



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**
UNIVERSITE BATNA-2-
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES



THESE

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en sciences

Filière : Sciences Biologiques
Option : Biologie et Physiologie Animale

Présentée par :
Mme. BELHADI Kamilia

Thème

**Diagnostic Biologique et Moléculaire de la
Beta-thalassémie chez une Partie d'Enfants
d'Algérie**

Devant le jury

Présidente : Mme. HAMBABA Leila	Professeur	Université Batna- 2-
Rapporteur : Mr. YAHIA Mouloud	Professeur	Université Batna-2-
Examinatrice : Mme. SATTA Dalila	Professeur	Université Constantine -1-
Examineur : Mr. ZOUAGHI Youcef	MCA	Université Constantine -1-
Invité : Mr. LAROUI Salah	Professeur	Université Batna- 2-

Année Universitaire: 2017/2018



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**
UNIVERSITE BATNA-2-
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES



THESE

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en sciences

Filière : Sciences Biologiques
Option : Biologie et Physiologie Animale

Présentée par :
Mme. BELHADI Kamilia

Thème

**Diagnostic Biologique et Moléculaire de la
Beta-thalassémie chez une Partie d'Enfants
d'Algérie**

Devant le jury

Présidente : Mme. HAMBABA Leila	Professeur	Université Batna- 2-
Rapporteur : Mr. YAHIA Mouloud	Professeur	Université Batna-2-
Examinatrice : Mme. SATTA Dalila	Professeur	Université Constantine -1-
Examineur : Mr. ZOUAGHI Youcef	MCA	Université Constantine -1-
Invité : Mr. LAROUI Salah	Professeur	Université Batna- 2-

Année Universitaire: 2017/2018

Remerciements

A Dieu tout puissant qui m'a donné la force et la patience, la santé, le courage d'accomplir ce modeste travail.

A mon directeur de thèse **Monsieur YAHIA Mouloud**, Professeur à l'Université de Batna et Directeur de notre laboratoire de recherche, vous m'avez fait le grand honneur de me confier cette thèse et de me guider avec bienveillance dans sa réalisation. Veuillez, trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect et mes vifs remerciements.

Aux Maîtres

Président et membres du Jury :

Professeur **HAMBAB Leila**

Professeur **SATTA Dalila**

Docteur **ZOUAGHI Youcef**

Professeur **LAROUUI Salah**

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

Au Docteur **BENDAOUD Fadhila**, Médecin spécialiste en Pédiatrie au CHU de Batna pour son amitié, son aide et serviabilité.

Aux professeur **GRIBAA Moez** et docteur **BENCHARAFEDDINE Ilhèm**. Laboratoire de Cytogénétique, de Génétique Moléculaire et de Biologie de la Reproduction Humaines, Hôpital Farhat Hached, Sousse, Tunisie pour leur attention, leur disponibilité et leurs qualités humaines.

Dédicaces

Je dédie cette thèse

A la mémoire de ma mère

J'aurai tant voulu qu'elle soit toujours là

A mon très cher père qui m'a toujours entouré de son affection sereine

A mon mari et mes enfants

A mes très chers sœurs et frères

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 majeure ; ceux que je connais et les centaines de personnes qui sont atteintes en Algérie et à travers le monde, leur immense courage et leur patience infinie m'ont appris comment combattre sans perdre.

BELHADI Kamília

Liste des abréviations

BET: Bromure d'éthidium

CCMH: Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CLHP-EC: Chromatographie liquide haute performance sur colonne échangeuse de cations

DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis

ddNTP: Didésoxyribonucléotide triphosphates.

dNTP: Désoxyribonucléotide triphosphates.

DHPLC: Denaturing high performance liquid chromatography

EDTA: Ethelène diamine Tétracétique

fl : Femtolitre (1fl = 10⁻¹⁵L)

FT4: Thyroxine libre

GH: Growth hormone

Hb F: Hémoglobine fœtale

Hb: Hémoglobine

HbA1: Hémoglobine normal A

HbA2: Hémoglobine normal A

HCT: Hématocrite

HBB: Hemoglobin subunit beta

HRM: High Resolution Melting

IGF-1: Insulin-Like Growth Factor

IVS: Intervening Sequences

LCR: Locus Control Region

MLPA: Multiplex Ligation Probe Amplification

RFLP : Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction

PTH : Hormone Parathyroïdienne

QMPSF : Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments

RDB : Reverse Dot-Blot

RET : Réticulocyte

RP- HPLC : Chromatographie liquide haute performance en phase inverse

SPN: Single Nucléotide Polymorphism

SSCP: Single Stand Chain Polymorphism

TBE : Tris Borate EDTA

T4: Thyroxine

TCMH: Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

VGM: Volume Globulaire Moyen

Liste des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie théorique

Chapitre I : L'hémoglobine

I.1. L'hémoglobine.....	1
I.1. Structure	1
I.1.1. L' hème.....	1
I.1.2. Globine	1
I.2. Fonction	2
I.3. Biosynthèse.....	2
I.4. Structure et organisation des gènes de globine.....	3
I.4.1.Structure des gènes de globine	3
I.4.2. Localisation et organisation des gènes de globine.....	3
I.4.3. Gènes de globine.....	4
I.4.4. Régulation des gènes de globine.....	4
I.5. Modulation temporelle de l'expression de l'hémoglobine humaine au cours de développement	5

Chapitre II : La beta-thalassémie

II.1. Généralité.....	9
II.2. Classification du syndrome bêta –thalassémiques	10
II.2.1. Bêta -thalassémie mineure (trait β -thalassémique)	10

II.2.2. Bêta -thalassémie intermédiaire	10
II.2.3. Bêta-thalassémie majeure (ou maladie de Cooley).....	10
II.3. Physiopathologie de la bêta-thalassémie.....	11
II.4. Bases moléculaires des syndromes beta-thalassémique.....	12
II.4.1. Mutations ponctuelles	14
II.4.2. Mutations délétionnelles... ..	14
II.4.3. Mutants affectant l'ARNm	15
II.5. Distribution et épidémiologie	16
II.6. Bêta-thalassémie en Algérie	16

Chapitre III : Diagnostic et Traitement

III.1. Diagnostic biologique.....	18
III.1.1. Bêta-thalassémie mineure.....	18
III.1.2. Bêta-thalassémie majeure	18
III.1.3. Bêta-thalassémie intermédiaire	19
III.2. Techniques de diagnostic biologique	19
III.2.1. Bilan hématologique.....	19
III.2.2. Explorations biochimiques	19
III.3. Diagnostic moléculaire	21
III.3.1. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	21
III.3.2. PCR-RFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction).....	21
III.3.3. Technique Reverse dot-blot(RDB).....	22
III.4. Traitements	22
III.4.1. Bêta-thalassémie majeure	22

III.4.2. Béta-thalassémie mineure.....	25
III.4.3. Béta-thalassémie intermédiaire.....	25

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I.1. Diagnostic biologique.....	27
I.1.1. Patients.....	27
I.1.2. Méthodes	27
I.1.2.1. Technique de FNS (Formule Numération Sanguin).....	28
I.1.2.2. Ferritinémie.....	30
I.1.2.3. Examens de frottis sanguins périphériques.....	31
I.1.2.4. Électrophorèse capillaire ou électrophorèse de l'Hb à pH alcalin sur Capillarys® de Sébia.....	33
I.1.2.5. Analyses statistiques	35
I.2. Diagnostic moléculaire (recherche de mutations).....	35
I.2.1. Extraction de l'ADN à partir de lymphocytes sanguins	35
I.2.2. Détermination de la concentration et de la qualité de l'ADN.....	37
I.2.3. Détermination de la qualité de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	38
I.2.4. Miniséquençage à l'aide du kit SNaPshot™	38
I.2.4.1. Amplification du gène <i>HBB</i> : PCR 1.....	39
I.2.4.2. Réaction de miniséquençage : SNaPshot®.....	39
I.2.4.3. Purification du produit de SNaPshot®.	40
I.2.4.4. Migration sur séquenceur automatique.....	40
I.2.4.5. Analyse des résultats.....	41
I.2.5. Séquençage par la méthode de Sanger	42
I.2.5.1. Réaction de séquençage	42
I.2.5.2. Purification par le KIT « WIZARD® MAGNESIL™ » de PROMEGA.....	43

I.2.5.3. Visualisation et analyse du produit d'amplification par migration électrophorétique 43

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1. Caractères généraux de nos patients..... 45

II.1.1. Répartition par âge, âge de diagnostic, sexe et complication à l'âge de diagnostic..... 45

II.1.2. Répartition des patients selon la présence de consanguinité, degré de consanguinité et la forme de béta – thalassémie 48

II.1.3. Différentes endocrinopathies associées à la beta-thalassémie majeure 50

II.2. Etude des paramètres biologiques de notre population 54

II.2.1. Variation du nombre des GR, des GB, des réticulocytes et des plaquettes chez des enfants béta-thalassémiques homozygotes 54

II.2.2. Variation du volume globulaire moyen (VGM) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) chez les malades de beta-thalassémies homozygotes..... 54

II.2.3. Variation du taux de l'hémoglobine (g/dl) chez les malades de béta-thalassémies homozygotes 60

II.2.4. Etude d'aspect cytologique du sang chez les enfants beta-thalassémiques homozygotes 61

II.2.5. Etude de l'Hb par électrophorèse avant toute transfusion (Hb pré- transfusionnelle) 63

II.2.6. Evaluation de la surcharge en fer par le dosage de la ferritine de notre population 65

II.3. Quantification de l'ADN par le spectrophotomètre Nanodrop 66

II.4. Contrôle de la qualité d'ADN après extraction : Résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose 2% 67

II.5. Identification des mutations fréquentes du gène *HBB* par la méthode de miniséquençage multiplex à l'aide du kit SnapShot 67

II.6. Identification des mutations rares du gène *HBB* par la méthode de Sanger (séquençage direct) 74

II.6.1. Identification de la mutation codon 54(-T) (c.165 delT) 75

II.6.2. Identification d'une nouvelle association de l'Hb Knossos avec la mutation du codon 39 (C> T) dans la population algérienne 77

II.7. Effets des mutations du gène <i>HBB</i> sur les variations des paramètres biologiques de nos patients avant toute transfusion et sur l'aspect cytologique des hématies	80
II.7.1. Effets des mutations du gène <i>HBB</i> à l'état homozygote sur les variations des paramètres biologiques de nos patients avant toute transfusion.....	80
II.7.2. Effets des mutations du gène <i>HBB</i> sur l'aspect cytologique des hématies	82

Conclusion et perspectives

Liste des figures

Figure 1. Représentation du tétramère d'hémoglobine avec deux chaînes α (vert) et deux chaînes β (jaune) contenant chacune une molécule de l'hème (bleu)	1
Figure 2. Structure de la molécule d'hème.....	2
Figure 3. Localisation des gènes codant pour les sous-unités alpha et beta de l'hémoglobine.....	4
Figure 4. Structure et organisation des deux familles de gènes-globine	5
Figure 5. L'expression des gènes de globine de type α et β	7
Figure 6. Transmission de la beta-thalassémie : cas des parents ayant chacun deux gènes beta-globines mutés synthèse	9
Figure 7. Schématisation du gradient de gravité des β -thalassémies en fonction du génotype bêta et des principaux facteurs secondaires	11
Figure 8. Physiopathologie de beta-thalassémie	12
Figure 9. Mutations responsables de β -thalassémies.....	13
Figure 10. Répartition géographique des patients beta-thalassémiques majeurs dans le nord d'Algérie.....	17
Figure 11. Représentation schématique du principe de test ECLIA.	31
Figure 12. Procédure de purification d'ADN utilisant FlexiGene DNA.....	36
Figure 13. Exemple de courbe de dosage obtenue par le Nano Drop.....	37
Figure 14. Analyse GeneScan de la réaction de miniséquençage multiplex.....	41
Figure 15. Séparation des fragments dans le capillaire et passage au niveau de la fenêtre de lecture où ils sont excités par le LASER.....	44
Figure 16. Profil de séquence d'ADN.....	44
Figure 17. Répartition des enfants beta-thalassémiques selon le sexe.....	45
Figure 18. Le taux de la consanguinité chez nos patients.....	48

Figure 19. Répartition des enfants selon les résultats de l'enquête familiale.....	48
Figure 20. Variation du nombre des globules rouges (10^6 /mm ³) chez les malades de β -thalassémies homozygotes	55
Figure 21. Variation du nombre des réticulocytes (Rétic /mm ³) chez les malades de β -thalassémies homozygotes.....	55
Figure 22. Variation du taux des plaquettes (10^3 /mm ³) chez les malades de β -thalassémies homozygotes	56
Figure 23. Variation du nombre des leucocytes (10^3 /mm ³) chez les malades de β -thalassémies homozygotes	56
Figure 24. Variation du volume globulaire moyen (VGM) (fl) chez les malades de β -thalassémies homozygotes	59
Figure 25. Variation la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) (pg) chez les malades de β -thalassémies homozygotes.....	59
Figure 26. Variation du taux de l'hémoglobine (g/dl) chez les malades de β -thalassémies homozygotes	60
Figure 27. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote montrant des hématies hypochromes microcytaires avec une anisocytose et poïkilocytose. (Coloration de Wright : 40×100).....	65
Figure 28. Exemple d'un profil électrophorétique de l'Hb à pH alcalin chez un enfant β -thalassémique homozygote	63
Figure 29. Exemple d'un profile électrophorétique d'un sang normal.....	64
Figure 30. Variation du taux de la ferritine chez des enfants beta-thalassémiques homozygotes	65
Figure 31. Exemple représentatif d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par PCR1 (355pb) gène <i>HBB</i> . La piste M indique le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 100 pb). Les autres pistes correspondent à des cas β -thalassémiques.....	67

Figure 32. Electrophérogramme montre un pic pour codon 39 (C> T) mutation à l'état homozygote.....	69
Figure 33. Electrophérogramme montre un pic pour codon 39 (C> T) mutation à l'état hétérozygote.....	69
Figure 34. Electrophérogramme montre un pic pour codon 39 (C> T) et un pic pour IVS-I-110 (G>A) mutation à l'état hétérozygote composite.....	70
Figure 35. Electrophérogramme montre un pic pour IVS-I-110 (G>A) mutation à l'état hétérozygote.....	70
Figure 36. SNaPshot Normale à séquencer.....	71
Figure 37. Séquence d'ADN du gène β -globine humaine, y compris la localisation des deux mutations rares détectées.....	75
Figure 38. Une partie d'électrophérogramme obtenu par séquençage de l'ADN génomique provenant du patient beta-thalassémique homozygote montre la présence de la mutation Codon 54(-T) (c.165delT).....	76
Figure 39. Une partie d'électrophérogramme obtenu par séquençage de l'ADN génomique provenant d'un enfant beta-thalassémique montre la présence de la mutation c.82G>T (Hb Knossos) à l'état hétérozygote.....	78
Figure 40. Electrophérogramme montre un pic pour codon 39 (C> T) mutation à l'état hétérozygote.....	78
Figure 41. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote présente de la mutation codon 39 (C>T) montrant la présence des érythroblastes basophiles et érythroblastes acidophiles, une augmentation du taux des plaquettes et des leucocytes avec des hématies hypochromes microcytaires. (Coloration de Wright : 40×100).....	82
Figure 42. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote présente de la mutation hétérozygote composite IVS-I-110 (G>A)- Codon 39 (C>T) montrant la présence d'érythrocytes anormalement petits, une augmentation du taux des plaquettes et des leucocytes avec des hématies hypochromes microcytaires. (Coloration de Wright : 40×100).....	82

Figure 43. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote présente une association de l' Hb Knossos avec la mutation du codon 39 (C> T) montrant une microcytose hypochromie, une présence de nombreux dacryocytes avec une hyper éosinophilie. (Coloration de Wright : 40×100).....83

Figure 44. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote présente de la mutation Codon 54(-T) (c.165delT) montre une anisocytose avec tendance microcytaire, hypochromie et une présence de nombreux annulocytes. (Coloration de Wright : 40×100).....83

Liste des tableaux

Tableau 1. Quelques exemples des différents types de mutations β -thalassémiques.....	13
Tableau 2. Valeur biologique des différents paramètres pris en compte dans le diagnostic des β -thalassémies.....	20
Tableau 3. Amorces utilisées lors de la réaction de miniséquençage.....	40
Tableau 4. Représentation des enfants beta-thalassémiques selon l'âge, l'âge de diagnostic, sexe et complications.....	45
Tableau 5. Résultats de l'enquête familiale.....	48
Tableau 6. Fréquences des différentes endocrinopathies associés à la bêta-thalassémie majeure de nos patients.....	50
Tableau 7. Variation du nombre desGR, des GB, des réticulocytes et des plaquettes chez des enfants β -thalassémiques homozygotes.....	54
Tableau 8. Variation du volume globulaire moyen (VGM) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) (pg) chez les malades de β -thalassémies homozygotes.....	58
Tableau 9. Variation du taux de l'hémoglobine (g/dl) chez les malades de β -thalassémies homozygotes.....	60
Tableau 10. Etude de l'Hb par électrophorèse avant toute transfusion (Hb pré-transfusionnelle).....	63
Tableau 11. Evaluation e la surcharge en fer par le dosage de la ferritine de notre population.....	65
Tableau 12. Résultats de l'analyse moléculaire (génotype des patients en fonctions des mutations identifiées).....	68
Tableau 13. Les paramètres hématologiques d'un patient qui présente la mutation du codon 54 (-T) à l'état hétérozygote.....	77
Tableau 14. Effets des mutations du gène <i>HBB</i> à l'état homozygote sur les variations des paramètres biologiques	80

Introduction

Introduction

Les désordres des hémoglobines humaines ou hémoglobinopathies, occupent une position unique en génétique pour plusieurs raisons. Elles sont les maladies génétiques les plus fréquentes du sang dans le monde, et elles sont responsables d'une morbidité substantielle.

La beta-thalassémie est une maladie héréditaire du sang, à transmission généralement autosomique récessive, résultant d'une insuffisance de production des chaînes de β -globine de l'hémoglobine [**Higgs et al., 2001**].

La maladie est due à une mutation dans le locus de la bêta-globine, pour laquelle environ 300 allèles de bêta-thalassémies ont été caractérisés [**Thein, 2013**].

