, au Moyen-Orient, dans le sous-continent indien, en Asie centrale et du sud-Est. Les prévalences les plus importantes sont observées à Chypre et en Sardaigne avec 14% et 12% respectivement de porteurs hétérozygotes dans la population. En raison des migrations de populations et, dans une mesure bien moindre que pour la drépanocytose, de l'esclavage, la β -thalassémie est aussi présente en Europe du Nord, aux Amériques, dans les Caraïbes et en Océanie. Au Maroc [13], 3% de la population serait touchée par la β -thalassémie. [24]

De façon assez caractéristique, chacune de ces régions du globe présente un spectre de mutations qui lui est propre. Par exemple, la mutation c.118C>T présente une fréquence élevée en Sicile, la mutation c.-79A>G en Afrique de l'Ouest et la mutation c.25-26delAA en Asie du Sud-Est. Ce phénomène se retrouve également au niveau local, voire locorégional : on parle alors 'd'effet fondateur'.

Depuis quelques années, de nombreuses études de dépistage et de génotypagesystématiques des mutations β -thalassémiques sont faites dans des zones précises du globe afin d'avoir une idée de leurs prévalences respectives.

Le but est d'identifier les 2 à 3 mutations responsables de plus de 80 % des cas afin de les rechercher spécifiquement en cas de suspicion clinique, quand un séquençage complet du gène HBB n'est pas possible.[24], [44]

3.1. Particularités phénotypiques :

-L'âge moyen des patients inclus dans notre étude varie entre 1 et 37 ans, avec une moyenne de 8,68 ans, 28 patients ont un âge entre 0 et 12 ans soit 80% des cas, 7 patients ont un âge inférieur à 12 ans soit 20% des cas.

Dans l'étude faite au CHU Farhat-hachet de Sousse en Tunisie, la moyenne d'âge a été de 9 ans (extrêmes : 2-17 ans) [45], l'âge des patients varie de 2 à 13 ans avec une moyenne de 5 ans à la région d'El-Oued d'Algérie [46], par contre, dans l'étude réalisée au CHU de Yaoundé au Cameroun, l'âge moyen des malades a été de 3,7 ans. Les âges extrêmes ont été de 6 mois et 14 ans [47]. La β -thalassémie est donc une maladie à révélation pédiatrique.

–Nos patients sont répartis en 19 filles soit 55,3% et 16 garçons Soit 45,7%. On note une nette prédominance féminine avec un sex-ratio M/F de 0,84, Une prédominance masculine a été retrouvée dans les études faites au CHU Ibn Sina de Rabat, celle faite au CHU de Annaba, avec un sexe ratio Respectivement de 1,4 et de 1,2. On trouve les mêmes résultats pour les études faites au CHU Farhat-hachet de Sousse en Tunisie et au CHU de Yaoundé au Cameroun [45], [47], [48].

La prédominance masculine ne peut pas expliquer une relation entre le sexe et la maladie puisque la transmission de cette affection est autosomique récessive, c'est à dire qu'elle touche les deux sexes de façon égale.

– le taux d'hémoglobine lors du diagnostic de nos patients varie entre 2,3 et 10,8 g/dl (moyenne de 7,5 g/dl). Ce taux est plus bas que celui qui a été retrouvé dans une autre étude allemande avec un taux moyen de 6,9 [49].

– l'électrophorèse de l'hémoglobine a été réalisée chez tous les patients au moins une fois, elle a objectivé la présence d'une thalassémie majeure chez la quasi-totalité des patients, 2 cas seulement présentaient une thalassémie intermédiaire soit 5% des patients

Les études anthropogénétiques, ont démontré le caractère hétérogène de la population marocaine qui se présente comme un mélange de composante africaine, caucasioïde, asiatique et arabe.

Cette population est également caractérisée par un haut degré de consanguinité, notion confirmée dans notre étude par la prévalence de patients porteurs de la même mutation sur les deux allèles, en effet sur les 35

sujets étudiés, 19 étaient issus d'une union consanguine soit 54% des cas. Ce taux élevé de consanguinité qui atteint 40% dans certaines régions, est principalement lié à des raisons culturelles, socio-économiques et linguistiques. [50]

L'hétérogénéité et la consanguinité sont donc deux caractéristiques essentielles qui font de notre population un bon modèle d'étude des maladies génétiques surtout celles à caractère récessif.

3.2. Analyse du spectre mutationnel de la β -thalassémie au Maroc :

Les résultats de notre étude ont mis en évidence une très hétérogène base moléculaire de la β -Thalassémie dans la population étudiée avec huit différentes mutations identifiées, ces mutations ont déjà été rapportées dans deux études réalisées au Maroc, la première par Lemsaddek et al en 2003 et la deuxième par Agouti et al en 2008. Ces travaux ont permis de porter à 22 le nombre de mutations retrouvées dans la population marocaine reflétant encore plus le fond hétérogène de cette population.

Cette hétérogénéité moléculaire qui semble être une caractéristique commune des pays de l'Afrique du Nord et de la Méditerranée peut s'expliquer par le fait qu'au cours de son histoire, le Maroc a été une terre de migration pour plusieurs civilisations qui ont contribué à son mélange génétique. [50], [51]

c.118C>T, c.92+6T>C, c.20delA, sont les mutations les plus communes dans notre pays, leurs fréquences dans notre étude rejoignent plus ou moins celles retrouvées dans les deux études marocaines précitées.

La mutation c.118C>T est l'une des plus courantes dans le bassin

méditerranéen, dans notre étude elle est retrouvée dans 28,81 % des allèles mutées. Cette mutation d'origine méditerranéenne occidentale [52] atteint sa fréquence la plus élevée en Sardaigne avec 96% [44]. C'est la mutation la plus fréquente en Algérie avec 27,6% des allèles b-thalassémiques [53], en Tunisie et en Italie avec 40% [50], [54] et en Espagne avec 36%. [51], [52]

Concernant la distribution de l'ensemble des mutations de notre travail elle s'est révélée généralement similaire à celle d'autres pays (Tableau 10).

Mutation	Pays (Nombres d'allèles)						
	Algérie (239)	Tunisie (233)	Portugal (561)	Espagne (324)	Italie (325)	Maroc (160)	Notre étude (35)
c.118 C>T	27,6	40	36,8	36	40	26,58	28,81
c.93-21G>A	24,7	20,5	10	13	19,9	5,7	23,73
c.20delA	17,1	6,65	1	1	1,9	5,7	13,56
c.92+6T>C	3,3	10,5	17,0	11,0	14,40	13,9	6,78
c.92+2T>C	3,3	0,76	–	–	–	5,07	8,47
c.17-18delCT	–	4,5	–	–	–	1,27	6,78
c.92+1G>A	11,7	1	28	35	10,2	5,06	5,08
c.25-26delAA	–	0,9	–	2	0,12	13,9	6,78
Références	[13]	[14,16]	[19]	[17,18]	[15]	[9,10]	–

Tableau 10 : Fréquence des mutations du gène HBB chez les Bêta Thalassémiques au Maroc et dans quelques pays de la méditerranée.

En plus des anomalies moléculaires retrouvées dans notre étude, il existe à ce jour plus de 300 mutations décrites [86] représentées par des mutations ponctuelles ou de courtes délétions ou insertions caractérisables facilement par séquençage, ce type d'anomalie représente environ 90 % des allèles β -thalassémiques. Les 10 % restants, exceptionnelles, sont des délétions plus ou moins larges détectables par MLPA ou par CGH Array [34], [44].

Dans notre série, aucune mutation du gène HBB n'a été retrouvée chez 3 patients, tandis que chez 6 patients une seule anomalie était présente sur un seul allèle, ces résultats laissent suggérer la possible présence d'autres anomalies moléculaires non détectées par la méthode d'analyse utilisée. De ce fait, une étude additionnelle du gène HBB doit être réalisée chez eux afin d'identifier d'éventuelles mutations au niveau de l'exon 3 ou des formes délétionnelles du gène HBB.

3.3. Corrélation entre le phénotype et le génotype des beta thalassémies :

Il existe une corrélation importante entre le type de mutation bêta thalassémique qui conditionne le niveau de la perturbation de la synthèse de la chaîne protéique et la sévérité clinique [33].

L'effet d'une mutation sur le niveau d'expression du gène dépend de sa nature et de sa localisation [55].

En règle générale, l'hétérozygote bêta-thalassémique ou porteur sain n'est pas symptomatique, il présente seulement les modifications érythrocytaires typiques (pseudopolyglobulie et microcytose) et une élévation modérée de l'HbA2 (entre 4 et 7%). Chez l'homozygote ou l'hétérozygote

composite, les 2 allèles sont mutés ; on observe alors, en fonction de la combinaison des effets des 2 mutations, un continuum de sévérité allant de formes silencieuses jusqu'à la thalassémie majeure.

Dans notre étude, on a pu identifier 8 différentes mutations, dont 6 correspondants à au phénotype β^0 et 2 mutations correspondant au phénotype β^+ avec présence d'une thalassémie majeure chez la quasi-totalité des participants, 2 cas seulement présentaient une thalassémie intermédiaire.

Les signes cliniques étaient dominés par la pâleur cutanéomuqueuse, la dysmorphie faciale, avec un recours fréquent à la transfusion chez 95% des patients.

CONCLUSION

Notre travail de recherche a consisté en étude avec deux volets : une étude descriptive épidémiologique, clinique et paraclinique, et une étude génétique analytique du gène HBB. Nos résultats ont montré que la β -thalassémie est une maladie à révélation pédiatrique avec une légère prédominance masculine, et que son apparition n'est pas uniquement due à la consanguinité. A travers notre étude, nous confirmons également l'hétérogénéité mutationnelle du gène HBB déjà observée au Maroc et dans d'autres pays du pourtour méditerranéen.