Les mutations du gène *HBB* sont dues à un nombre élevé des défauts moléculaires qui sont majoritairement de nature ponctuelle, altérant les différentes étapes de l'expression du gène [**Weatherallet et al., 2012**]. La β -thalassémie majeure est causée par un défaut dans deux gènes qui conduit à une absence ou à une diminution importante de la synthèse de la β -globine conduisant à l'accumulation des α -globines et par conséquent une destruction oxydative de la membrane cellulaire des globules rouges. De nombreux troubles de la chaîne de la β -globine de l'hémoglobine conduisent à différents phénotypes de la maladie [**Thein, 2002**]. Parmi ceux-ci, une anémie héréditaire avec un large spectre phénotypique qui peut avoir une morbidité et une mortalité significative [**Rund et Rachmilewitz, 2005**]. Ces pathologies présentent une gamme de sévérités, chacune correspondant à une absence ou à une réduction de la synthèse de la protéine β -globine.

Ces maladies sont un véritable problème de santé publique généralement aggravé par le taux de consanguinité de la population (30 à 32%) [**Bellis et al., 2001**]. Différentes populations ont leur propre spectre de mutation [**Thein, 2002**]. En Algérie, la fréquence des mutations du gène beta-globine est de 3% [**Belhani, 2009**]; des recherches antérieures ont révélé une hétérogénéité moléculaire élevée de la β -thalassémie en Algérie [**Bennani et al., 1993**].

En Algérie, dans une étude réalisée, à Alger, sur 1000 couples mariés en 2006, la prévalence de la thalassémie hétérozygote est de 2% [**Zidani, 2012**].

La détermination de la fréquence du gène de la beta thalassémique en Algérie a été estimée à 3%, découlant d'études sur des échantillons ciblés [Belhani, 2009]. En 2006, sur les 1000 couples en instance de mariage, habitant à Alger, que la prévalence de la thalassémie est de 2%, contre 1,2% pour la drépanocytose [Zidani, 2012]. La plupart des malades (77.5 %) ont un phénotype β -thalassémique majeure, la faible proportion des malades (14.5 %) ont le phénotype intermédiaire [Belhani, 2009].

Les transfusions sanguines sont souvent nécessaires pour traiter les patients atteints de beta-thalassémie majeure [Qarietal., 2013].

L'objectif de notre étude est d'effectuer un diagnostic biologique et moléculaire de la β -thalassémie chez une partie d' enfants Algériens dans la wilaya de Batna, et d'étudier les aspects biologiques ainsi que de caractériser des mutations du gène *HBB* portées par les sujets malades (homozygotes et hétérozygotes) pour les placer dans le spectre de répartition dans la population Algérienne, ainsi que les effets de ces mutations sur les variations des paramètres biologiques chez ces patients. Les tests génétiques moléculaires seront de plus en plus important à l'avenir parce qu'ils sont prévus dans la compréhension de la base moléculaire de la maladie et peuvent conduire à des traitements pharmacologiques spécifiques à l'avenir.

Partie bibliographique

Chapitre I

L'hémoglobine

I. L'hémoglobine

I.1. Structure

L'hémoglobine (Hb), assemblage particulier de molécules, est une protéine présente dans les globules rouges [Eleftheriou, 2007], elle s'agit d'une protéine qui a un poids moléculaire de 64 450 daltons. Elle comprend quatre sous-unités formant une structure appelée tétramère. Chaque sous-unité contient une portion appelée « Hème » [Gyamong et Jobin, 2005], qui contient un atome de fer ferreux pouvant lier une molécule d'oxygène (O₂) [Schechter, 2008].

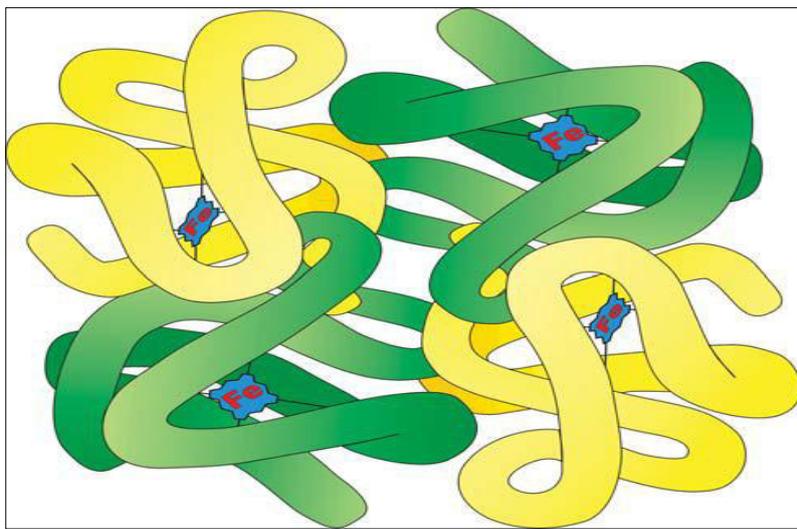


Figure 1. Représentation du tétramère d'hémoglobine avec deux chaînes α (vert) et deux chaînes β (jaune) contenant chacune une molécule de l'hème (bleu) [Caroline et Andrew, 2012].

I.1.1. L'hème

C'est une porphyrine contenant un atome de fer. La porphyrine comprend elle-même quatre noyaux pyrrol à sommet azote réunis par des ponts méthène (-CH=); et huit chaînes latérales; méthyl, vinyl ou acide propionique. Le fer est au centre, fixé sur 4 azotes des noyaux pyrrol et garde 2 valences libres. La molécule est plane [Bernard *et al.*, 1998].

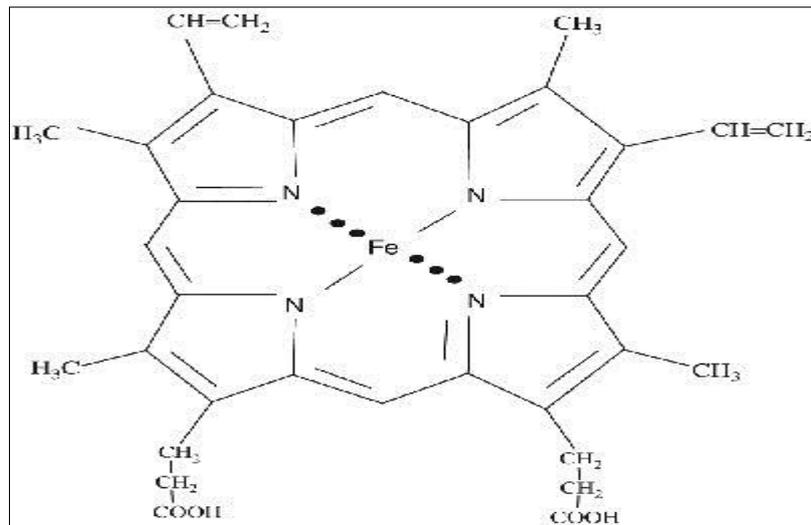


Figure 2. Structure de la molécule d'hème [Edward *et al.*, 2005].

I.1.2. Globine

La globine comporte quatre chaînes polypeptidiques semblables deux à deux [Couque et De montalembert, 2013]. Ces monomères sont de deux types assemblés par l'intermédiaire de liaison de faible énergie: deux chaînes α (type α : ζ et α -globine) constituées chacune de 141 acides aminés et deux chaînes non α (type β : ϵ , γ , δ , et β -globine) composées de 146 acides aminés. Chaque chaîne est liée à une molécule d'hème ayant en son centre un atome de fer [Wajcman *et al.*, 2002].

I.2. Fonction

Etant le composant primordial d'hématie, l'hémoglobine détermine la taille de la cellule, sa forme, sa déformabilité et son rôle, grâce à son aspect allostérique, l'hémoglobine a comme fonction principale, le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et l'élimination du CO_2 [Annaix et Thuillier, 2000]. Une molécule d'oxygène se fixe par atome de fer et 1 gramme d'hémoglobine peut transporter au maximum 1,34 millilitre (ml) d'oxygène lorsque la saturation est totale. soit environ 20 ml d'oxygène pour 100 ml de sang [Rosa *et al.*, 1993]. L'Hb est encore impliquée dans le transport du gaz carbonique (CO_2) des tissus aux poumons et dans le maintien de l'équilibre acido-basique [Hessissen et Harif, 2010]. Mais réciproquement à l' O_2 seulement une partie du CO_2 est transportée sous cette forme. En effet en cas de compétition l'affinité est en faveur de l' O_2 [Wajcman et Riou, 2009].

I.3. Biosynthèse

La synthèse de l'hémoglobine commence dès la troisième semaine de la vie intra-utérine. La synthèse de l'hème a lieu dans les mitochondries [Bernard *et al.*, 1998], dont la production (dépendante de la disponibilité de certains substrats (fer, pyridoxine ou vitamine B6, vitamine B12, acide ascorbique ou vitamine C, acide folique, cuivre) s'effectue à partir de la glycine et de l'acide succinique [Bedir et Miloudi, 2005], les porphyrines sont synthétisées puis le fer s'incorpore pour donner la molécule de l'hème. La synthèse de la globine suit le schéma de la synthèse des protéines et est sous la dépendance de gène de structure autosomique [Bernard *et al.*, 1998]. Environ 300 millions de molécules d'hémoglobines sont synthétisées de façon journalière [Eleftheriou, 2007].

I.4. Structure et organisation des gènes de globine

I.4.1. Structure des gènes de globine

Les gènes de globine α et β ont de petite taille, respectivement de 1,8 kb et 1,2 kb [Greene *et al.*, 2015], leur structure globale semblable : 3 exons et 2 introns. Tous les différents gènes de globine qui vont être décrits ci-dessous sont issus de l'association et/ou de duplications de ce gène ancestral unique. Chaque gène a ensuite pu évoluer indépendamment par des événements mutationnels qui ont abouti aux variations observées aujourd'hui entre les différents gènes [Hardison, 2012].

I.4.2. Localisation et organisation des gènes de globine

Les gènes de la globine humaine sont regroupés en deux groupes, le groupe α (ζ , α_2 , α_1) et le groupe β (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β). Ces gènes sont organisés sur un même modèle à 3 exons et résultent de transcriptions successives d'un ancêtre commun. L'ordre des gènes, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au sein de chaque complexe, reflète l'ordre de leur expression séquentielle au cours de l'ontogénèse [Kazaian et Antonarakis, 1997]. Les chaînes de type α codées par un ensemble de gènes au niveau du chromosome 16 (cluster α -globine). Les chaînes de type β codées par les gènes du cluster β -globine sur le chromosome 11 [Schechter, 2008] (Fig.3).

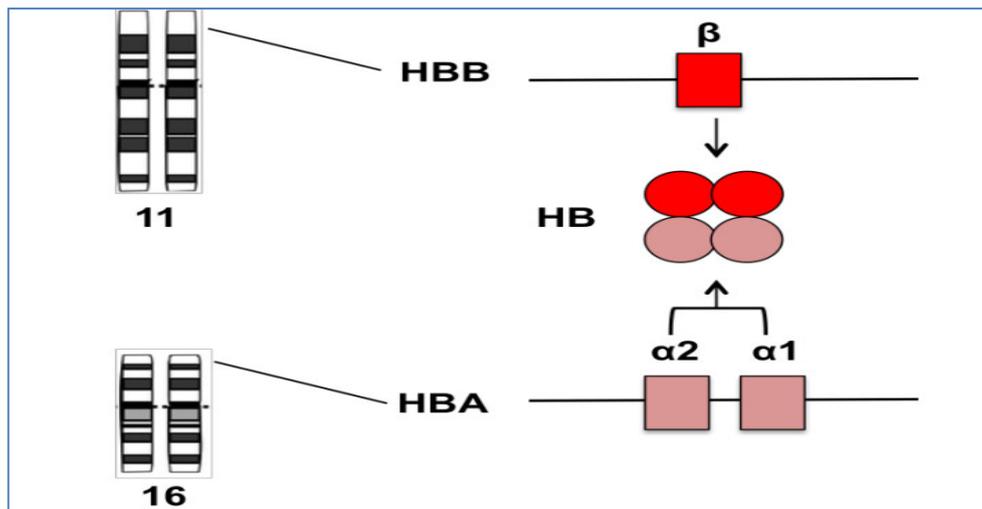


Figure 3. Localisation des gènes codant pour les sous-unités alpha et beta de l'hémoglobine [Cao et Galanello, 2010].

I.4.3. Gènes de globine

- **Gènes du locus α (cluster α -globine)**

Les gènes de type α sont situés sur le chromosome 16, dans la partie terminale du bras court [Joy et al, 2000]. La famille α comporte 3 gènes fonctionnels : le gène ζ code pour la chaîne embryonnaire ζ et précède les deux gènes des chaînes α : $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Les gènes $\Psi\zeta$, $\Psi\alpha 1$ et $\Psi\alpha 2$ sont, quant à eux, des pseudogènes non fonctionnels [Kaplan et Delpech, 2007].

- **Gènes du locus β (cluster β -globine)**

Les gènes de type β se trouvent à l'extrémité distale du bras court du chromosome 11 [Joy et al, 2000]. La famille β comporte cinq gènes fonctionnels: le gène de la chaîne ϵ embryonnaire qui est suivi par les deux gènes des chaînes fœtales ($G\gamma$ et $A\gamma$), puis par les deux gènes des chaînes adultes (δ et β). $\Psi\beta$ est un pseudogène non fonctionnel [Kaplan et Delpech, 2007] (Fig.3).

I.4.4. Régulation des gènes de globine

LCR (Locus Control Region) est la séquence HS40 en amont du locus β -globine, sur le chromosome 11. Ce sont les zones de destruction nucléosomique dans lesquelles l'ADN est susceptible d'être digéré par la DNase I. Ces zones rendent la région accessible à la transcription et aux les facteurs de remodelage de la

chromatine [Harju *et al.*, 2002]. Il se compose de 5 sites hypersensibles à la DNase1 (5'HSs 1 à 5) qui constituent une région contrôlant l'expression des chaînes de β . Les HS 1 à 4 ne se forment que dans les cellules érythroïdes, alors que 5'HS5 se retrouve dans de multiples lignées de cellules, mais n'est pas constitutif [Li *et al.*, 1999]. Deux autres HS ont été décrits par Routledge *et al* [2002]: HS6 et HS7, en amont de HS5. Sur le chromosome 16, un site unique, HS-40 contrôle l'expression des gènes de type α (Fig.4) [Labbie et Elion, 2005]. Les gènes des chaînes de globine sont donc sous le contrôle de locus régulateurs situés à une grande distance (40-50000pb) en amont de la partie 5' des gènes de globine. Ces régulateurs permettent l'activation de la transcription de gènes en venant à proximité du promoteur des gènes de globine par un repliement de la chromatine qui forme des boucles [Schechter, 2008].

La liaison entre le régulateur et le promoteur des gènes de globine permet ensuite de recruter et d'activer l'ARN polymérase II pour transcrire l'ARNm indispensable à la synthèse des chaînes de globine. D'une autre manière, tout un groupe de protéines parviennent interagir avec le LCR et les séquences d'ADN des gènes de globine pour contrôler l'expression des gènes de la famille β , ce qui devient plus difficile à comprendre cette régulation [Labbie et Elion, 2005].

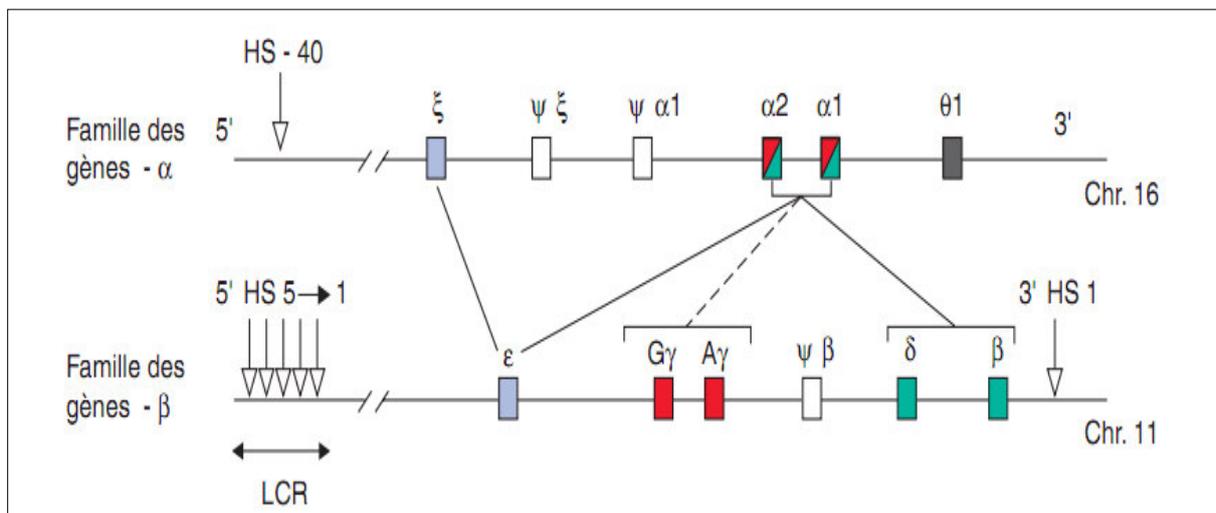


Figure 4. Structure et organisation des deux familles de gènes-globine [Labbie et Elion, 2005].

I.5. Modulation temporelle de l'expression de l'hémoglobine humaine au cours de développement

Chez l'homme quatre types physiologiques d'hémoglobines et de plusieurs formes pathologiques n'ayant pas toutes les mêmes expressions cliniques [Donze *et al.*, 1995]. L'hémoglobine A (HbA) ($\alpha_2 \beta_2$) est l'hémoglobine majoritaire au stade adulte et représente plus de 97% de l'hémoglobine totale [Forget, 2001], un type mineur, l'hémoglobine A₂, représentant 2 à 3 % de l'hémoglobine totale et l'hémoglobine foetale est appelée hémoglobine F (inférieur de 0,5%) [Donze *et al.*, 1995], elle est progressivement remplacée par l'Hb A au cours des premiers mois de vie. La chaîne alpha est donc commune à toutes les Hb présentes pendant la vie foetale et adulte, l'Hb A, l'HbA₂ et l'HbF ; seule la chaîne non-alpha diffère [Forget, 2001].