Cet aspect ainsi que la forte prévalence des mutations du gène HBB peuvent être expliqués par :

- ✓ La longue tradition du mariage consanguin responsable de la concentration de certaines caractéristiques génétiques et mutations ainsi que de l'apparition plus fréquente de maladies congénitales à transmission autosomique récessive.
- ✓ La diversité génétique due aux différents mouvements migratoires qu'a connue la population marocaine.

Ainsi l'identification des mutations survenant dans notre population constitue une base de données importante pour la mise en place d'un programme de prévention de la β -thalassémie basé sur le dépistage des porteurs et le diagnostic prénatal. En effet l'analyse moléculaire du gène HBB

chez un sujet β -thalassémique est aujourd'hui un outil important pour la santé publique. Elle permet d'améliorer considérablement la qualité du conseil génétique sollicité par les parents et de répondre avec précision à de nombreuses questions sur le caractère héréditaire de la β -thalassémie, les risques pour les enfants à venir et l'évolution de la maladie.

Afin de diminuer l'incidence des β -thalassémies, il serait nécessaire de développer un programme de prévention reposant sur l'éducation sanitaire, la diminution des mariages consanguins, le dépistage des hétérozygotes, le conseil génétique le dépistage anténatal de la maladie et la création de centres spécialisés et avec l'émergence de nouvelles technologies telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS) on peut prochainement espérer le développement de diagnostics prénatals non invasifs de la β -thalassémie.

À la lumière de ce travail nous proposons en perspectives de :

- ✓ Compléter les explorations moléculaires chez les patients non porteurs de mutations ainsi que ceux porteurs d'une mutation pathogène à l'état hétérozygote par séquençage complet du gène Hbb et recherche des grands réarrangements par MLPA.
- ✓ Élargir l'étude en utilisant un échantillon de taille plus importante.

Liste des figures :

Figure 1 : Une représentation simplifiée des différences dans la composition de l'Hb entre les deux formes principales de la thalassémie. (Les symboles ombrés α et β indiquent une synthèse défectueuse de globine).	16
Figure 2 : Spectre phénotypique des syndromes thalassémiques basée sur leur sévérité clinique et la nécessité du recours à la transfusion.	18
Figure 3 : Conséquences de l'excès de production de chaînes d' α -globines libres dans la bêta- thalassémie.	21
Figure 4 : Répartition mondiale des origines des thalassémies α et β . (De Weatherall et Clegg 2001).	23
Figure 5 : Le taux de naissances d'enfants touchés au cours des années.	25
Figure 6 : Structure 3D du protéine Hb (PDB).	26
Figure 7 : L'assemblage des différentes chaînes entre elles est responsable de la synthèse de différents types d'hémoglobine.	26
Figure 8 : Commutation de l'Hb avant et après la naissance.	28
Figure 9 : Schéma de la physiopathologie des β -Thal.	29
Figure 10 : L'expression séquentielle des gènes au cours du développement.	31
Figure 11 : Les différents gènes de globines et les différentes hémoglobines synthétisées.	31
Figure 12 : Structure des gènes HBB et HBA.	32
Figure 13 : Structure du gène HBB et des séquences régulatrices.	32

Figure 14 : la Région LCR du gène HBB. -----	33
Figure 15 : Les différents types de mutations bêta-thalassémiques.-----	35
Figure 16 : Mutations ponctuelles responsables de β -Thal. Le gène de la β -globine est représenté dans le panneau supérieur avec des séquences conservées dans les 5' et 3' UTR, et les dinucléotides invariants dans les jonctions exon-intron du gène, important dans le contrôle de l'expression des gènes. Les boîtes représentent les différentes catégories de mutations. Les lignes verticales à l'intérieur des boîtes représentent les sites des différentes mutations. Les mutants hérités de manière dominante se trouvent dans des cases ombrées. -----	37
Figure 17 : Les formes des mutations délétionnelles. -----	38
Figure 18 : Hépatosplénomégalie.-----	41
Figure 19 : Algorithme de diagnostic d'une hypochromie et d'une microcytose. -----	43
Figure 20 : Schéma représentant La greffe de cellules souches hématopoïétiques. -----	49
Figure 21 : Vue générale d'une approche de thérapie génique pour la β -Thal. -----	51
Figure 22 : Spectrophotomètre NANODROP (UGMO). -----	58
Figure 23 : Thermocycleur Applied Biosystem 2700 (UGMO). -----	60
Figure 24 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance. -----	63
Figure 25 : Caractéristiques des différents ddNTPs -----	63
Figure 26 : Analyseur génétique Applied Biosystem 3500Dx (UGMO) -----	65

Figure 27 : Interface de Sequence Analysis Software. -----	65
Figure 28 : Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction de l'âge. 67	
Figure 29 : Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction du sexe. 68	
Figure 30 : Fréquence des différents signes cliniques retrouvés chez nos patients. -----	69
Figure 31 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose 2 % des produits d'amplification. -----	70
Figure 32 : Mutation c.92+6T>C à l'état homozygote. -----	72
Figure 33 : mutation c.118C>T à l'état homozygote. -----	72
Figure 34 : mutation c.93-21G>A à l'état hétérozygote sur la séquence F. 73	
Figure 35 : Spectre et fréquence allélique des mutations du gène HBB dans la population étudiée. -----	73

Liste des tableaux :

Tableau 1 : La corrélation Phénotype– Génotype et la sévérité clinique.....	39
Tableau 2 : Indices des globules rouges dans la bêta–thalassémie.	44
Tableau 3 : Electrophorèse de l’HB chez les beta–thalassémiques : (Age >12 Mois).....	45
Tableau 4 : Principales caractéristiques des trois molécules chélatrices du fer	48
Tableau 5 : Propriétés des amorces utilisées pour la réaction de PCR.	59
Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel (volume totale de 25µl). ..	60
Tableau 7 : Programme de cycle de température au niveau du thermocycleur (Applied Biosystem).....	60
Tableau 8 : Caractéristiques des mutations du gène HBB identifiées dans notre étude.	71
Tableau 9 : Génotypes retrouvés dans la population étudiée	74
Tableau 10 : Fréquence des mutations du gène HBB chez les Béta Thalassémiques au Maroc et dans quelques pays de la méditerranée.....	79

ANNEXE 1

Fiche de consentement

Banque
d'ADNMaladie
de.....

Dossier Génétique :

Dossier clinique :

IP:

Antécédents personnels :**Antécédents familiaux :****Arbre généalogique au verso de la fiche (à schématiser si ATCD familiaux) :**

Nom, Prénom	:	Date de naissance	:	Consanguinité	:
Origine père	:				
Origine mère	:				
Adresse	:				
Tel	:				
Médecin traitant	:				
Prélèvement sanguin (2 tubes EDTA de 5ml)			Fait le		
Propositus		Père		Mère	
Autres					
Réception au laboratoire par :			le :		

Fait à Fès, le

Signature et cachet du médecin :

ANNEXE 2

Fiche d'exploitation

Date :

IP :

1) Identité :

Nom et prénom :

Date de naissance:

Sexe :

Age au moment du diagnostic :

Age actuel :

Fratrie :

Scolarité :

Sécurité sociale : RAMED ☐CNOPS ☐CNSS ☐FAR ☐

Autres :

Origine géographique :

Milieu : Urbain ☐ Rural ☐**2) Circonstances de découverte :**Pâleur cutanéomuqueuse ☐ Ictère ☐ syndrome anémique ☐SMG ☐HMG ☐Dysmorphie ☐Découverte fortuite ☐

Autres :

3) Antécédents :

Personnels :

❖ Médicaux : Ictère ☐ Anémie ☐ Age :Hémolyse ☐Notion de transfusions ☐

Age

Nombre de transfusions :

Pâleur : ☐

Statut vaccinal :

Lithiase vésiculaire ☐

Autres :

❖ Chirurgicaux :

- Opéré

Oui ☐Non ☐

Motif de chirurgie :

Familiaux :

Consanguinité : Oui ☐ Non ☐

degré :

Cas anémie dans la famille ☐Transfusion dans la famille ☐

similaires :

Autres :

4) Histoire de la maladie :

-Délai début de la symptomatologie-consultation

- Malade vu par un autre médecin avant :

Généraliste ☐

Pédiatre ☐

Transféré d'un autre centre ☐

Autres :

5) Examen clinique initial :

-Examen général :

Asthénie : Oui ☐ Non ☐

Pâleur : Oui ☐ Non ☐

Ictère : Oui ☐ Non ☐

Dysmorphie faciale : Oui ☐ Non ☐

TA :

FC :

FR:

T :

Poids : (DS)

Taille : (DS)

PC : (DS)

-Examen abdominal :

HMG : FH

SMG : TDD

Autres :

-Examen cardio-vasculaire :

-Examen pleuro pulmonaire :

-Examen de la cavité buccale :

-examen neurologique :

-examen osteo articulaire

-examen cutaneo muqueux :

-Teinte de mélanodermie Oui ☐ Non ☐

- Pâleur ☐ Ictère ☐

-Examen des aires ganglionnaires :

-Examen des OGE

Stade puberaite :

6) Examens complémentaires :

a. Bilan biologique :

i. hémogramme :

Hb VGM CCMH TCMH GB

PNN PLAQUETTE

Taux de réticulocytes : Ferritinémie initiale : actuelle :

Fer sérique :

ii. Groupage et phénotype érythrocytaire :

RAI Test de coombs direct

iii. Electrophorèse d'Hb : HbA1

HbA2 HbF

iv. Bilan hépatique :

GOT	GPT	GGT	PAL
Bilirubine T		Bilirubine D	Bilirubine I

v. Haptoglobinevi. UréeCreatininevii. Sérologies : CMV HBV HVC HIV**b. Biologie moléculaire :****c. -Bilan radiologique :**

- i. radiographie du thorax :
- ii. radiographie du crane :
- iii. radio du rachis :
- iv. écho cœur
- v. écho abdomino pelvienne