La modulation de l'expression des gènes globine s'effectue à certains niveaux [Labie, 2005]. Les gènes du cluster α , les gènes ζ_1 et ζ_2 sont prédominants à la 6ème semaine de stade embryonnaire. Au 2^{ème} trimestre, commence l'expression des gènes α_1 et α_2 . A propos des gènes du cluster β , ϵ est transcrit durant les 6 premières semaines de vie embryonnaire, ensuite le relais est pris par les gènes $G\gamma$ et $A\gamma$. Le gène β débute son expression au troisième trimestre, quelques semaines avant la naissance et devient majoritaire à 6 mois de vie ; les gènes $G\gamma$ et $A\gamma$ n'ont alors plus qu'une faible expression résiduelle. Le gène δ , ne différant seulement de quelques nucléotides avec le gène β , est activé après quelques mois de la vie, avec une expression faible et constante tout au long de la vie [Eleftheriou, 2007]. Les gènes exprimés du type β subissent plus de changement, dites « commutations », au cours du développement que les gènes du cluster α . Les gènes β sont donc plus sujets à présenter des anomalies génétiques que les gènes α [Philippe *et al.*, 2014].

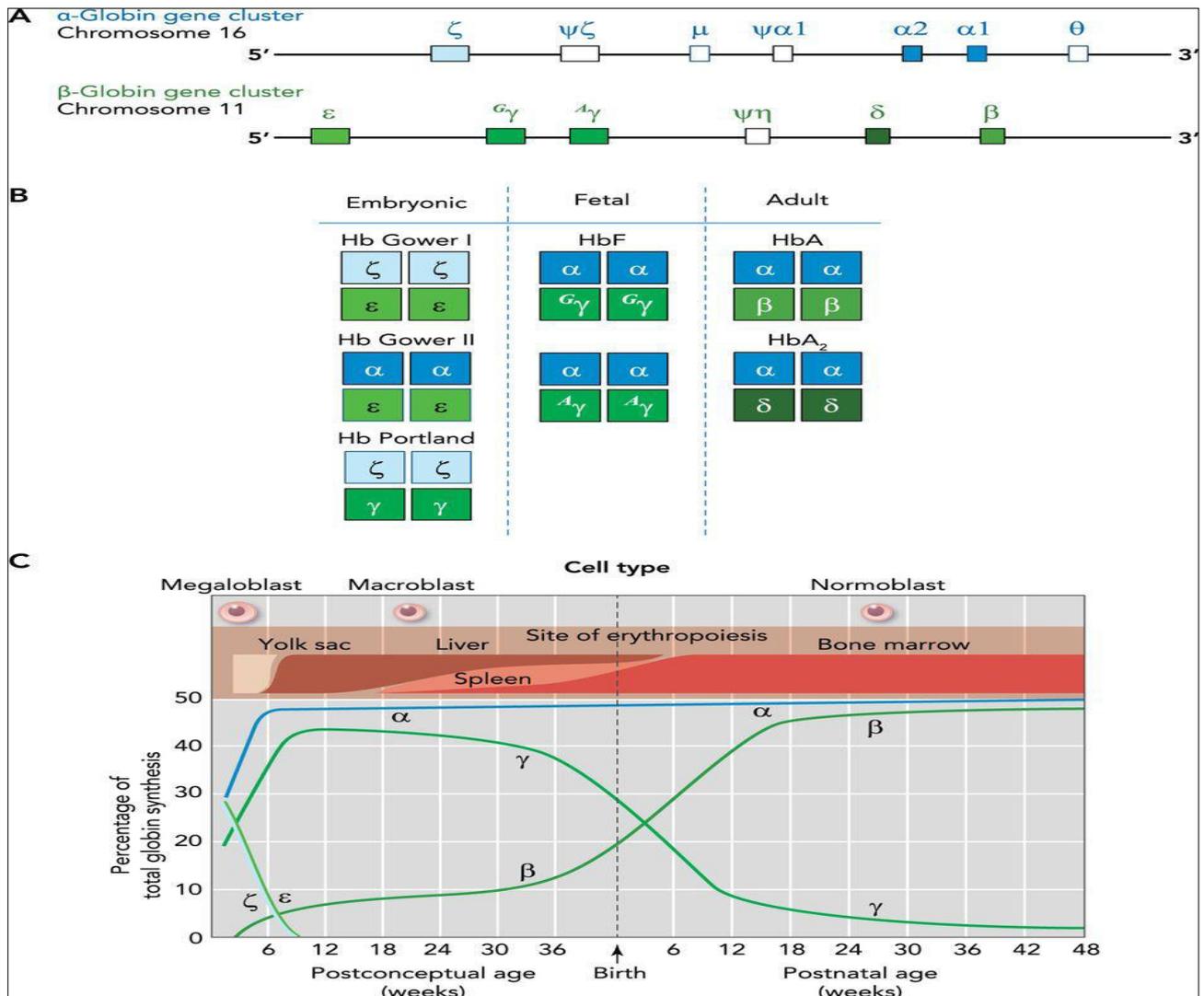


Figure 5. L'expression des gènes de globine de type α et β est régulée par le développement, ce qui entraîne la synthèse des hémoglobines fonctionnellement distincts. A: structure des grappes de gènes α et β de la globine humaine. B: l'ensemble des hémoglobines embryonnaires, foetaux et adultes Hb structurellement distincts, avec des sous-unités codées par chacun des gènes de type α et β exprimés avant et après la naissance. C: calendrier de développement pour les changements dans les niveaux d'expression des différents gènes de type α et β depuis les premiers stades de l'embryogenèse jusqu'à la fin de la première année de vie [Opazo *et al* 2015].

- **Chez l'embryon**

La formation des érythrocytes a lieu dans le sac vitellin et les globules rouges contiennent totalement des Hb embryonnaires. Deux types de chaînes α (ζ puis α) et de 2 chaînes de type β (ϵ et γ) coexistent [Panja, 2012]. Ces différentes sous-

unités permettent de réaliser les trois hémoglobines de l'embryon, d'après **Eleftheriou [2007]**, trois hémoglobines différentes sont synthétisées :

- Hb Gower 1 (de combinaison génétique $\zeta 1\varepsilon 2$),
- Hb Gower 2 (de combinaison génétique $\zeta 2 \alpha 2$),
- Hb Portland (de combinaison génétique $\zeta 2\gamma 2$).

- **Chez le fœtus**

De la 9^{ème} semaine de développement jusqu'à la naissance, l'hémoglobine F (HbF) est prépondérante. L'érythropoïèse se déroule au niveau du foie et de la rate. Cette période fœtale débute à partir de la 6ème semaine et on observe une synthèse d'hémoglobine fœtale ou HbF ($\alpha 2\gamma 2$). A ce stade le taux de l'Hb F est faible puis entre la 8ème et 10ème semaine son taux s'élève jusqu'à 90% [**Wajcman et Riou 2009 ; Panja et al., 2012**]. A noter que durant les périodes de vie intra-utérine, le cluster α -globine subit une seule commutation ou Switch pendant le développement (ζ , α), alors que le cluster β en subit deux (ε , γ) pendant la vie embryonnaire puis de γ β [**Philippe et al., 2014; Wajcman et al., 2002**], qui s'achève vers l'âge de 6 à 12 mois [**Degiroit et al., 2013**].

- **A la naissance et chez l'adulte**

La synthèse des hémoglobines se poursuit dans la moelle osseuse. Chez le nouveau-né, l'Hb fœtale est primordiale avec un taux proche de 85% [**De Girot et al., 2013**], de l'Hb A et de l'Hb A2 vers 0,3 à 0,7% [**Jeanne, 2010**].

Le taux d'Hb F est inférieur à 1 % vers l'âge d'un an, mais il peut diminuer plus tardivement [**Siguret et Andreux, 1997**], cependant continuer à synthétiser toute la vie adulte avec la majorité des adultes ayant <1% HbF. L'hémoglobine A1 devient donc majoritaire de façon définitive, à un taux de plus de 95% chez l'adulte. L'hémoglobine A2 (HbA2, de l'association génétique $\alpha 2\delta 2$) est également synthétisée, avec un taux de 3% chez l'adulte. Elle n'a pas de rôle physiologique [**Thein, 2009**].

Chapitre II

La beta-thalassémie

II.1. Généralités

Les beta-thalassémies sont un groupe de troubles héréditaires du sang, caractérisées par une synthèse réduite ou absente de chaîne β -globine [Galanello et Origa, 2010]. Dans les conditions physiologiques, ces deux chaînes, α et β -globine, sont synthétisées en des proportions identiques; elles fixent chacune une molécule d'hème et se combinent entre elles pour former un tétramère $\alpha_2 \beta_2$. Tout déséquilibre dans la synthèse de l'une des chaînes [Shriers, 2006] résulte une diminution de synthèse de l'hémoglobine adulte [Haddad *et al.*, 2014].

La transmission de la beta-thalassémie s'effectue de manière autosomique récessive, ce qui explique que les parents ne sont pas malades, mais qu'ils sont tous les deux porteurs d'un exemplaire du gène défectueux. Bien qu'étant porteur de la thalassémie n'a pas d'effets néfastes sur la santé, si un porteur a un enfant avec un autre porteur, il y a une probabilité sur quatre, soit 25% de chance pour que cet enfant aura la thalassémie majeure. Comme l'indique la figure 6, si les deux parents sont porteurs, pour chaque grossesse il ya une probabilité sur quatre (25% de chance) que l'enfant sera entièrement sain [Eleftheriou, 2007].

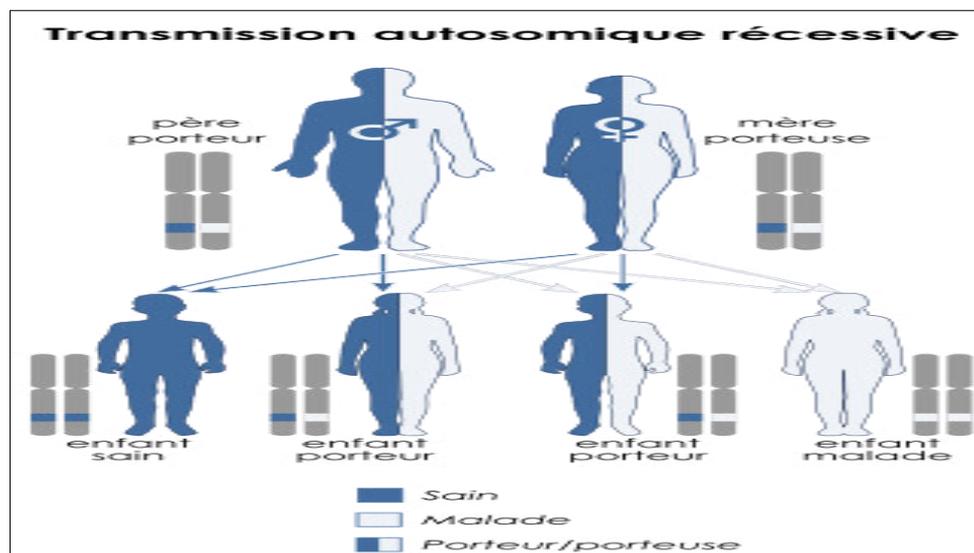


Figure 6. Transmission de la bêta-thalassémie : cas des parents ayant chacun deux gènes bêta-globines mutés [Lainé, 2004].

II.2. Classification du syndrome bêta -thalassémiques

On distingue trois syndromes cliniques de sévérité variable :

II.2.1. Bêta -thalassémie mineure (trait β -thalassémique)

Les sujets porteurs sont asymptomatiques, exceptionnellement une splénomégalie peut être constatée. Le taux d'hémoglobine est normal ou peu réduit [Weatheral, 2001], mais ont parfois une légère anémie. Quand les deux parents sont porteurs, il existe un risque de 25% à chaque grossesse d'avoir des enfants atteints de thalassémie homozygote [Galanello, 2010].

II.2.2. Bêta -thalassémie intermédiaire

Dans la bêta-thalassémie intermédiaire, les deux gènes bêta sont altérés, mais ils permettent tout de même de fabriquer l'hémoglobine en quantité réduite [Thuret , 2008]. Le spectre clinique des patients β -thalassémiques homozygotes est très variable. Elle regroupe environ 10% à 20% des bêta-thalassémies sévères. Elle présente les signes de la maladie de Cooley, mais sous une forme atténuée ne nécessitant pas un traitement transfusionnel systématique . Les enfants atteints de cette forme atténuée de bêta-thalassémie ont une croissance normale, une puberté parfois retardée mais complète [Weatheral, 2001].

II.2.3. Bêta-thalassémie majeure ou maladie de Cooley

La beta-thalassémie majeure est un type d'anémie chronique, héréditaire et microcytaire [Abed mahdi, 2014], la forme la plus grave d'entre les différents types de la thalassémie est la bêta thalassémie majeure qui se produit à la suite de l'héritage de deux mutations de la chaîne bêta globine soit dans les états homozygotes ou hétérozygotes composites. Les patients atteints de bêta-thalassémie majeure ont besoin de transfusions répétées de sang pour la survie en raison de l'anémie sévère [Shazia, 2012]. Malgré la gravité de la forme homozygote, aucune manifestation néonatale n'est observée [Perrimond, 2001].

L'anémie apparait souvent au cours du deuxième semestre de la vie, ce qui cause une fatigue excessive et une sensation de faiblesse chez le nourrisson, on remarque les manifestations suivant : fatigue , pleures, pâleur et jaunisse des lèvres, et des paumes des mains, ictère et perte d'appétit. Par ailleurs, en cas d'anémie sévère prolongée, On remarque une « hépatomégalie » (augmentation

du volume du foie), ainsi qu'une « splénomégalie » (celle de la rate) [Thuret, 2008].

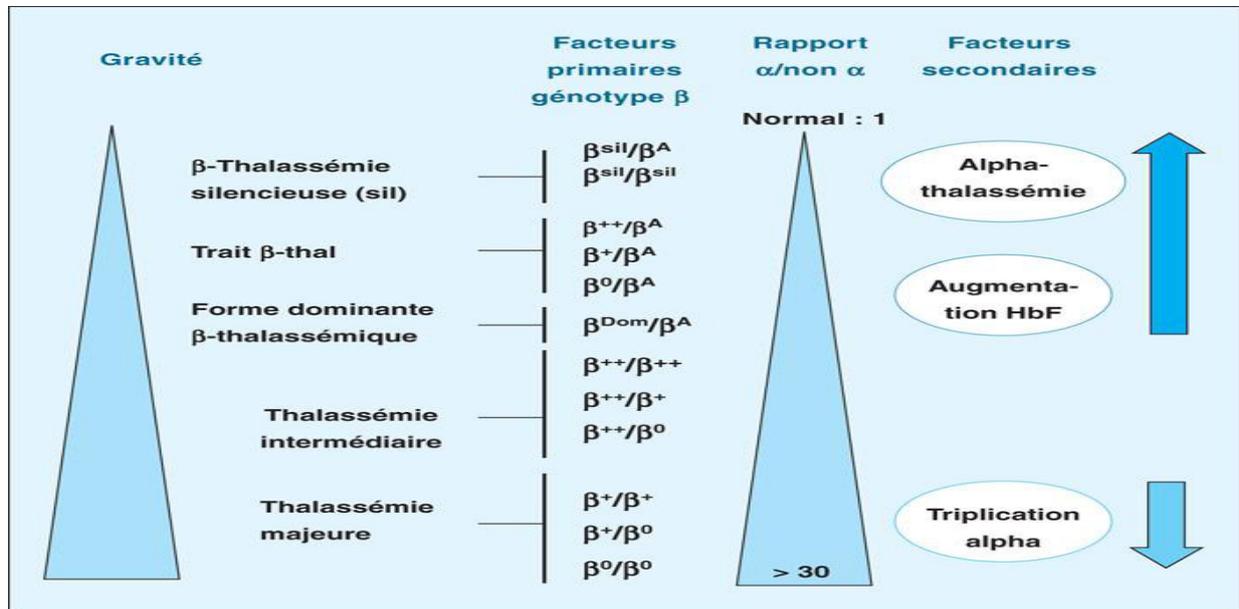


Figure 7. Schématisation du gradient de gravité des β -thalassémies en fonction du génotype et des principaux facteurs secondaires [Philippe *et al.*, 2014].

II.3. Physiopathologie de la bêta-thalassémie

La mutation β-thalassémique aboutissant à une suppression totale ou presque totale de l'expression du gène β globines [Efremov, 2007]. Quand les chaînes β globines sont réduites ou absentes, les chaînes α non assemblées précipitent au niveau des précurseurs des érythrocytes ,les α- globines forment des agrégats moléculaires qui précipitent formant des inclusions qui endommagent la membrane cellulaire et les membranes des organites intracellulaires [Rund et Rachmilewitz, 2005] et conduisent à une destruction oxydative de la membrane cellulaire provoquant une apoptose (érythropoïèse inefficace) [Stefano, 2009].

Les chaînes agrégées déclenchent également la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui endommagent encore les protéines et les constituants lipidiques des membranes cellulaires. Ainsi que l'hème et le fer [Rund et Rachmilewitz, 2005], l'un des produits les plus toxiques de α- chaînes est l'hémichromes [Weatherall *et al.*, 2012]. Le mécanisme physiopathologique est représenté dans la figure 8.