7) Prise en charge thérapeutique :Hospitalisation : Oui ☐ Non ☐

Motif : Durée :

-Transfusions : Oui ☐ Non ☐ Délais entre les transfusions :

Hb pré transfusionnelle moyenne : Hb post transfusionnelle moyenne :

-chélateur de fer : Oui ☐ Non ☐ nombre : Type :

Posologie :

Mode d'administration :

Durée :

Age de début :

DDT :

-Hydroxyurée (hydréa) :

Oui ☐Non ☐

-Supplément folique :

Oui ☐Non ☐-Splénectomie : Oui ☐Non ☐**8) Complications :**Oui ☐Non ☐**9) Dépistage :**Oui ☐Non ☐

Bibliographie :

- [1] V. Viprakasit et S. Ekwattanakit, « Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia », *Hematol. Clin.*, vol. 32, n° 2, p. 193-211, avr. 2018, doi: 10.1016/j.hoc.2017.11.006.
- [2] M. Angastiniotis *et al.*, *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 1: Principles*, 2nd éd. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation, 2013. Consulté le: juin 03, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190481/>
- [3] C. WHO/TIF Meeting on the Management of Haemoglobin Disorders (2007: Nicosia, W. H. Organization, et T. I. Federation, *Management of haemoglobin disorders: report of a joint WHO-TIF meeting, Nicosia, Cyprus, 16-18 November 2007*. World Health Organization, 2008.
- [4] P. Kountouris, C. W. Lederer, P. Fanis, X. Feleki, J. Old, et M. Kleanthous, « IthaGenes: an interactive database for haemoglobin variations and epidemiology », *PloS One*, vol. 9, n° 7, p. e103020, 2014.
- [5] N. B. Agoumi et A. Sebar, « Les hémoglobinopathies au Maroc », *Arch. Pédiatrie*, vol. 10, n° 7, p. 654-655, juill. 2003, doi: 10.1016/S0929-693X(03)00294-X.
- [6] F. Dahmani, S. Benkirane, J. Kouzih, A. Woumki, H. Mamad, et A. Masrar, « Profil épidémiologique des hémoglobinopathies: étude transversale descriptive autour du cas index », *Pan Afr. Med. J.*, vol. 27, n° 1, 2017.
- [7] (S.) MARHABENE et MARHABENE (S.), *Évaluation de l'implantation du programme national de prévention et de contrôle de la thalassémie et*

- des autre hémoglobinopathies au niveau de la province de Kenitra.* 2014.
- [8] J. ROCHETTE et Y. Charbit, « Deux maladies génétiques: la drépanocytose et les thalassémies. Enquêtes en région parisienne », *Rev. Eur. Migr. Int.*, vol. 6, n° 3, p. 145-160, 1990.
- [9] A. T. Taher et M. D. Cappellini, « Management of non-transfusion-dependent thalassemia: a practical guide », *Drugs*, vol. 74, n° 15, p. 1719-1729, 2014.
- [10] S. Fucharoen et D. J. Weatherall, « The hemoglobin E thalassemias », *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, n° 8, p. a011734, 2012.
- [11] « Sickle cell-beta thalassemia », *Wikipedia*. avr. 11, 2020. Consulté le: juin 03, 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Sickle_cell-beta_thalassemia&oldid=950258802
- [12] « Sickle Cell Disease | NHLBI, NIH ». <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/sickle-cell-disease> (consulté le juin 03, 2021).
- [13] A. Cao et R. Galanello, « Beta-thalassemia », *Genet. Med.*, vol. 12, n° 2, Art. n° 2, févr. 2010, doi: 10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed.
- [14] A. Eleftheriou, « A propos de la thalassémie », *Fédération Int. Thalass.*, vol. 170, 2007.
- [15] J. N. Parker et P. M. Parker, *Beta Thalassemia: a Bibliography and Dictionary for Physicians, Patients, and Genome Researchers*. ICON Group International Inc., 2007. Consulté le: juin 03, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=344774>

- [16] « Thalassémies (297a) – Corpus Médical de la Faculté de Médecine de Grenoble ». <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/hemato/hemacell/297a/lecon297a.htm> (consulté le juin 03, 2021).
- [17] W. Lemsaddek *et al.*, « Spectrum of β thalassemia mutations and HbF levels in the heterozygous Moroccan population », *Am. J. Hematol.*, vol. 73, n° 3, p. 161-168, 2003.
- [18] T. N. Williams *et al.*, « Negative epistasis between the malaria-protective effects of α +--thalassemia and the sickle cell trait », *Nat. Genet.*, vol. 37, n° 11, p. 1253-1257, 2005.
- [19] D. J. Weatherall et J. B. Clegg, « The Thalassaemia Syndromes. 4th edn Oxford », *UK Blackwell Sci. Sch.*, 2001.
- [20] V. De Sanctis *et al.*, « β -thalassemia distribution in the old world: an ancient disease seen from a historical standpoint », *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 9, n° 1, 2017.
- [21] E. P. Vichinsky, « Changing patterns of thalassemia worldwide », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1054, n° 1, p. 18-24, 2005.
- [22] A. Haj Khelil *et al.*, « Hemoglobinopathies in North Africa: a review », *Hemoglobin*, vol. 34, n° 1, p. 1-23, 2010.
- [23] I. Agouti, C. Badens, A. Abouyoub, N. Levy, et M. Bennani, « Molecular basis of β -thalassemia in Morocco: Possible origins of the molecular heterogeneity », *Genet. Test.*, vol. 12, n° 4, p. 563-568, 2008.
- [24] « La thalassémie », *doctinews*. <https://www.doctinews.com/index.php/dossier/item/2111-lathalass%C3%A9mie> (consulté le juin 02, 2021).

- [25] O. V. Iarovaia *et al.*, « Genetic and epigenetic mechanisms of β -globin gene switching », *Biochem. Mosc.*, vol. 83, n° 4, p. 381-392, 2018.
- [26] « Hémoglobine », *Wikipédia*. févr. 22, 2021. Consulté le: juin 03, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=H%C3%A9moglobine&oldid=180167852>
- [27] R. C. Hardison, « Evolution of Hemoglobin and Its Genes », *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, n° 12, p. a011627, janv. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a011627.
- [28] P. Joly, C. Pondarre, et C. Badens, « Les bêta-thalassémies : aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques », *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 72, n° 6, p. 639-668, nov. 2014, doi: 10.1684/abc.2014.1015.
- [29] H. F. Bunn et B. G. Forget, *Hemoglobin—molecular, genetic, and clinical aspects*. WB Saunders Co., 1986.
- [30] D. Labie et R. Krishnamoorthy, « Activation des gènes de l'hémoglobine au cours du développement », *MS Médecine Sci. Rev. Pap. ISSN 0767-0974 1988 Vol 4 N° 7 P427-434*, 1988, doi: 10.4267/10608/3852.
- [31] « About ». <https://www.ithanet.eu/> (consulté le juin 03, 2021).
- [32] S. Mettananda et D. R. Higgs, « Molecular basis and genetic modifiers of thalassemia », *Hematol. Clin.*, vol. 32, n° 2, p. 177-191, 2018.
- [33] D. J. Weatherall, « Phenotype—genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias », *Nat. Rev. Genet.*, vol. 2, n° 4, Art. n° 4, avr. 2001, doi: 10.1038/35066048.
- [34] R. Origa, « Beta-Thalassemia », in *GeneReviews®*, M. P. Adam, H. H.

- Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, G. Mirzaa, et A. Amemiya, Éd. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993. Consulté le: juin 03, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1426/>
- [35] N. Bonello-Palot, M. Cerino, P. Joly, et C. Badens, « Les thalassémies en 2016 », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2016, n° 481, p. 67-75, avr. 2016, doi: 10.1016/S1773-035X(16)30130-7.
- [36] S. L. Thein, « The molecular basis of β -thalassemia », *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, n° 5, p. a011700, 2013.
- [37] S. LAHLOU, « PROFIL EPIDEMIO-CLINIQUE, BIOLOGIQUE, THERAPEUTIQUE ET EVOLUTIF DE LA THALASSEMIE CHEZ L'ENFANT Expérience de l'unité d'hémato-oncologie pédiatrique du CHU Hassan II de Fès ».
- [38] S. Chaudhary *et al.*, « Whole Gene Sequencing Based Screening Approach to Detect α -Thalassemia Mutations », *Biol. Med.*, vol. 9, n° 2, 2017.
- [39] D. N. Greene, C. P. Vaughn, B. O. Crews, et A. M. Agarwal, « Advances in detection of hemoglobinopathies », *Clin. Chim. Acta*, vol. 439, p. 50-57, janv. 2015, doi: 10.1016/j.cca.2014.10.006.
- [40] P. Aguilar-Martinez *et al.*, « Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies », in *Annales de Biologie Clinique*, 2010, vol. 68, n° 4, p. 455-464.
- [41] A. Finotti *et al.*, « Recent trends in the gene therapy of β -thalassemia », *J. Blood Med.*, vol. 6, p. 69, 2015.
- [42] N. Couque, E. Trawinski, et J. Elion, « Génétique des maladies de l'hémoglobine », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2016, n° 481, p. 49-60, avr. 2016, doi: 10.1016/S1773-035X(16)30128-9.