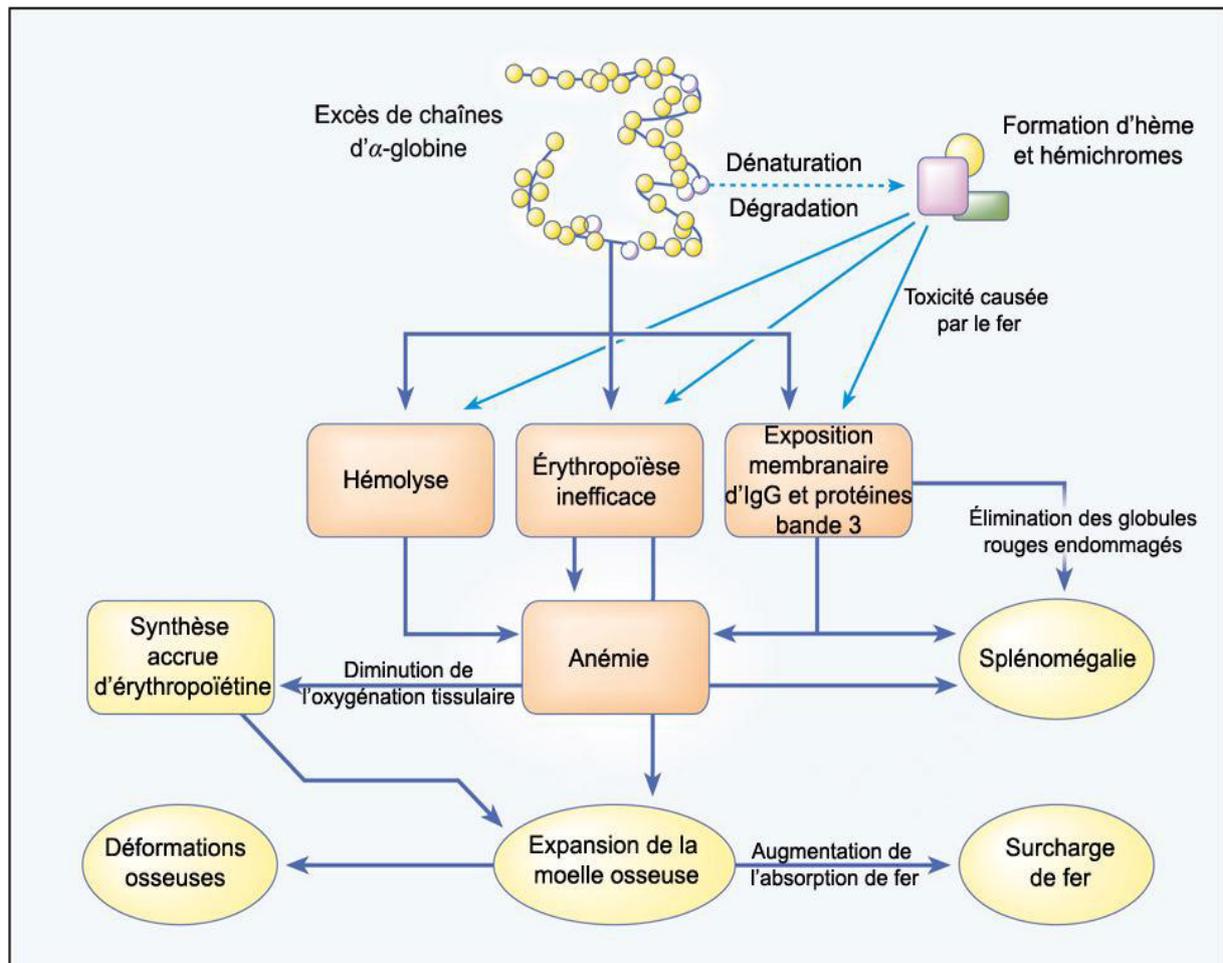


Figure 8. Physiopathologie de beta-thalassémie [Olivieri, 1999].

II.4. Bases moléculaires des syndromes beta-thalassémique

Si les symptômes cliniques des beta-thalassémies sont corrélativement homogènes, les bases moléculaires en sont extrêmement variées. [Bonello-Palot *et al.*, 2010]. Près de 300 allèles de β-thalassémie ont été caractérisés [Thein, 2013], ayant un impact sur la transcription de l'ADN en ARN, de l'épissage de l'ARN messenger ou la traduction de l'ARN messenger (codon non-sens, décalage du cadre de lecture) de la β-globine peuvent être à l'origine de beta-thalassémies [Cao et Galanello, 2010]. Des mutations sur la région régulatrice (LCR) des gènes de globine ont aussi été décrites [Higgs, 2012].

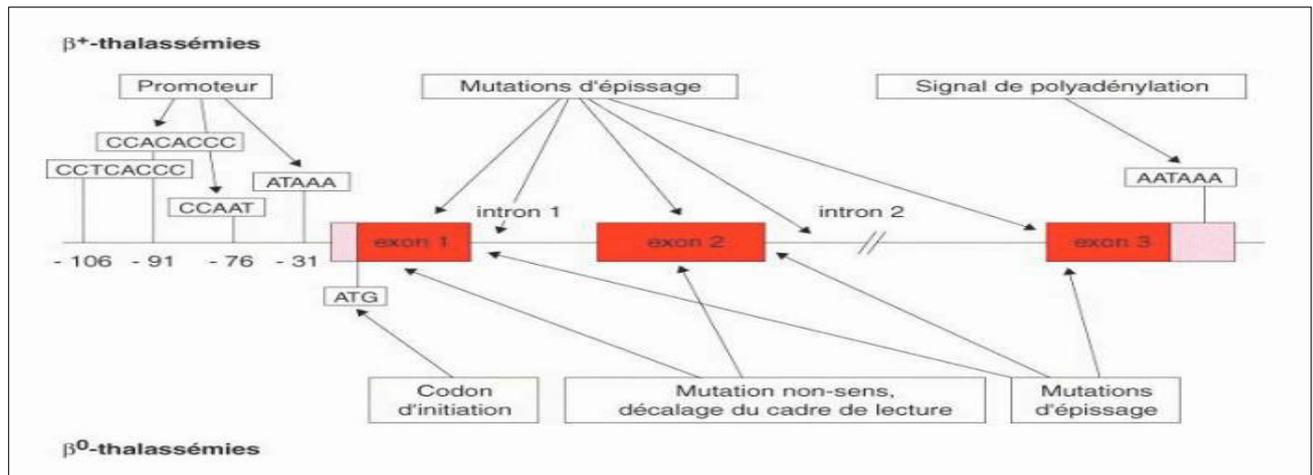


Figure 9. Mutations responsables de la beta-thalassémie [D’après Labie, 2005].

Dans la figure 9 sont représentés les grands types de lésions moléculaires conduisant d'une β -thalassémie hétérozygote, et ceux qui entraînent une β -thalassémie homozygote [Labie, 2005].

La grande majorité des β -thalassémies sont causées par des mutations impliquant au sein du gène *HBB* ou ses régions adjacentes [Giardine *et al*, 2011]. Des mutations ponctuelles ou à des microdélétions ou insertions de nucléotides. Ces mutations ont été observées sur toute l’étendue du gène β : exons, introns, sites d’épissage et leurs séquences consensus, promoteurs, autres régions non transcrites ou non traduites en 5’ et en 3’ [Labie, 2005].

Tableau 1. Quelques exemples des différents types de mutations β -thalassémiques [D’après Philippe *et al.*, 2014].

Type de mutation	Localisation sur <i>HBB</i>	Nomenclature usuelle	Nomenclature HGVS
β^0 -thal.	Codon initiation	Codon 0 ATG->ATT	HBB:c.3G>T
	Exon 1	Codon 39 (C->T)	HBB:c.118C>T
Site épissage	IVS-I-1 (G->A)	HBB:c.92+1G>A	817
β^+ -thal.	Promoteur	-88 (C->T)	HBB:c.-138C>T
Intron 1	IVS-I-5 (G->A)	HBB:c.92+5G>A	822
β -thal dominante	Exon 3	Codon 124 (-A)	HBB:c.375delA
β -thal silencieuse	3’-UTR – Site polyA	Poly A (T->C) ; AATAAA->AACAAA	HBB :c.*+110T>C

*HGVS : Human genome variation society ; HbVar ID : identification sur HbVar (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>)

II.4.1. Mutations ponctuelles

Ces mutations résultant à une suppression totale ou presque totale de l'expression du gène (mutation β^0 -thalassémique): ce sont des mutations non sens, [Bonello-Palot *et al.*, 2010], qui entraînent un arrêt de la traduction de l'ARNm dans l'initiation ou la phase d'élongation, conduisent à phénotype β^0 -thalassémie. La plupart de ces défauts résultent de l'apparition d'un codon de terminaison prématurée en aval en raison de décalage ou de mutations non-sens du cadre de lecture et presque tous se terminent dans le premier et le second exon [Thein, 2005] et les mutations des sites d'épissage GT et AG eux-mêmes, mais aussi des mutations moins fréquentes du codon d'initiation [Labie, 2005].

II.4.2. Mutations délétionnelles

Ces formes sont plus rares dans le groupe des beta-thalassémies mais peuvent être existées. Elles emmènent le gène beta-globine de façon séparée ou en combinaison avec d'autres gènes du locus. Ces délétions peuvent aussi ne toucher que la région régulatrice le LCR située en amont du locus et indispensable à l'expression correcte du gène de *HBB* [Bonello-Palot *et al.*, 2010].

Les délétions affectant uniquement le gène de la β -globine de 105 pb à 67 kb. Le phénotype associé à ces délétions est celui de la β -thalassémie majeure [Thein et Wood, 2009].

Deux délétions éliminent l'extrémité 3' mais préservent l'intégrité de l'extrémité 5' du gène de la β -globine. La délétion de 0,6 kb impliquant la fin 3' du gène de la β -globine est une cause relativement fréquente de β -thalassémie chez les Indiens d'Asie et représente environ un tiers des cas de β -thalassémie dans cette population [Thein *et al.*, 1984 ; Varawalla *et al.*, 1991]. La deuxième délétion a récemment été décrite dans l'hétérozygotie composée avec Hb S chez une femme des îles du Cap-Vert qui a présenté une drépanocytose [Andersson *et al.*, 2007]. La délétion supprime 7,7 kb, en commençant dans IVSII du gène de la β -globine et s'étendant 7,1 kb en aval. Les autres délétions diffèrent largement en taille, mais suppriment en commun une région dans le promoteur du gène *HBB* (des positions -125 à +78 par rapport au site de cap de l'ARNm), qui comprend les éléments CACCC, CCAAT et TATA. Ils sont associés à des niveaux exceptionnellement élevés de HbA₂ et des

augmentations variables de HbF dans les hétérozygotes. Il a été proposé que la délétion du promoteur élimine la concurrence pour le LCR en amont et la limitation des facteurs de transcription, permettant une plus grande interaction de le LCR avec les gènes cis δ et γ , améliorant ainsi leur expression. En effet, les études d'un individu hétérozygote pour la délétion de la β -thalassémie de 1,39 kb et un variant de la chaîne δ ont montré qu'il existe une augmentation disproportionnée de l'HbA₂ dérivée du gène δ en cis à la délétion du gène β -globine [Codrington *et al.*, 1990]. Le promoteur du gène *HBB* peut également être inactivé par des mutations ponctuelles et à nouveau, les porteurs ont des niveaux HbA₂ et HbF exceptionnellement élevés [Huisman, 1997].

II.4.3. Mutants affectant l'ARNm

Des mutations affectant l'ARNm de β -globine sont situées dans la 5' et 3' de la jonction d'épissage (le site donneur et le site accepteur), ainsi que dans les séquences consensus des jonctions d'épissage. Les mutations modifiant le site d'épissage conduisent à un déficit de la production d'ARNm fonctionnel entraînant une absence totale de chaînes polypeptidiques β -globine et par conséquent à β° -thalassémie [Thein, 1998].

Les mutations perturbant la traduction de l'ARNm dans la phase d'initiation ou l'allongement donne phénotype β -thalassémie majeure. La plupart de ces défauts résultent de l'introduction de codon stop par mutations non-sens et presque tous se terminent dans le premier et second exon [Thein, 2005].

Les mutations qui modifient le processus de maturation de l'ARN: ce processus a lieu par :

- les altérations des sites donneurs et accepteurs, ce qui empêche le processus d'excision des introns, processus d'épissage, et causent des formes graves de type β° -thalassémie [Huisman 1993] et la dégradation de l'ARNm, la modification du niveau de dinucléotide invariant jonctions exon / intron, qui empêchent le processus normal de séparation.
- les modifications des régions consensus autour des sites donneurs et accepteurs, ce qui réduit l'efficacité avec laquelle se produit l'excision des introns et donnent lieu à des formes de β - thalassémie de sévérité variable [Routledge *et al.*, 2002].

- les substitutions de nucléotides qui créent des sites d'épissage alternatif, aussi bien dans les introns, celle des exons. En général, ils provoquent un phénotype de type β + et ont différents degrés de gravité, qui dépend de la région dans laquelle le nouveau site est activé [Husman, 1997].

II.5. Distribution et épidémiologie

Les syndromes β -thalassémie sont l'un des autosomiques le plus commun des troubles héréditaires récessifs, ont une prévalence élevée dans les populations du bassin méditerranéen (surtout Sicile, Sardaigne, Calabre, Grèce), mais on les trouve aussi dans le Sud-Est asiatique (Thaïlande), plus rarement au Moyen-Orient, en Afrique et aux Antilles [Cao et Galanello, 2010]. Elle est considéré comme maladie génétique la plus répandue dans le monde entier [Patel *et al.*, 2016]. On évalue à 7% de la population mondiale, le nombre de porteurs d'une hémoglobinopathie sévère [Hamamy et Al-Allawi, 2013].

Il y a environ 15 000 patients atteints de β -thalassémie majeure en Iran, avec la plus forte incidence de Mazandaran, Fars et provinces Khuzestan [Adib-Hajbaghery *et al.*, 2015]. Aux États-Unis, environ 1000 personnes ont β -thalassémie majeure [Qari, 2013]. Alors que des sources expertes estiment que près de 1,5% de la population mondiale de 80 millions à 90 millions de personnes, sont porteurs de la thalassémie, Cependant, selon les dossiers de la Fédération Internationale de Thalassémie, seulement environ 200,000 patients atteints de thalassémie majeure [Eleftheriou, 2007].

II.6. Beta-thalassémie en Algérie

La beta-thalassémie est une maladie endémique dans la région méditerranéenne [Cao *et al.*, 1989]. Elle est fréquente en Algérie et l'incidence du gène beta-globine est estimée de 2 à 3% [Lapie *et al.*, 1990].

En Algérie quatre allèles ont été généralement trouvés, IVS-I-110 (G>A) (26.4%), codon non sens 39 (C>T) (25.9%), codon 6 (-A) (12.9%), et IVS-I-1 (G>A) (9.1%). La cinquième, IVS-I-6 (T> C) (6,2%) est effectivement trouvée dans une zone très limitée [Boudrahem *et al.*, 2009].

La mutation de codon 39 (C> T), et la mutation IVS-I-110 (G> A), ce sont en grande partie prédominante de 54 à 70% des mutations du gène de beta-globine en Algérie [Hadj Khelil *et al.*, 2010], la mutation du codon 39 est clairement dominante dans les environs d'Alger et dans l'ouest de pays [Boudrahem *et al.*, 2009] et fréquente dans les pays d'Afrique du Nord. C'est une mutation de la Méditerranée occidentale peut-être une origine romaine [Hamamy et Al-Allawi, 2013].

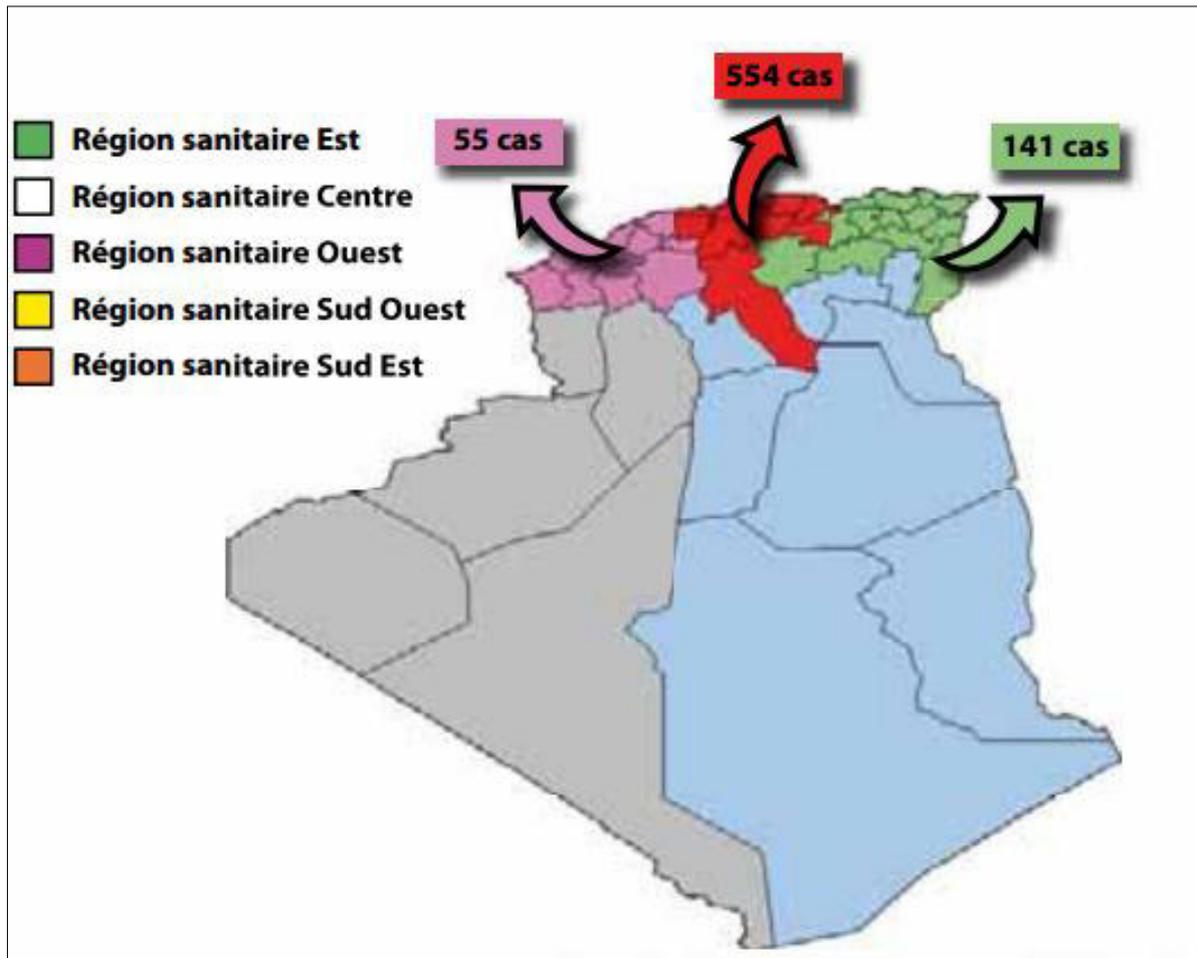


Figure 10. Répartition géographique des patients beta-thalassémiques majeurs dans le nord d'Algérie [Belhani, 2009].

Chapitre III

Diagnostic et Traitement

III.1. Diagnostic biologique

Dans la majorité des cas, les beta-thalassémies sont les conséquences d'une mutation survenue dans le gène β -globine. La transmission génétique est mendélienne récessive autosomique [Weatherall *et al.*, 2001].

III.1.1. Bêta-thalassémie mineure

Le trait beta-thalassémique est la forme observée chez le porteur sain ou hétérozygote [Yuan *et al.*, 1993], pour un allèle β^0 et β^+ [Philippe *et al.*, 2014]. Elle n'a pas d'expression clinique mais est associée à des signes biologiques extrêmement constants, une pseudo polyglobulie microcytaire, une hypochromie et augmentation de la fraction A2 de l'hémoglobine [Yuan *et al.*, 1993]. Il existe cependant de rares formes silencieuses du trait Bêta-thalassémique, sans augmentation de l'hémoglobine A2 [Perrimond, 2001]. Puisqu'on peut également la rencontrer sous traitement antirétroviral ou en cas de troubles thyroïdiens ou de carence de vitamine B12 ou en folâtes [Mosca *et al.*, 2008]. Mais dans la majorité des cas les formes hétérozygotes sont détectées au cours d'une enquête familiales et ils présentent un hémogramme normal [Belhadi, 2011].