- [43] N. F. Olivieri, Z. Pakbaz, et E. Vichinsky, « HbE/ β -thalassemia: basis of marked clinical diversity », *Hematol. Clin.*, vol. 24, n° 6, p. 1055-1070, 2010.
- [44] M. M. Sirdah *et al.*, « The spectrum of β -thalassemia mutations in Gaza Strip, Palestine », *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 50, n° 4, p. 247-251, 2013.
- [45] H. Romdhane *et al.*, « Profil clinico-biologique et immunohématologique des patients atteints de β -thalassémie en Tunisie: à propos de 26 cas », *Transfus. Clin. Biol.*, vol. 21, n° 6, p. 309-313, 2014.
- [46] L. BEDIR et R. MILOUDI, « Prévalence de thalassémie dans la wilaya d'El-Oued », *Mém. Fin D'études Supér. En Biochim. Univ. Kasdi-Merbah* Pp44-45, 2006.
- [47] I. Nsangou *et al.*, « Les β -thalassemies de l'enfant camerounais: Etude de la symptomatologie en fonction des différentes formes biologiques », *Clin. Mother Child Health*, vol. 9, n° 1, 2012.
- [48] M. Agouzal, A. Quayou, K. Benchekroune, et M. Khattab, « Aspects épidémiologiques et économiques des traitements chélateurs au centre thérapeutique de la thalassémie au Maroc », *Rev. Médicale Brux.*, vol. 31, n° 2, p. 79-87, 2010.
- [49] H. Cario, K. Stahnke, S. Sander, et E. Kohne, « Epidemiological situation and treatment of patients with thalassemia major in Germany: results of the German multicenter β -thalassemia study », *Ann. Hematol.*, vol. 79, n° 1, p. 7-12, 2000.
- [50] A. H. Khelil, S. Laradi, A. Miled, G. O. Tadmouri, J. B. Chibani, et P. Perrin, « Clinical and molecular aspects of haemoglobinopathies in Tunisia », *Clin. Chim. Acta*, vol. 340, n° 1-2, p. 127-137, 2004.

- [51] S. Amselem *et al.*, « Determination of the spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta-globin DNA. », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 43, n° 1, p. 95, 1988.
- [52] M. L. Ribeiro *et al.*, « Genetic heterogeneity of β -thalassemia in populations of the Iberian peninsula », *Hemoglobin*, vol. 21, n° 3, p. 261-269, 1997.
- [53] C. Bennani *et al.*, « Anthropological approach to the heterogeneity of β -thalassemia mutations in northern Africa », *Hum. Biol.*, p. 369-382, 1994.
- [54] S. Fattoum *et al.*, « β -thalassemia, Hb S- β -thalassemia and sickle cell anemia among Tunisians », *Hemoglobin*, vol. 15, n° 1-2, p. 11-21, 1991.
- [55] I. Papassotiriou *et al.*, « Observation of a Rare Hemoglobin Variant [Hb Lulu Island, β 107(G9)Gly→Asp, GGC→GAC] Co-Inherited With a β^{+-} Thalassemia Mutation [IVS-I-110 (G→A)] or in the Heterozygous State in a Greek-Albanian Family », *Hemoglobin*, vol. 30, n° 4, p. 409-418, janv. 2006, doi: 10.1080/03630260600867842.

Résumé :

Les syndromes thalassémiques sont des hémoglobinopathies héréditaires, transmises selon un mode autosomique récessives, caractérisées par la diminution ou l'absence de production de l'une des chaînes de globine normale, aboutissant à une baisse de production de l'hémoglobine normale.

Il s'agit de la maladie génétique la plus fréquente au monde, avec plus de 300 millions de porteurs.

Le diagnostic repose sur la réalisation d'une électrophorèse de l'hémoglobine, et la biologie moléculaire, ainsi que d'autres examens complémentaires.

Le principal traitement est transfusionnel, associé à un traitement chélateur de fer, la splénectomie trouve sa place afin de réduire les besoins transfusionnels.

Les formes mineures sont généralement bien tolérées, les formes intermédiaires peuvent avoir un besoin transfusionnel occasionnel, Quant aux formes majeures (anémie de Cooley) l'espérance de vie est très mauvaise en l'absence de tout traitement,

Notre travail est une étude rétrospective et descriptive portant sur 35 observations de beta thalassémie colligées au service de génétique médicale au CHU Hassan II recrutés durant la période s'étalant entre Mars 2018 et Mars 2019.

Notre objectif principal est de faire la corrélation entre le génotype et le

phénotype des beta thalassémies, d'analyser les particularités épidémiologiques, cliniques, biologiques, thérapeutiques et évolutives des patients porteurs d'une beta thalassémie en région de Fès–Boulemane.

L'âge moyen de nos patients est de 8,6 ans, avec une légère prédominance masculine, le taux d'Hémoglobine variait entre 2,3 et 10,7

Dans notre étude, on a pu identifier 8 différentes mutations, dont 6 correspondants à au phénotype β^0 et 2 mutations correspondant au phénotype β^+ avec présence d'une thalassémie majeure chez la quasi-totalité des participants, 2 cas seulement présentaient une thalassémie intermédiaire.

A travers notre étude, nous confirmons également l'hétérogénéité mutationnelle du gène HBB déjà observée au Maroc et dans d'autres pays du pourtour méditerranéen et qu'il existe une corrélation importante entre le type de mutation bêta thalassémique et la sévérité clinique.

Abstract:

The thalassemia syndromes are hereditary hemoglobinopathies, transmitted in an autosomal recessive mode, characterized by the decrease or absence of production of one of the normal globin chains, resulting in lower production of normal hemoglobin.

It is the most common genetic disease in the world, with more than 300 million carriers.

The diagnosis is based on performing hemoglobin electrophoresis and molecular biology, as well as other complementary tests.

The main treatment is transfusion, associated with iron chelation therapy, splenectomy finds its place in order to reduce transfusion needs.

The minor forms are generally well tolerated, the intermediate forms may need occasional transfusion, as for the major forms (cooley's anemia) life expectancy is very poor in the absence of any treatment,

Our work is a retrospective and descriptive study of 35 observations of beta thalassemia collected from the medical genetics department at CHU Hassan II recruited during the period between March 2018 and March 2019.

Our main objective is to make the correlation between the genotype and the phenotype of beta thalassemia, to analyze the epidemiological, clinical, biological, therapeutic and evolutionary characteristics of patients with beta thalassemia in the region of Fès–Boulemane.

The average age of our patients is 8.6 years, with a slight predominance of men, the hemoglobin level varied between 2.3 and 10.7

In our study, we were able to identify 8 different mutations, 6 of them corresponding to the β^0 phenotype and two mutations corresponding to the β^+ phenotype with the presence of thalassemia major in almost all participants, only 2 cases had thalassemia intermediate.

Through our study, we also confirm the mutational heterogeneity of the HBB gene already observed in Morocco and other countries around the Mediterranean rim and that there is an important correlation between the type of beta thalassemia mutation and clinical severity.

ملخص :

المتلازمات التلاسيمية هي اعتلال الهيموجلوبين الوراثية، المحولة بكيفية جسيمة لوضع وراثي متتحي، المتميز بانخفاض او فقدان انتاج لبعض سلاسل الجلوبين العادية، التي تؤدي إلى انخفاض انتاج الهيموجلوبين الطبيعي. إنه المرض الوراثي الأكثر شيوعا في العالم الذي يتجاوز عدد 300 مليون مصاب.

وتشخيص هذا المرض ينبنى على انجاز تحليل كهربائي للهيموجلوبين، والبيولوجيا الجزيئية، إضافة لتحليلات واختبارات اخرى تكميلية. والعلاج الرئيسي هو نقل الدم المرتبط بعلاج استخلاف الحديد، حيث يمكن استئصال الطحال من مجال احتياجات نقل الدم.

وعموما تبقى الاشكال الثانوية جيدة التحمل والاشكال الوسيطة قد تحتاج لنقل دم عرضي، أما بالنسبة للأشكال الكبرى (فقر الدم كولي) وفي حالة انعدام العلاج فإن متوسط العمر المتوقع يبقى ضعيفا جدا.

على أن عملنا عباره عن دراسة استيعادية ووصفية اقيمت على 35 ملاحظة لبينا تلاسيميا تم جمعها في قسم الوراثة الطبية بالمركز الاستشفائي الحسن الثاني، وتم ترتيبها خلال الفترة الممتدة ما بين مارس 2018 ومارس 2019.

ويبقى هدفنا الرئيسي هو اقامه ارتباط متبادل بين النمط الجيني والنمط الظاهري لبينا تلاسيميا، لتحليل الخصائص الوبائية، السريرية، البيولوجية والعلاجية التطورية لمرض التلاسيميا بيتا في جهة فاس بولمان.

ومتوسط عمر مرضانا هو 8,6 سنة، مع هيمنة للذكور، وتراوح مستوى الهيموجلوبين بين 2,3 و10,7.

ومن خلال بحثنا تمكنا من كشف وتحديد ثماني تحولات مختلفة ومطابقة للنمط والطفرة الوراثية الظاهرية، BO وكذا حالتين مطابقتين للنمط والطفرة الوراثية الظاهري، B+ مع تواجد تلاسيميا قياسية لدى الأغلبية الساحقة للمشاركين، ولقد تم تسجيل حالتين فقط للتلاسيميا الوسيطة.

وبناء على دراستنا، نؤكد أيضا عدم تجانس التحولات الطفرية لجين HBB الذي لوحظ ظهوره في المغرب وفي بلدان اخرى بحوض البحر الأبيض المتوسط، كما تم التأكيد على الارتباط المتبادل والهام بين تحول طفرة بيتا تلاسيميا والصرامة السريرية.

أطروحة رقم 21/237

سنة 2021

الملف الجيني لتلاسيميا بيا (بصدد 35 حالة)

الأطروحة

قدمت و نوقشت علانية يوم 2021/06/17

من طرف

السيد رضى مظفر
المزداد في 19 فبراير 1994 بمكناس

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات المفتاحية

النمط الظاهري - النمط الجيني - التلاسيميا - فقر الدم - جين HBB

اللجنة

الرئيس	 السيدة بنميلود سارة
	أستاذة مبرزة في طب الأطفال
المشرف	 السيدة ليلي بوكروش
	أستاذة مبرزة في علم الوراثة
أعضاء	{ السيدة زينب خمار
	أستاذة مبرزة في الطب الباطني
	 السيدة إيمان تلمساني
	أستاذة مبرزة في علم الدم