III.1.2. Bêta-thalassémie majeure

La beta-thalassémie majeure est la forme correspondant à l'absence totale d'HbA par défaut de chaînes β -globine [Yuan *et al.*, 1993]. Elle apparaît chez l'enfant entre 1 et 5 ans [Modell et Berdoukas, 1984].

L'hémogramme révèle une anémie profonde, inférieur à 7g/dl, microcytaire (volume globulaire moyen (VGM) entre 60 et 65fl), hypochrome (teneur moyenne en hémoglobine inférieur à 26 pg) [Borgna-Pignatti *et al.*, 2004]. L'examen des frottis sanguin des hématies montre une hypochromie, une anisocytose, une poikilocytose et une érythroblastose parfois très élevée, jusqu'à 100 000 éléments par mm³. La moelle est très riche en érythroblastes [Giro, 1999]. Le diagnostic repose sur l'électrophorèse de l'hémoglobine (Hb) avec augmentation de l'HbF (40 à 90%) alors que chez un sujet normal, après l'âge de 6 mois, il n'en existe pas plus de 2%, légère augmentation d'HbA, et taux très faible d'HbA2 [Khayat et Auclerc, 1990].

III.1.3. Bêta-thalassémie intermédiaire

Les patients atteints de la β -thalassémie légère à modérée ont une anémie intermédiaire et dans la plupart des cas ne nécessitent pas de transfusions sanguines [Taher *et al.*, 2006].

Cette condition est plus douce que la thalassémie majeure en raison de l'héritage d'une mutation du gène de globine- β associée avec chaîne β -globine de production réduite. Le génotype déduit est le plus souvent β^+ / β^+ [Aessopos *et al.*, 2007]. Le phénotype clinique de thalassémie intermédiaire est à peu près intermédiaire entre thalassémie majeure et mineure [Harteveld *et al.*, 2008].

III.2. Techniques de diagnostic biologique

III.2.1. Bilan hématologique

L'hémogramme ou Numération Formule Sanguine est le premier examen donnant des informations nécessaires permettant de suspecter une hémoglobinopathie. [Belhadi, 2011]. Les paramètres biologiques sont mesurés de façon électronique par un compteur d'hématies donnant : la numération érythrocytaire, l'hématocrite, le taux d'hémoglobine, les indices érythrocytaires (VGM, TCMH, CCMH) [De Girot, 2012]. Par ailleurs, le frottis sanguin, précieux outil de diagnostic cytologique a permis de détecter les anomalies morphologiques (taille, forme, coloration, inclusions) des cellules sanguines [Greene *et al.*, 2012].

III.2.2. Explorations biochimiques

Pour une identification préconçue des anomalies hémoglobiniques ou quantification des hémoglobines, les techniques analytiques basées sur la séparation des particules sont employées au sein du laboratoire [Stephens *et al.*, 2011].

- **Electrophorèse capillaire de zone**

Cette technique, récemment adaptée à l'étude des Hb, est rapide, automatisée et donne une méthode plus efficace et rapide que celle de l'électrophorèse à pH alcalin, et qui tend à devenir une technique de choix pour l'étude de l'Hb [Cotton *et al.*, 2006]. Les fractions d'Hb se séparent sous l'influence d'un champ électrique, généralement sur base de leur rapport charge/masse [Blessum *et al.*, 1999].

- **Techniques chromatographiques**

L'utilisation d'une méthode chromatographique permet l'identification et la quantification précise des hémoglobines [Traeger-Synodinos *et al.*, 2014].

- **Chromatographie liquide haute performance sur colonne échangeuse de cations (CLHP-EC)** : considérée par de nombreux laboratoires comme la méthode de choix pour quantifier les différentes fractions des Hb normales et anormales. Les différentes fractions d'hémoglobine sont séparées par un gradient de tampons de force ionique et de pH croissants [Lacan *et al.*, 2002]. En effet, il est recommandé d'utiliser comme premier test l'électrophorèse capillaire automatisée ou la CLHP par échange de cations (Antonia *et al.*, 2009). L'étude de l'hémoglobine par chromatographie liquide haute performance (CLHP) doit être pratiquée avant toute transfusion [Alla, 2004].

- **Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)** : Elle procède à l'étude séparative des chaînes de globine en fonction de leur Hydrophobicité . Cette méthode destinée aux laboratoires spécialisés de l'étude de l'Hb, contribue à la séparation et l'identification de la majorité des hémoglobines instables [Wajcman et Riou J, 2009].

Tableau 2. Valeur biologique des différents paramètres pris en compte dans le diagnostic des β -thalassémies [Couque et De Montalembert, 2013 ; Al-Riyami *et al.*, 2014].

		Témoïn non malade	β -Thalassémie Majeure	β -Thalassémie Intermédiaire	β -Thalassémie Mineure
Hémogramme	Hb (g/dL)	13 - 17	x < 5-7	7-10	x > 10
	VGM (fL)	80 -100	50 - 70	60-70	60 - 70
	TCMH (pg)	27 - 32	12 - 20	29-31	20 - 22
	Fer (mg/L)	0,55 - 1,65	élevée	normale	normale
	Ferritine (μ g/L)	20 - 310	<1000	élevée	normale
Hémoglobines	HbA (%)	97	absente ou très faible	30-90	87 - 96
	HbA2 (%)	2.5	3,5 - 7	>3,5	3,5 - 7,5
	HbF (%)	0,5 - 1	90 >	7 - 70	0,5 - 4

III.3. Diagnostic moléculaire

Dans le cas d'une suspicion de beta-thalassémie mineure, une confirmation génétique chez le propositus et ses parents est indispensable étant donné la gravité potentielle de la maladie, la caractérisation génétique de la mutation apporte une grande chose dans la thérapie ainsi que dans le cas d'un couple où les deux membres sont porteurs en raison d'un risque de beta-thalassémie homozygote pour leur descendance. Dans ce cas, il faut impérativement identifier les mutations des deux membres pour pouvoir proposer un conseil génétique éclairé et, éventuellement, un diagnostic prénatal [**Philippe et al., 2014**].

La caractérisation exacte de génotypes dans des supports permet d'assurer la présence d'une bêta-thalassémie. L'étude des lésions moléculaires affectant les gènes passe par des méthodes précieuses qui analysent l'ADN [**Couque et De Montalembert, 2013**]. Les techniques utilisées pour la caractérisation moléculaire des anomalies de l'Hb sont les mêmes que pour l'étude de n'importe quel autre gène [**Amato et Giordano, 2009**].

III.3.1. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

L'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) et le séquençage des gènes de globine constituent respectivement des outils importants dans le diagnostic et la confirmation de la présence des hémoglobines anormales [**Martinez, 2007**]. Cet examen consiste à effectuer une électrophorèse d'un produit PCR (ADN double brin) dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient linéaire croissant de dénaturants chimiques (urée et formamide) à une température de 60 °C [**Ghanem et al., 1992 ; Sheffield et al., 1989 ; Lerman et Silverstein, 1987**].

III.3.2. PCR-RFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction)

La technique de la PCR en temps réel est reposée sur l'exploration et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR [**Bustin, 2000**].

III.3.3. Technique Reverse dot-blot (RDB)

C'est une technique d'immobilisation des sondes d'oligonucléotides spécifiques d'allèles sur une membrane en nylon, plutôt que les échantillons d'ADN individuels. Ceci est un procédé non radioactif. Dans ce format, plusieurs paires de sondes mutantes et normales sont repérés sur des bandes de membranes en nylon [Saiki *et al.*, 1989], cette technique est développée plus tard à l'écran de nombreuses mutations de β -thalassémie dans la population sicilienne et pour une utilisation dans le diagnostic prénatal [Maggio *et al.*, 1993; Giambona *et al.*, 1995].

III.4. Traitements

Il n'existe aucun traitement spécifique permettant de corriger les défauts structuraux des hématies thalassémiques [Orsini, 1982].

III.4.1. Béta-thalassémie majeure

Si le traitement transfusionnel n'est conformément adopté, la décédé se produit pour la majorité des patients avant l'âge de 4 ans, les autres dépassent parfois l'âge de 10 ans. Quelques très rares sujets porteurs d'une forme homozygote atteignent l'âge adulte. La décédé se produit dans tous les cas, dans un état de dégradation générale et d'insuffisance pluriviscérale [Perelman, 1977].

a. Transfusion sanguine:

Les transfusions régulières corrigent l'anémie, suppriment l'érythroïèse, et inhibent l'augmentation de l'absorption digestive du fer. Avant de commencer les transfusions, il est absolument nécessaire d'effectuer la vaccination contre l'hépatite B et d'effectuer de nombreuses analyses sanguines et la détermination d'immunoglobuline sérique, ce dernier qui détecte les individus avec un déficit en IgA qui requièrent une attention particulière, la préparation de l'unité de sang avant chaque transfusion. Le régime de la transfusion est conçu pour obtenir une pré-transfusion concentration d'Hb de 95-100 g / L. Les transfusions sont habituellement donnés tous les deux à trois semaines [Taher *et al.*, 2010].

b. Chélation du fer :**• Desferrioxamine .**

Cette molécule hexadentée, qui lie le fer de manière stable dans un ratio 1: 1, elle est utilisée depuis plus de 40 ans et reste un agent précieux malgré le lourd nature de son utilisation parentérale. Il a une toxicité douce [Taher *et al.*, 2009]. C'est le premier chélateur introduit cliniquement était désferrioxamine B (MPO) administré cinq à sept jours par semaine par perfusion sous-cutanée continue de 12 heures par l'intermédiaire d'une pompe portative. La posologie recommandée dépend de l'âge de l'individu et la concentration de ferritine sérique. la thérapie desferrioxamine B empêche les effets secondaires de la surcharge en fer, ce qui entraîne une diminution constante de la morbidité et de la mortalité [Borgna-Pignatti *et al.*, 2004].

• Défériprone

Un chélateur oral, est administré à une dose de 75 à 100 mg /kg/jour [Galanello et Campus, 2009]. L'effet de la défériprone sur la concentration hépatique en fer peut varier entre les individus traités. Cependant, les résultats d'études indépendantes suggèrent que la défériprone est plus cardioprotecteur que désferrioxamine [Anderson *et al.*, 2002 ; Piga *et al.*, 2003].

• Déférasirox

Le déférasirox a été développé en tant que monothérapie orale une fois par jour pour le traitement de la surcharge en fer transfusionnelle. Il est efficace chez les adultes et les enfants et a un profil de sécurité défini qui est cliniquement gérable avec une surveillance appropriée. Les événements indésirables les plus fréquents liés au traitement sont des troubles gastro-intestinaux, éruptions cutanées, et une légère augmentation, non-progressive de la concentration de créatinine sérique [Cappellini, 2008].

c. Splénectomie

Le développement d'un hypersplénisme est pratiquement constant, souvent évoqué devant l'augmentation des besoins transfusionnels avec parfois une leucopénie ou une thrombopénie. La vaccination anti-pneumococcique est nécessaire ; le risque thromboembolique est élevé [Weatherall et Clegg, 1981].

d. Médications divers

Quelques médicaments peuvent être utilisées dans le traitement de la maladie de Cooley. L'administration de vitamine B₁₂ et l'acide folique peuvent améliorer dans une certaine mesure l'érythroïèse de ces patients, qui, du fait de leur hyperactivité médullaire ont des besoins accrus en ces vitamines. L'administration d'androgènes a été proposée par analogie avec certaines insuffisances médullaires, en dehors d'une amélioration certaine de l'état général, leur effet sur l'érythroïèse thalassémique n'est pas démontré. La prescription de vitamine B₁₂ ou de préparations polyvitaminiques a un effet non négligeable sur l'état général. La calcitonine est une thérapeutique très efficace des formes sévères de l'ostéoporose thalassémique [Orsini, 1982].

e. Transplantation médullaire

Dès la première greffe de moelle intrafamiliale en 1981, les enfants peuvent être guéris. C'est la seule thérapeutique curative actuelle. Mais, dans la pratique, moins de 30% des malades trouvent un donneur compatible et le taux de réussite de l'intervention dépend de leur âge et de la qualité de la prise en charge clinique [Giot et De Montalembert, 2006]. Les greffes de la moelle osseuse à partir de donneurs non apparentés ont été effectués sur un nombre limité de personnes ayant β -thalassémie. Pourvu que le choix du donneur est basée sur des critères rigoureux de compatibilité HLA et que les individus ont une surcharge en fer limitée [La Nasa *et al.*, 2005].

f. Thérapie génique

La possibilité de correction du défaut moléculaire dans des cellules souches hématopoïétiques par transfert d'un gène normale par l'intermédiaire d'un vecteur approprié est étudiée activement. Les résultats les plus prometteurs dans le modèle de souris ont été obtenus avec des vecteurs antiviraux [Personnes, 2009].

Un essai clinique de β -thalassémie a commencé en France, et une personne avec Hb E transfusion-dépendante / beta-thalassémie a démontré un effet thérapeutique après transplantation avec CD autologues 34 (+) des cellules, génétiquement modifié avec un vecteur lentivirus bêta-globine [Kaiser 2009]. Les niveaux de cellules génétiquement modifiées ont augmenté de 2% au cours des premiers mois à 11 à 33% mois post-transplantation [Cavazzana-Calvo *et al.*, 2010].

g. Conseil génétique et le diagnostic prénatal

La prévention de la bêta-thalassémie est basée sur le conseil génétique et diagnostic prénatal [Cao *et al.*, 1998]. La détection de porteuse a été décrite précédemment. Le conseil génétique donne des renseignements pour les particuliers et les couples à risque (c'est à dire les deux transporteurs). Le diagnostic prénatal pour les grossesses à risque accru est possible par l'analyse de l'ADN extrait de cellules fœtales obtenues par amniocentèse, habituellement effectuée à de gestation ou villosités choriales à 11 semaines de gestation. L'analyse des cellules fœtales dans le sang maternel et l'analyse de l'ADN fœtal dans le plasma maternel pour la présence de la mutation du père sont actuellement sous enquête. Le diagnostic préimplantatoire peut être disponible pour les familles dont les mutations pathogènes ont été identifiés [Mavrou *et al.*, 2007 ; Lo, 2005].

III.4.2. Béta-thalassémie mineure

Il n'existe aucun traitement de la β thalassémie hétérozygote en dehors de traitements banaux de stimulation générale. Toute médication martiale est évidemment contre indiquée car sans action sur le taux d'hémoglobine mais susceptible d'entraîner une surcharge en fer, ce traitement est cependant nécessaire quand une carence martiale est associée à la thalassémie. Bien entendu le patient doit être soigneusement prévenu des risques que court sa descendance s'il se marie avec un sujet également porteur hétérozygote, il faut éviter les mariages consanguins [Orsini, 1982]. Les transfusions systématiques sont absentes ou occasionnelles et le pronostic est généralement bon [Mbodji, 2013].

III.4.3. Béta-thalassémie intermédiaire

Le traitement transfusionnel systématiquement n'est pas de mise dans ces formes intermédiaires; certains patients peuvent se passer de traitement transfusionnel ou ne nécessite que des transfusions très intermittentes; pour certains, enfin, le traitement transfusionnel systématique est utilisé pendant des périodes de plusieurs mois, voire de plusieurs années, mais peut être abandonné dans l'intervalle [Orsini, 1982].

Les principaux facteurs qui déterminent la décision de transfuser sont généralement l'apparition des symptômes de l'anémie. Les transfusions entraînent

de même que pour la bêta-thalassémie majeure des complications liées à la surcharge en fer, notamment l'ulcère de jambe, les complications rénales, l'hématopoïèse extra-médullaire, l'ostéoporose, les thromboses, l'hypertension artérielle pulmonaire, l'hypogonadisme [Philippe *et al.*, 2014 ; Haddad *et al.*, 2014]. Des cas de compression médullaire ont aussi été décrits. Le risque d'allo-immunisation est plus important [Thuret ,2014]. Le taux global d'allo-immunisation chez les patients thalassémiques est de 5 à 30% dans le monde [Philip et Jain, 2014].

En dehors des transfusions, les thérapeutiques visant à améliorer l'érythropoïèse inefficace ont également la capacité d'améliorer la surcharge en fer qui en est la conséquence directe des beta-thalassémie intermédiaires [Thuret, 2014]. Ainsi, l'identification très récente de l'érythroferrone ouvre la voie de cibler cette hormone pour prévenir la surcharge en fer occasionnée par l'érythropoïèse [EL Sayed *et al.*, 2014].

Partie Expérimentale

Chapitre I

Materiel et Méthodes

I. 1. Diagnostic biologique !

I.1.1. Patients

Ce travail est une étude transversale descriptive incluant 19 enfants beta-thalassémiques homozygotes et hétérozygotes, pris en charge dans le service de pédiatrie du CHU de Batna, durant une période d'un an allant du 1^{er} janvier au 31 décembre 2014.

Afin d'étudier les paramètres biologiques, nous avons inclus, tous les enfants suivis pour la bêta thalassémie majeure âgés de 5 ans à 15 ans. Les prélèvements de sang ont été effectués juste avant la transfusion. En outre, les échantillons de sang des témoins ont également été prélevés à partir de 10 enfants sains. Les patients et les témoins sains étaient de même âge et de sexe. Tous les enfants ont bénéficié des tests hématologiques tels que l'hémogramme (numération des hématies, calculs des indices érythrocytaire VGM et TCMH, mesure du taux de l'hémoglobine) examen des hématies sur frottis et un test biochimique en l'occurrence d'électrophorèse d'hémoglobine sur Capillarys® de Sébia et le dosage de la ferritine.

Pour les formes hétérozygotes sont cliniquement asymptomatiques et qui sont détectés lors d'une enquête familiale, ils présentent un hémogramme normale avec une augmentation de taux de l'Hb A2 à 3,5 %, généralement entre 4 et 8 %. Alors que chez les sujets normaux, il est entre 2,2 et 3,2 %.

I.1.2. Méthodes

Les examens biologiques exploitées dans cette étude ont été réalisés au sein du laboratoire central d'hématologie et le laboratoire de biochimie CHU Batna. Les informations cliniques ont été recueillies à l'aide d'une fiche préétablie (voir annexe n°1) et remplie à partir des dossiers médicaux des malades. Nous avons étudié pour chaque patient :

- **Données épidémiologiques**

Age, âge de diagnostic et le sexe.

- **Résultats de l'enquête familiale**

Consanguinité parentale, degré, nombre d'enfants par famille, nombre d'enfants atteints.

- **Examen hématologique** : l'hémogramme complet, il comprend :

- La numération de ces éléments figurés (globules rouges, leucocytes, plaquettes, réticulocytes).
 - Calcule des constantes érythrocytaires : volume globulaire moyen (VGM), teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH),
 - La mesure des taux d'hémoglobine (Hb)
 - L'examen des frottis sanguins périphériques.
- **Examen biochimique** : Électrophorèse capillaire ou électrophorèse de l'Hb à pH alcalin sur Capillarys® de Sébia, évaluation de la surcharge en fer par le dosage de la ferritine. Les paramètres biologiques sont mesurés avant toutes transfusions.

I.1.2.1. Technique de FNS (Formule Numération Sanguin)

L'hémogramme ou Numération Formule Sanguine (NFS) est un examen indispensable qui donne des informations sur le dysfonctionnement de la moelle osseuse ou des perturbations des éléments figurés du sang. C'est le premier test donnant des renseignements utiles et qui permet de révéler une anomalie hémoglobinique.

Elle permet de mesurer le nombre absolu de cellules contenues par unité de volume de sang : numération des hématies, des globules blancs et des plaquettes, calcule de l'hématocrite, dosage de l'hémoglobine, étude des indices érythrocytaires (VGM et TCMH). La réalisation de l'hémogramme, qui a longtemps reposé sur une énumération en microscope optique après dilution manuelle, a été révolutionnée par le développement d'automates. Les automates permettent l'analyse d'un grand nombre de cellules et donnent ainsi des résultats reproductibles. Cependant, ils doivent être vérifiés tous les jours et calibrés pour s'assurer qu'ils ne s'écartent pas des seuils de normalité et les résultats doivent être vérifiés dans toutes les situations susceptibles de favoriser les artefacts.

- **Numération des éléments figurés du sang**

L'automate utilisé est Medonic M- Series M32 dont l'aiguille qui absorber 270 µl de sang veineux prélevé directement dans des tubes contenant 0,5 ml d'EDTA, dans une température ambiante varie de 20 à 22°C. L'automate permet à partir d'un petit échantillon de sang de compter simultanément les globules rouges, les globules blancs, les plaquettes, les réticulocytes, et de calculer le volume globulaire moyen, la

teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, et le taux d'hémoglobine totale et sont de plus en plus souvent associés à un analyseur qui fournit la formule sanguine.

- **Hématocrite (HT)**

Elle est définie comme le rapport du volume des globules rouges au volume total de sang après une centrifugation à haute vitesse. Dans l'automate l'hématocrite est calculé à partir du volume globulaire moyen que l'appareil mesure directement.

- **Volume globulaire moyen (VGM)**

Il se fait en divisant le volume globulaire compris dans 1 mm³ de sang (fourni par l'hématocrite) par le nombre de globules rouges contenus dans le même volume (fourni par la numération). La normale se situe entre 85 et 95 fl. En dessous de 85 fl, on parlera de microcytose, au-dessus de 95 fl de macrocytose, dans les limites normales de normocytoses.

- **Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)**

Elle s'obtient en divisant le résultat du dosage d'hémoglobine par le nombre d'hématies et indique le poids moyen d'hémoglobine par globule, soit à l'état normale 27 pg. Elle dépend du contenu en hémoglobine par unité de volume et du volume globulaire. En dessous de 27 pg on parlera d'hypochromie.

- **Taux d'hémoglobine (Hb)**

Le taux d'hémoglobine est calculé à partir de la dilution 1:40. Pour chaque échantillon, un vide est mesuré comme une référence, Le système photomètre consiste en une photodiode, une cuvette d'une longueur de 15 mm et un filtre à une longueur d'onde de 535 nm. L'automate utilise un agent de lyse (cyanure de potassium) qui permet de lyser les érythrocytes en produisant une solution d'hémoglobine uniformément répartie, Toutes les formes d'hémoglobine présentes dans le sang sont complètement converties en un seul composé le cyanmethemoglobine, Lorsque la réaction est terminée, l'absorbance de la solution est mesurée dans le spectrophotomètre à 535nm. À cette longueur d'onde, le cyanméthémoglobine a un large pic d'absorbance. Pour obtenir la quantité d'hémoglobine dans l'échantillon inconnu, son absorbance est comparée à celle de la solution standard de cyanmethemoglobine (dont la concentration d'hémoglobine est connue).

I.1.2.2. Ferritinémie

La ferritine est le premier paramètre biochimique étudié pour rechercher une surcharge en fer. Le fer sérique est le fer qui circule dans le sang de façon immédiate et qui est partagé avec les cellules en permanence et la ferritine est une protéine qui stocke les réserves en fer de l'organisme. C'est pour ça que la ferritine est un examen plus intéressant que le fer sérique. C'est inutile de doser un autre marqueur du métabolisme du fer.

C'est un test immunologique qui détermine quantitativement in vitro de la ferritine dans le sérum et le plasma humains. C'est le test par électrochimiluminescence « ECLIA » s'utilise sur l'analyseur Elecsys de cobas® 6000.

C'est la méthode « sandwich » qui est utilisée pour le dosage de la ferritine. La durée totale du cycle analytique est 18 minutes. La 1ère incubation consiste à une prise d'essai de 10 µl est mise en présence d'un anticorps monoclonal anti-ferritine spécifique marqué à la biotine (18 mL: Anticorps anti-ferritine monoclonal biotinylé (souris) 3,0 mg / L; Tampon phosphate 100 mmol / L, pH 7,2; conservateur), et d'un anticorps monoclonal anti-ferritine spécifique marqué au ruthénium (18 mL: Anticorps monoclonal anti-ferritine (souris) marqué au ruthénium complexe de 6,0 mg / L; Tampon phosphate 100 mmol / L, pH 7,2; conservateur).

Il se forme un « sandwich ». La 2ème incubation s'effectue après addition de microparticules tapissées de streptavidine (12 mL: Microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg / mL; conservateur), qui sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunitaire est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.

Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont soutenues au niveau de l'électrode par un aimant. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode provoque la production de fluorescence qui est mesurée par un photomultiplicateur. Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est engendrée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif (**Fig.11**).

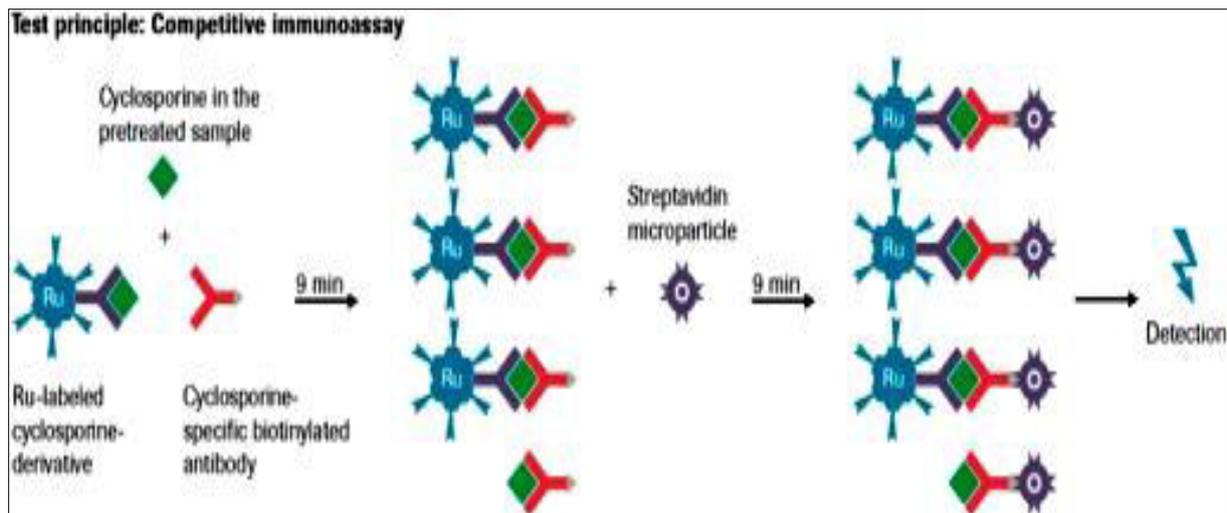


Figure 11. Représentation schématique du principe de test ECLIA. Les échantillons prétraités sont combinés avec des anticorps biotinylés spécifiques, marqués et récupérés avec des microparticules de streptavidine [Bieglmayer *et al.*, 2004].

Si les réactifs sont prêts à l'emploi et ne peuvent être utilisés séparément. Toutes les renseignements indispensables au déroulement du test sont enregistrés sur le code-barres des flacons de réactifs et doivent être saisis.

L'analyseur calcule automatiquement la concentration de la ferritine de chaque échantillon (soit en $\mu\text{g} / \text{L}$ ou ng / mL).

I.1.2.3. Examen des frottis sanguins périphériques

L'examen microscopique de frottis sanguin permet la confirmation du comptage plaquettaire, la différenciation leucocytaire ainsi que l'examen morphologique des hématies et des leucocytes. Le matériel nécessaire pour réaliser cet examen est : un automate de coloration Hema-Tek® 2000, un microscope, des lames de microscope.

Pour préparer un frottis sanguin, on retire le bouchon d'un tube de sang entier anticoagulé bien mélangé. EDTA est l'anticoagulant de choix. On place une goutte de sang bien mélangé près d'une extrémité d'une lame de haute qualité. On tient une deuxième glissière d'écartement à un angle de 45 degrés et on approche la goutte de sang ce qui permet au sang de se propager pratiquement à la largeur du bord de la lame. Puis rapidement et facilement on pousse la glissière d'écartement à l'extrémité opposée de la lame, en tirant le sang derrière elle. Le film de sang doit être d'au

moins 1,57 cm à partir de l'extrémité opposée de la glissière pour éviter de prolonger au-delà de la surface du cylindre d'impression et en contact avec les réactifs de coloration. On laisse le frottis sécher complètement avant la coloration.

La coloration automatique des frottis de sang périphérique est réalisée par Hema-Tek® 2000 stainer, il s'agit d'un équipement utilisé dans le laboratoire d'hématologie est conçu spécifiquement de coloration automatisée pour qui ont été préparés sur la norme de 25 mm x 75 mm lames de verre. Les frottis sanguins qui sont colorées selon les instructions fournissant à l'examineur la caractéristique de coloration différentielle de haute qualité pour tous les composants sanguins cytologiques.

On retire le couvercle du panneau avant. On allume le stainer. On vérifie le niveau des réactifs. Si elle est faible, changer en conséquence. On assure que la bulle du niveau centré dans le cercle inscrit. On met les réactifs jusqu'à ce que tout l'excès de colorant soit apparu sur le panneau de coloration. On nettoyé la platine aussi bien. On charge deux diapositives vides pour voir si le stainer fonctionne convenablement. Un film de sang périphérique d'un patient est utilisé comme lame de contrôle de la qualité.

Une fois que la coloration et le rinçage ont été accomplis, le coulisseau est séché par un flux d'air à partir d'un ventilateur à faible vitesse. La lame est livrée dans le tiroir coulissant, prêt pour l'examen. Après coloration de la diapositive, on prend les précautions suivantes. On examine les lames colorées le plus tôt possible. On protège les lames colorées des rayons du soleil et on les stocke dans un endroit frais 25 C° et sec.

Le kit Wright Giemsa Stain Kit est destiné à un usage en laboratoire pour différencier, par microscopie optique, les cellules hématopoïétiques dans des échantillons de tissu, de moelle osseuse. Des échantillons traités en routine (inclus en paraffine) de 2 à 3 microns peuvent être utilisés. Wright-Giemsa Stain Solution est un mélange de plusieurs thiazine des colorants dans un solvant de type méthanol. Les forces ioniques et non ioniques sont impliquées dans la liaison de ces colorants. La solution de coloration a des propriétés anioniques et cationiques. Les groupes d'acide phosphorique chargés négativement de l'ADN attirent les colorants cationiques polychromatiques violets pour les noyaux. Les granulés de basophiles

bleus sont colorés par les colorants cationiques polychromes. Les composants cellulaires cationiques, tels que les globules rouges et des granules éosinophiles, sont colorés par des colorants anioniques, rouge et rose. Les tampons utilisés dans la procédure de coloration libèrent et activent les ions de colorant qui leur permettent de se lier chimiquement avec les composants cellulaires spécifiques.

I.1.2.4.Électrophorèse capillaire de zone ou électrophorèse de l'Hb à pH alcalin sur Capillarys® de Sébia

Il s'agit d'électrophorèse dont le milieu de migration est basique (pH= 9,4), cette technique a été appliquée à l'analyse de l'hémoglobine pour doser des formes anormales et pour séparer des fractions de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire dans le système automatique CAPILLARYS.

Cet électrophorèse est une méthode de séparation selon la charge et la masse effectuée dans un tube de dont le diamètre de 100 µm chargé d'un tampon d'électrolytes.

La séparation est effectuée en plaçant une différence de potentiel des milliers de volts aux limites de tous les capillaires. La révélation directe des hémoglobines est réalisée à 415 nm du côté cathode. Les capillaires sont lavés avant chaque examen. Avec le tampon utilisé à pH basique, l'ordre de déplacement des primordiales hémoglobines normales et anormales est le suivant, de la cathode vers l'anode : δA2 (variant d'A2), C, A2/O-Arab, E, S, D, G-Philadelphia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore et H.

- **Prélèvement et préparation des échantillons**

5 ml du sang sont recueillis dans un tube contenant un anticoagulant (EDTA). Les échantillons peuvent être gardés au maximum 7 jours au réfrigérateur (entre 2 et 8 C°).

Pour la préparation des échantillons, on laisse sédimenter les globules rouges du sang totale pendant plusieurs heures à 2- 8 C° ou le centrifuger pendant 5 minutes à 5000tr/min. on élimine avec précaution le maximum du plasma, puis on agite au vortex pendant 5 secondes.

Ensuite on effectue une dilution automatique, dans un microtube, on mélange un volume (80 μ /L) de globules rouges de l'échantillon à analyser et un volume de contrôle Hb A2 normal (80 μ /L), on coupe le bouchon du microtube et on place ce dernier sur un tube à hémolyse neuf qui servira de support, sur un portoir de CAPILLARYS et on effectue l'analyse de l'échantillon.

- **Technique analytique**

Le système CAPILLARYS est un instrument multiparamétrique automatique qui assure l'analyse des hémoglobines sur 7 capillaires en parallèles selon les étapes suivantes :

- Lecture des codes –barres des tubes primaires (jusqu'à 7) et du portoir ;
- Hémolyse et dilution des échantillons à partir des tubes primaires (sans plasma) ;
- Lavage des capillaires ;
- Injection des échantillons hémolysés ;
- Séparation et détection directe des hémoglobines dans les capillaires.

Les étapes manuelles sont les suivantes : On met en place des tubes primaires (débouchés) dans les portoirs en position 1 à 7 ; du tube de solution hémolysante en position 8 dans les portoirs ; d'une barrette neuve sur le portoir ; puis on les introduit dans le système CAPILLARYS et on récupère des portoirs après analyse.

- **Traitement des données**

Le traitement des données est effectué par le logiciel Phoresis®. A la fin de l'analyse, le dosage relatif des fractions est effectué et les profils peuvent être interprétés. Les pics d'hémoglobine A (HbA), F (Hb F) et A2 (Hb A2) sont identifiés de manière automatique et le pic d'Hb A est ajusté au centre de la fenêtre de reprise.

La détection directe sur les capillaires permet de définir les concentrations relatives (pourcentage) de chaque fraction. Les différentes zones de migration de variant (identifiées de Z1 à Z15) sont repérées à l'écran et sur le compte rendu résultats. Le passage de la souris sur le nom d'une zone entraîne l'affichage d'une info bulle indiquant les variants possibles de l'hémoglobine migrants dans cette zone. Pour chaque fraction, la position du maximum définit la zone de migration.

I.1.2.5. Analyses statistiques

Nous avons calculé des fréquences simples et des fréquences relatives (pourcentages) pour les variables qualitatives au moyen du logiciel Excel et la méthode statistique utilisée est le test « t » de student pour comparer les moyennes des échantillons. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 7,00. Dans tous les tests statistiques, le seuil de signification a été fixé à 0,05.

I. 2. Diagnostic moléculaire (recherche de mutations)

Les analyses moléculaires du gène *HBB* ont été effectuées au sein du laboratoire de cytogénétique, de génétique moléculaire et de biologie de la reproduction au CHU Farhat-Hached de Sousse, Tunisie. On s'ajoute dans cette étude la fratrie. Les échantillons du sang sont prélevés avant toute transfusion.

I.2.1. Extraction de l'ADN à partir de lymphocytes sanguins

L'extraction d'ADN est réalisée sur un prélèvement de 5 ml du sang veineux recueilli dans un tube conique de 15 ml sur EDTA.

L'extraction a été réalisée par le kit « FlexiGene DNA » de Qiagen. Son principe est basé sur la lyse des hématies et la digestion des globules blancs par une solution hypotonique. Après avoir éliminé les protéines par une solution saline, l'ADN sera précipité par l'éthanol.

Dans un tube de 15 ml, on met 7.5 ml de FG1 (solution de lyse des globules rouges) et 3 ml du sang recueilli et on centrifuge à +4°C pendant 10 minutes à une vitesse de 2500 tours/min, puis on aspire le surnageant sans toucher à la couche du culot. On ajoute une mixture faite de FG2 et de Protéase-FG3 pour dégrader les protéines histones auxquelles est attaché la molécule d'ADN, puis on mélange par un vortex immédiatement jusqu'à homogénéisation totale.

NB :3-4 pulsations de vortex à grande vitesse pendant 5 secondes suffisent habituellement pour homogénéiser le culot. Cependant, des traces de culot d'aspect gélatineux peuvent persister. Si c'est le cas, on ajoute encore 300 μ l de FG2 et on vortex. On agite le tube manuellement en le faisant basculer 3 fois puis on l'incube à 65°C pendant 10 minutes (pour activer la protéase).

La couleur initialement rougeâtre, vire au vert olive signe de digestion protéique.

A cet ensemble, on additionne 1.5 ml d'isopropanol (100%) et on agite délicatement d'un jeu de main jusqu'à la formation d'une méduse d'ADN (une bonne agitation manuelle est importante pour la précipitation de l'ADN et doit être surveillée par inspection). Pour les échantillons à faible teneur en globules blancs, on agite au moins 20 fois). Puis on centrifuge pendant 10 min à une vitesse de 2500 tours/min (s'il n'y a pas formation de culot au fond du tube, on prolonge la centrifugation ou on augmente sa vitesse). Ensuite, on déverse délicatement le surnageant, et on laisse égoutter les tubes sur le papier absorbant, en veillant à ce que le culot reste au fond du tube (si le taux de globules blancs est suffisant, un petit culot blanc doit être visible).

On ajoute 1.5 ml d'éthanol à 70% puis on centrifuge pendant 3 min, on élimine le surnageant et on laisse sécher l'ADN pendant une nuit. On fait dissoudre l'ADN dans 300 µl de FG3 (solution de conservation) à 65°C pendant une heure.

Si l'ADN n'est pas complètement dissout, on laisse l'échantillon sur la pailleuse à température ambiante pendant une nuit. Si un faible volume de FG3 a été utilisé, on prolonge le temps d'incubation. On conserve le mélange obtenu à +4°C pour une utilisation immédiate ou à -20°C pour une utilisation à long terme.

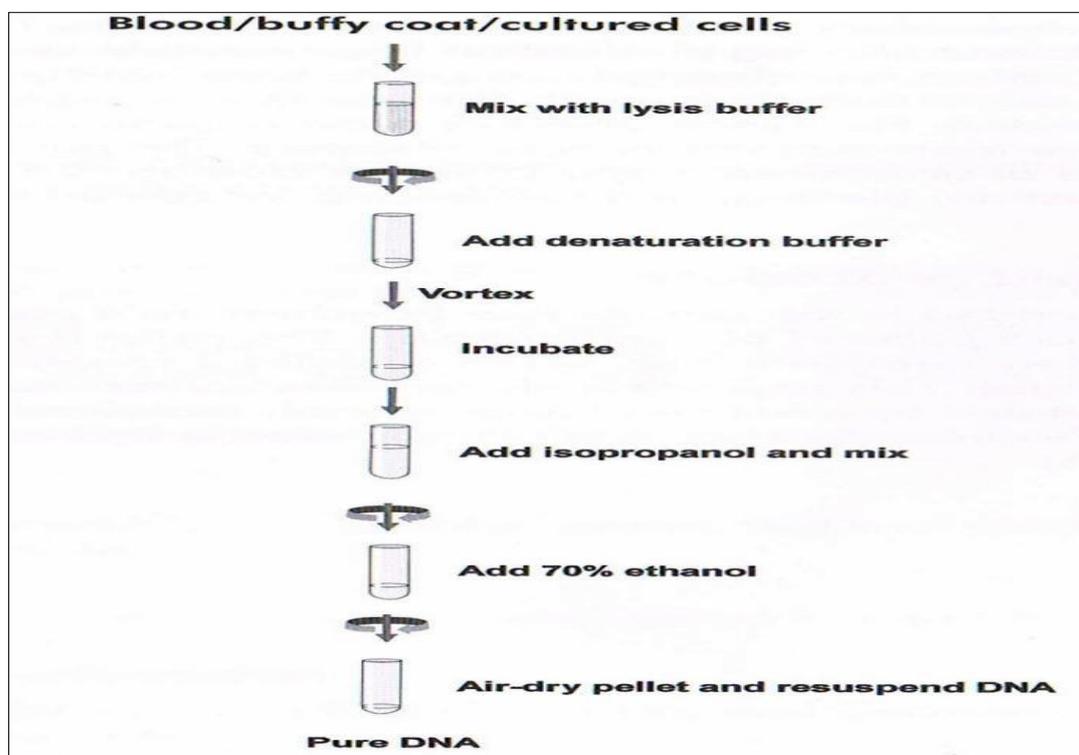
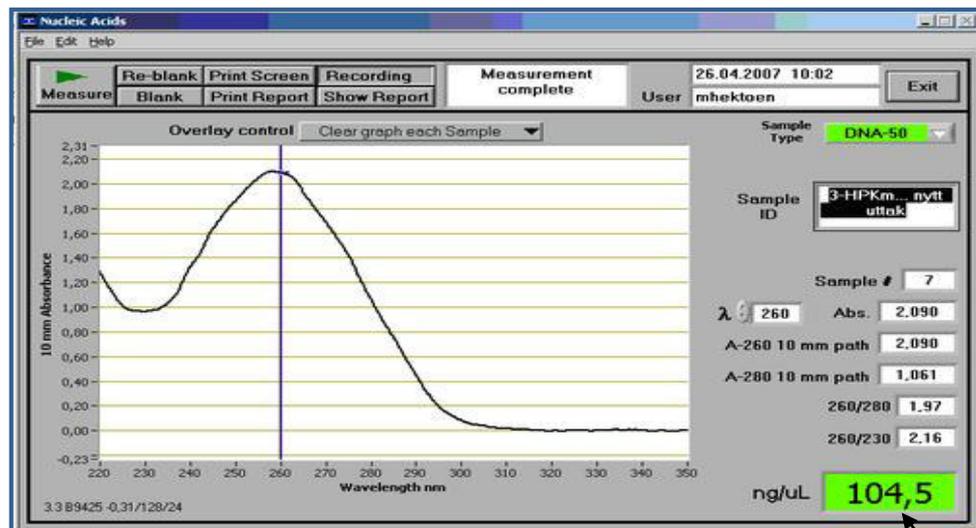


Figure 12. Procédure de purification d'ADN utilisant FlexiGene DNA

I.2.2. Détermination de la concentration de l'ADN

Il est indispensable de connaître la qualité et la concentration de l'ADN obtenu par cette méthode d'extraction afin de pouvoir réaliser les dilutions nécessaires et valider les résultats obtenus. Un dosage par spectrophotomètre s'avère donc être une étape nécessaire. Nous avons utilisé un spectrophotomètre Nanodrop (ND1000). Il présente l'avantage de ne nécessiter que 1 µl de la solution mère d'ADN.

Le ND-1000 trace une courbe d'absorbance (λ) (Fig. 13), calcule la concentration de l'échantillon et fournit des rapports qui nous renseignent sur la pureté de l'ADN. 260 nm étant égale à l'absorbance des acides nucléiques ADN et ARN ; 280 nm l'absorbance des protéines, 230 nm l'absorbance d'autres agents contaminants tels que les alcools, phénol...



Concentration

Figure 13. Exemple de courbe de dosage obtenue par le Nano Drop

On procède à la lecture de l'absorbance à 260 nm. La concentration d'ADN est estimée en mesurant le rapport d'absorbance 260/280. Sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 50 ng/µl d'ADN double brin, la concentration est donnée par cette formule : $C = 50 \times DO \text{ à } 260 \text{ nm} \times \text{Facteur de dilution}$.

Le rapport des densités optiques (R) 260/280 nm permettra d'estimer la pureté de l'ADN.

- Si $1.8 < R < 2$: l'ADN est considéré assez pur.

- Si $R < 1.8$: la solution d'ADN est contaminée par des protéines.
- Si $R > 2$: la solution d'ADN est contaminée par des ARN.

La qualité et la quantité de l'ADN ont été estimées aussi par migration de 1 μ l de l'ADN sur un gel d'agarose (2%).

Et pour améliorer la qualité d'ADN de certains échantillons, on procède une précipitation à l'éthanol selon le protocole suivant :

On mesure le volume de l'échantillon d'ADN, on ajuste la concentration du sel par addition de 1/10 du volume d'acétate d'ammonium, ensuite, on ajoute 2 à 2,5 fois du volume d'éthanol 100% et on mélange, puis, on place les tubes dans la glace ou à -20°C pendant 20 minutes, on centrifuge pendant 10 à 15 minutes avec une vitesse maximale et on décante prudemment le surnageant, par la suite, on ajoute 1 ml d'éthanol 70% et on mélange, puis, on centrifuge rapidement pendant 5 minutes, on décante prudemment le surnageant, on laisse sécher à l'air ambiante pendant une nuit, et enfin, on redescend dans le volume approprié de tampon (FG3) (1/2 volume initial de l'échantillon d'ADN).

I.2.3. Détermination de la qualité de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Le choix de gel dépend des longueurs de fragment à migrer. Dans notre cas, on a préparé un gel à 2%. Les étapes de préparation sont les suivants :

On pèse 3g d'agarose ; en suite on rajoute 150 ml TBE 1 \times ; puis on chauffe dans la micro-onde pendant 1 à 3 minutes jusqu'à dissoudre l'agarose ; en suite on met sous agitation et laisser refroidir ; et l'ajout de 10 μ l de BET. L'agarose est coulé dans le moule avec les peignes et laisser refroidir ; puis on enlève les peignes et le gel est introduit dans une cuve remplie de tampon de migration (TBE 1 \times) et on dépose dans le premier puit le marqueur de taille : 100 pb DNA; de plus on mélange dans un tube eppendorf 5 μ l de produit de PCR avec 5 μ l de bleu de chargement puis on les dépose dans les puits ; finalement on fait migrer en appliquant une tension ou un courant adapté (migration à 150 V pendant 1h).

I.2.4. Miniséquençage à l'aide du kit SNaPshotTM

Nous avons choisi la méthode de miniséquençage à l'aide du kit SNaPshotTM (Applied Biosystem) puisqu'elle permet la recherche rapide des 4 mutations les plus communes et fréquentes du gène *HBB*.

De plus, la fiabilité, la sensibilité, la robustesse, et la capacité élevée de multiplexage de cette méthode ont été décrites dans de nombreuses études.

Le principe de cette technique repose sur une séparation des allèles correspondant à une réaction d'extension d'amorce d'une seule base. Cette réaction est appelée SBE pour (Single Base Extension) ou réaction de miniséquençage et les étapes ont été effectuées sont comme suit :

I.2.4.1. Amplification du gène *HBB*: PCR 1

Avant de faire la réaction de miniséquençage, une étape d'amplification spécifique du gène *HBB* est nécessaire. L'amplification a été réalisée à l'aide du couple d'amorces suivant :

***HBB* F: 5'- CTG ACA CAA CTG TGT TCA CT-3' Primer A (Forward)**

***HBB* R: 5'- TTC ACC TTA GGG TTG CCC -3' Primer B (Reverse)**

Les conditions optimales de la réaction de PCR ont été obtenues avec :

- 100 µg/ml d'ADN génomique
- 5 µM amorce sens
- 5 µM amorce antisens
- Taq DNA polymérase

L'amplification a été réalisée dans le thermocycleur ABI 2700 (de chez la firme Applied Biosystems), selon le programme adapté pour la DNA polymérase suivant :

94 °C 5 minutes

30 cycles 

- 94 °C 30 secondes
- 60 °C 30 secondes
- 72 °C 30 secondes

72 °C 15 minutes

4°C Pause

I.2.4.2. Réaction de miniséquençage : SNaPshot®

La réaction d'extension d'amorces est réalisée dans un volume final de 8 µl comprenant :

- 2,5 µl du tampon de réaction (SNaPshot® Multiplex read reaction mix, Applied Biosystems)
- 2,6 µl du Primers mix (incluant les 4 amorces de SNaPshot® à une concentration de 5 pmol/µl pour chacune)
- 2 µl du produit de PCR purifié

Les conditions d'extension utilisées ont comporté 25 cycles constitués d'une étape de dénaturation à 96°C pendant 10 secondes suivie d'une étape d'hybridation à 50°C pendant 5 secondes et une étape d'extension à 60°C pendant 30 secondes.

Tableau 3. Amorces utilisées lors de la réaction de miniséquençage

Mutation étudiée	Nomenclature	Les amorces de miniséquençage	Normale	mutant
Hb S [b6(A3)Glu-Val]	<i>HBB</i> : c.20A>T	TATG GTG CAC CTG ACT CCT G	Vert, A	Rouge, T
Codon 6 (-A)	<i>HBB</i> : c.20delA	T ATG GTG CAC CTG ACT CCT G	Vert, A	Bleu, -
IVS-I-2 (T>G)	<i>HBB</i> : c.92+2T>G	T GTG AGG CCC TGG GCA GG	Rouge, T	Bleu, G
IVS-I-110 (G>A)	<i>HBB</i> : c.92-21G>A	T ACT GAC TCT CTC TGC CTA TT	Bleu, G	Vert, A
Codon 39 (C>T)	<i>HBB</i> : c.118C>T	T GTG GTC TAC CCT TGG ACC	Noire, C	Rouge, T

*Les variantes sont décrites en utilisant " Human Genome Variation Society nomenclature"

I.2.4.3. Purification du produit de SNaPshot®

Le produit de SNaPshot® est ensuite incubé à 37°C pendant 15 minutes après l'ajout d'une unité de SAP (Shrimp Alcaline Phosphatase, Applied Biosystems), puis l'enzyme est inactivée 15 minutes à 72°C. Ce traitement est important afin d'éviter la migration simultanée des ddNTPs non incorporés. La SAP permet de déphosphoryler les ddNTPs résiduels.

I.2.4.4. Migration sur séquenceur automatique

La migration est réalisée dans un volume final de 20 µl comprenant :

- 2 µl de produit d'extension purifié
- 17 µl de formamide Hi-Di™ (Applied Biosystems)
- 1 µl de standard de taille interne 120-LIZ™ GeneScan (Applied Biosystems)

Le mélange est dénaturé par chauffage à 95°C pendant 3 minutes puis rapidement refroidit sur un bloc de glace. Les produits d'extension sont ensuite

séparés selon leur taille et la fluorescence est détectée par électrophorèse capillaire sur un séquenceur ABI PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) en utilisant le polymère POP-4™ (Applied Biosystems).

I.2.4.5. Analyse des résultats

Les données brutes générées par le séquenceur automatique sont analysées à l'aide du logiciel GeneScan Analysis v.3.7 (Applied Biosystems).

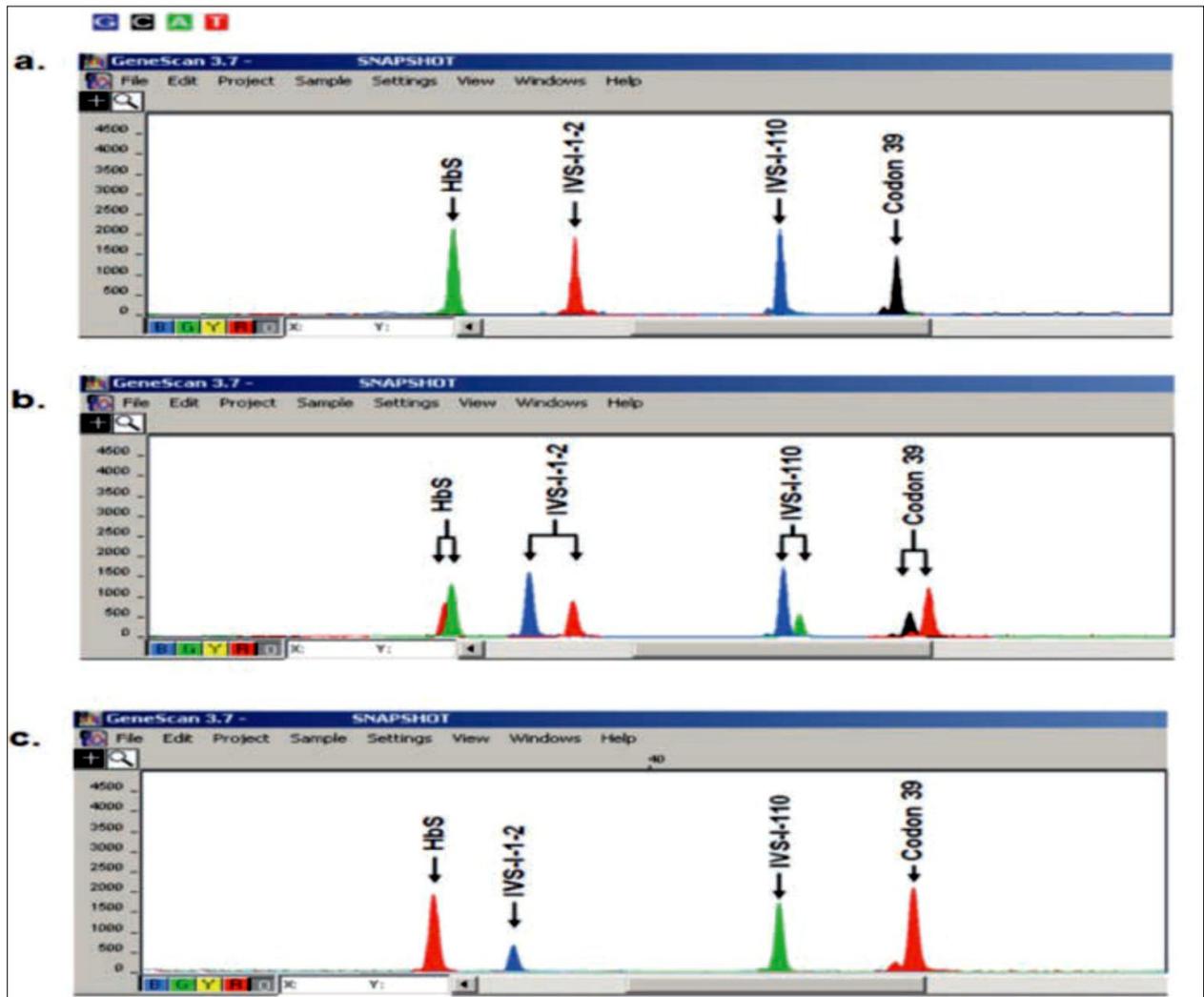


Figure 14. Analyse GeneScan de la réaction de miniséquençage multiplex. Électrophérogramme: (a) montre les résultats d'analyse d'un échantillon de type normale; (B) illustre le schéma des pics pour toutes les positions mutantes à l'état hétérozygote; (C) illustre le schéma des pics pour toutes les positions mutantes à l'état homozygote.

I.2.5. Séquençage par la méthode de Sanger

Notre objectif est de détecter s'il y a des mutations, pour cela les couples d'amorces doivent amplifier les différentes régions où ils présentent les mutations.

I.2.5.1. Réaction de séquençage

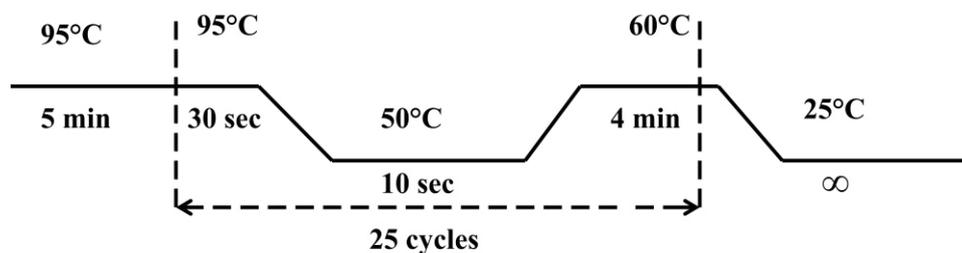
L'amplification du gène *HBB* a été déjà réalisée dans l'étape de miniséquençage.

Les produits de PCR1 sont par la suite séquencés. C'est une amplification asymétrique de l'amplicon déjà purifié avec une amorce et des 4 ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) dont chacun est marqué par un seul fluorochrome émettant une couleur différente lors de l'excitation par le LASER. Ainsi chacun de ces ddNTP va donner de façon aléatoire des fragments de tailles différentes et correspond aux 4 couleurs spécifiques.

La réaction de séquençage est effectuée par le kit BiG Dye Terminator (Applied Biosystems) :

- 8 μ l de produit de PCR purifié
- 4 μ l de Buffer (tampon)
- 3 μ l d'amorce sens ou anti-sens
- 2 μ l BiG Dye (contenant les dNTP, ddNTP fluorescentes, taq polymérase et tampon)
- 3 μ l d'eau désionisé autoclavé pour compléter le volume réactionnel à 20 μ l

Puis l'amplification est faite dans le thermocycleur ABI 2700 de chez Applied Biosystems, selon le programme suivant :



I.2.5.2. Purification par le KIT « WIZARD® MAGNESIL™ » de PROMEGA

Le produit de la réaction de séquençage est purifié à l'aide des billes magnétiques chargées positivement. L'ADN est chargé négativement donc il sera attaché aux billes. L'élution de nos fragments est faite par le formamide désionisé permettant aussi de garder nos fragments à l'état simple brin.

On transfère les 20 µl du produit de séquençage dans un tube de 1.5 ml et on ajoute 180 µl de solution de Magne-Sil®GREEN en mélangeant par pipetage pendant 5 min, puis on les met dans un portoir aimanté jusqu'à l'apparition d'un culot marron.

On élimine le surnageant et on fait un lavage avec l'éthanol 90% (200µl) en pipetant à une température ambiante pendant 5 min, puis on les remet dans le portoir aimanté et on élimine délicatement le surnageant (On répète l'opération de lavage deux ou trois fois). On met les tubes à 50°C pendant 20 ou 40 min pour se débarrasser de l'éthanol. On Additionne 12 µl le formamide désionisé qui permet de cliver la liaison entre les billes magnétiques et l'ADN, et on laisse à une température ambiante pendant 5 min puis on les met dans le portoir aimanté. On récupère délicatement le surnageant dans un nouveau tube.

I.2.5.3. Visualisation et analyse du produit d'amplification par migration électrophorétique

La séparation des produits d'amplification, obtenus par la PCR de séquence a été réalisée par migration électrophorétique sur l'analyseur génétique monocapillaire « ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer » qui est entièrement automatisé et permet d'analyser à la fois une série de 96 échantillons. Pour le séquençage, la migration est faite dans un capillaire contenant un gel de polyacrylamide : le POP6 (polydiméthyl acrylamide).

Le gel de polyacrylamide est un gel dénaturant de haute résolution qui, sous l'influence d'un champ électrique, va séparer les fragments d'ADN selon leurs tailles.

Pour le séquençage le produit de PCR de séquence est déjà mélangé avec le Formamide.

Le mélange du produit de PCR est dénaturé pendant 3 minutes à 95°C puis immédiatement placé dans la glace de façon à garder l'ADN sous sa forme

monobrin. La migration du mélange de tous le produit de PCR est par la suite faite par l'électrophorèse capillaire sur l'analyseur génétique ABI PRISM 310.

Le séquençage automatique est une adaptation de la technique de « Fred Sanger » où les 4 didésoxynucléotides sont chacun marqués spécifiquement par un fluorophore (méthode dite des dyes Terminator).

Au cours de leur migration, les fragments de différentes tailles marqués par les ddNTP vont traverser une fenêtre de lecture où ils seront excités par un LASER (**Fig 15**). Ces molécules fluorescentes vont alors émettre quatre longueurs d'ondes différentes qui seront captées par une caméra CCD grâce à un système optique de prismes.

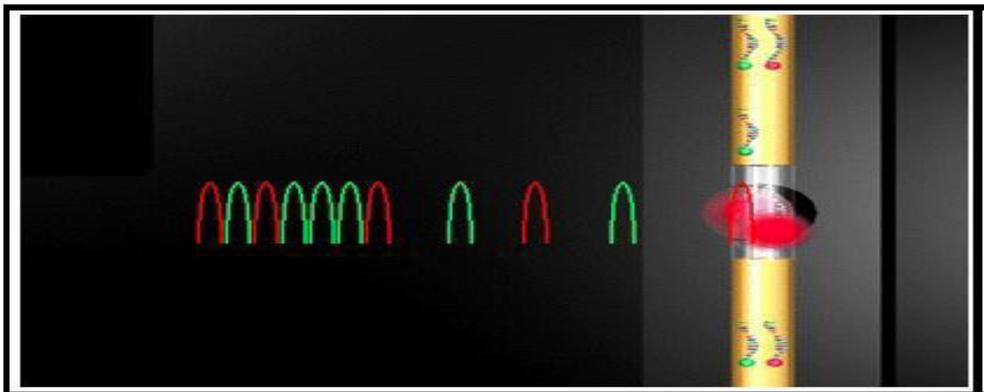


Figure 15. Séparation des fragments dans le capillaire et passage au niveau de la fenêtre de lecture où ils sont excités par le LASER.

Pour le séquençage, les résultats obtenus sont traités par le logiciel SeqScape v2.0 (Applied Biosystems). Donnant le profil ci-dessous ;

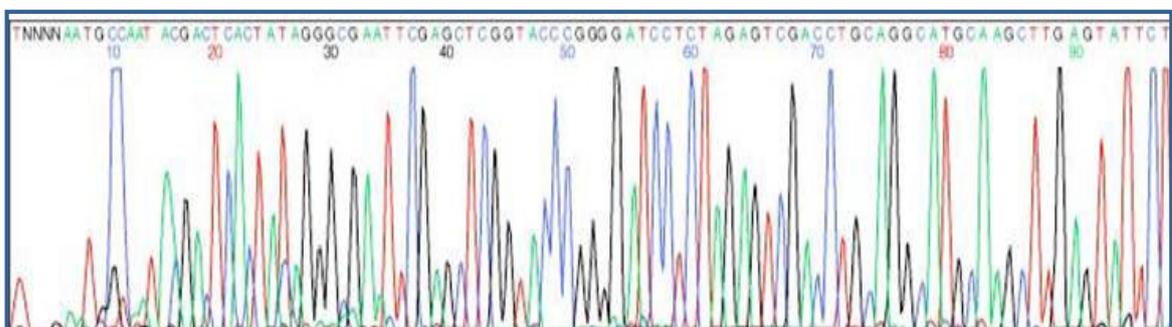


Figure 16. Profil de séquence d'ADN

Chapitre II

Résultats et Discussion

II.1. Caractères généraux de nos patients

II.1.1. Répartition par âge, âge de diagnostic, sexe et complication à l'âge de diagnostic.

Tableau 4. Représentation des enfants beta-thalassémiques selon l'âge, l'âge de diagnostic, sexe et complications.

Patients	L'âge (ans)	L'âge de diagnostic (mois)	Sexe	Complications
P1	9	24	M	Ictère, fatigue, abdomen très volumineux
P2	10	10	M	Ictère, sensibilité aux infections,
P3	5	12	M	Ictère, déformation de l'os facial
P4	15	22	M	Ictère, un retard de croissance, abdomen très volumineux
P5	6	14	M	Ictère, déformation de l'os facial
P6	7	16	F	Ictère, pâleur, abdomen volumineux
P7	6	12	M	Ictère, une déformation osseuse avec aspect mongoloïde de visage
P8	10	15	F	Ictère, pâleur, fatigue
P9	13	18	M	Subictère, un retard de croissance, abdomen volumineux
P10	8	9	M	Ictère retard de croissance important

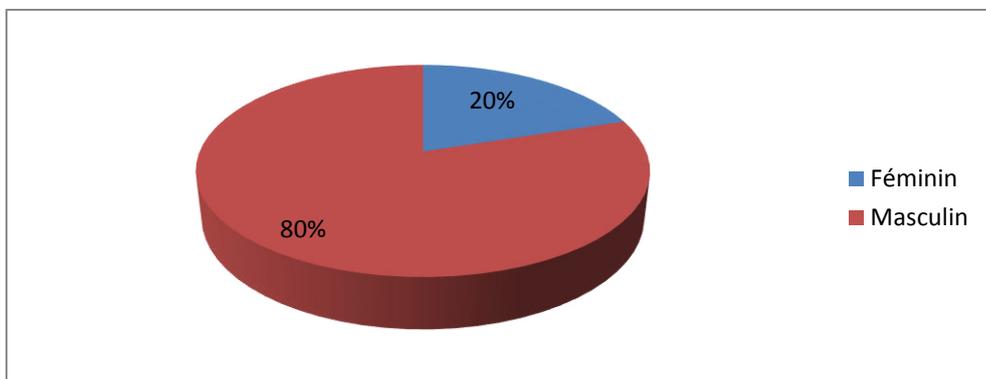


Figure 17. Répartition des enfants beta-thalassémiques selon le sexe.

D'après les résultats du (Tab.4), l'âge de nos patients varie entre 5 ans et 15 ans, avec un âge moyen 8.9 ans suivis par leur âge de diagnostic qui varie de 9 mois à 24 mois.

Dans l'étude de **Howard et al., 1996** parmi les 271 patients β -thalassémie homozygote de 48 centres d'Amérique de nord, 77% des 172 patients de groupes ethniques avec beta-thalassémie majeure étaient âgés de moins de 15 ans.

Sirachainan et al., 2016 détectent que 17 patients diagnostiqués avec la maladie β -thalassémie ont le moyenne d'âge 15.0 ± 3.8 et **Asadi-Pooya et Doroudchi [2004]** ont dépisté que l'âge moyen de 648 patients atteints de beta-thalassémie majeure des patients était $11,8 \pm 5$ années.

D'après la Haute Autorité de Santé (HAS), [2008] ainsi que **Renzo Galanello et Raffaella Origa, [2010]** le diagnostic clinique de cette maladie est généralement porté entre 6 et 24 mois ce qui en accord avec nos résultats. Les enfants dépistés en période néonatale sur l'absence d'HbA sont suivis tous les mois à partir de l'âge de 3 mois afin d'observer l'apparition de l'anémie et d'évaluer sa sévérité.

D'après les résultats du tableau 4, L'enfant beta-thalassémique majeure présente une pâleur est généralement le premier signe de la maladie et peut être reconnue à 3-6 mois d'âge [**Lukens, 1999**].

Bien que la gravité de la forme homozygote, aucune manifestation à la naissance, la pâleur devient progressivement extrême, alors que l'abdomen très volumineux du nourrisson révèle un très important élargissement de la rate et du foie en rapport avec une érythropoïèse locale intense [**Perrimond, 2000**].

Les patients atteints de cette maladie ont un sinus maxillaire agrandi et ont tendance à avoir une supraclusion maxillaire. Le visage prit progressivement une apparence "mongoloïde" [**Rund et Rachmilewitz, 2005**]. Les anomalies squelettiques résultent essentiellement de l'hypertrophie et de l'expansion de la moelle érythroïde [**Lawson et al., 1981**]. Cela se traduit par un agrandissement de l'espace de la moelle et affinement du cortex à l'ostéoporose consécutive [**Caffey, 1957**].

L'anémie qui désigne un manque d'hémoglobine et des hématies, entraîne un transport insuffisant de l'oxygène par le sang, qui s'explique par une fatigue excessive et une sensation de faiblesse [Thuret, 2008] et un ictère qui est le plus fréquent et qui est dû à l'augmentation de la bilirubine non conjuguée du fait de l'hémolyse chronique [Murray et Roberts, 2012 ; Barro, 2005].

Les infections étaient la deuxième cause de décès après une insuffisance cardiaque dans la thalassémie. Des résultats similaires ont été signalés en Grèce et Taiwan alors que chez les patients bêta-thalassémiques en Thaïlande, les infections sont la principale cause de pathologie et de mortalité [Ricerca *et al.*, 2009].

Les enfants atteints de bêta-thalassémie sévère sont très sensibles aux infections. Les infections auxquelles ces enfants sont essentiellement sensibles comme celles des poumons, les infections de l'enveloppe du cerveau, les infections graves généralisées et la grippe [Thuret, 2008].

Si la β -thalassémie majeure est mal diagnostiquée et non traitée, elle peut provoquer une pénurie de globules rouges (anémie), des dommages d'organe, ou même la mort, c'est pour ça, il est très important de l'identifier et traiter tôt, les enfants peuvent souvent mener des vies plus saines [Origa, 2000].

Les résultats obtenus indiquent que les patients beta- thalassémiques du sexe masculin sont plus nombreux (80%) que ceux du sexe féminin (20%) (Fig.15).

La prédominance masculine ne peut pas être expliquée par un signe d'une relation entre le sexe et la maladie, puisque d'une part la transmissions de cette maladie est autosomique récessive, c'est à dire qu'elle touche les deux sexes également [Ferrier, 1980].

Cette différence sex-ratio chez les patients thalassémiques (les hommes plus touchés que les femmes) est remarquable et mérite une enquête plus approfondie compte tenu de la thalassémie comme une maladie monogénique transmise par un mode récessif.

II.1.2. Répartition des patients selon la présence de consanguinité, degré de consanguinité et la forme de béta-thalassémie.

Tableau 5. Résultats de l'enquête familiale.

Patient	Consanguinité	Degré	Nombre d'enfants par famille	Nombre d'enfants atteints (homozygotes ou hétérozygotes)
P1	non	(-)	3	1
P2	oui	1 ^{er} degré	1	1
P3	oui	1 ^{er} degré	5	4
P4	oui	2 ^{ème} degré	2	2
P5	oui	2 ^{ème} degré	2	1
P6	oui	1 ^{er} degré	4	2
P7	non	(-)	3	2
P8	non	(-)	2	1
P9	oui	1 ^{er} degré	4	3
P10	oui	2 ^{ème} degré	3	2

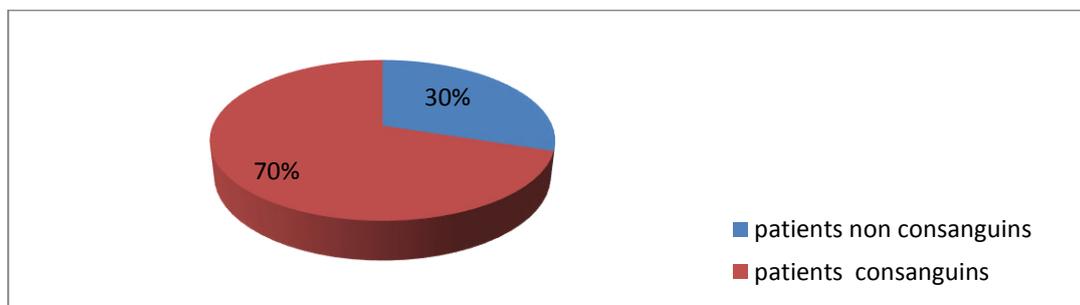


Figure 18. Le taux de la consanguinité chez nos patients

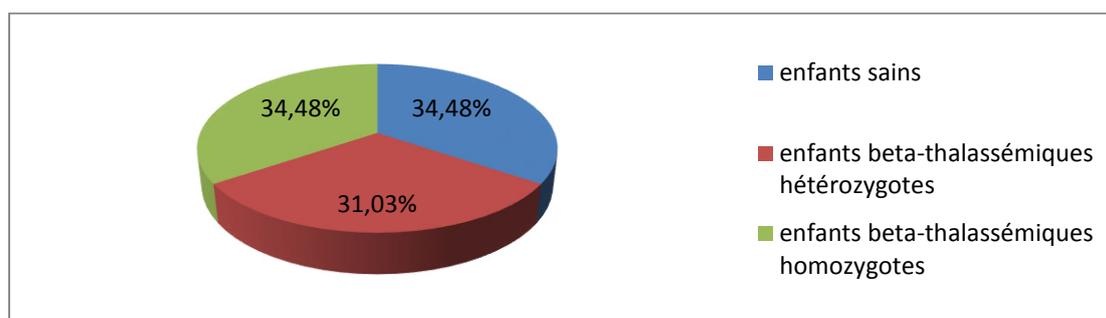


Figure 19. Répartition des enfants selon les résultats de l'enquête familiale.

D'après les résultats du (Tab.5). La répartition de nos patients beta-thalassémiques en fonction de la consanguinité, a donné deux groupes de malades le premier constitué de patients issus de mariage consanguin (70%) des 10 patients, le second de patients issus de mariage non consanguin (30%) (Fig.18).

Le degré de consanguinité diffère d'un patient à un autre. Cette dernière favorise la transmission des allèles porteurs des mutations beta-thalassémiques si les deux parents sont porteurs des gènes récessifs.

La Beta-thalassémie est fréquente dans le bassin méditerranéen à cause de la présence de consanguinité, mais elle ne semble pas être la cause principale de la thalassémie mais elle semble augmenter la probabilité de l'apparition de la maladie.

Une étude a fourni des informations sur 648 patients bêta- thalassémie à Chiraz est une ville du sud-ouest de l'Iran. Dans 40,6% des familles étudiées, les patients bêta- thalassémique étaient issus de mariages entre cousins germains [Bruneteau *et al.*, 2000].

Néanmoins 57% des mariages entre cousins germains a exposé une diminution de 16,4% parmi les familles à haut risque [Nasab, 1979]. Cette baisse significative est le résultat de la consultation pré- mariage et de la sensibilisation de la population générale sur la maladie du Cooley [Ghanei, 1997].

En 2007 fait état d'un degré élevé de consanguinité chez les couples dépistés pour les mariages consanguins étatiques et porteuses bêta-thalassémie (premiers et deuxième degré) constitué plus de 40% des mariages dans la bande de Gaza [Tarazi, 2007].

Nos résultats confirment l'existence de différents types de beta-thalassémie dans la population de Batna, parmi les patients qui ont été recensés au cours de cette étude, 31.03% atteints de la forme β -thalassémie hétérozygote 34.48 % sujets bêta-thalassémiques homozygotes et 34.48% des patients sains(Fig.19).

Les bêta-thalassémies sont hérités dans un mode autosomique récessif. Les parents d'un enfant atteint sont hétérozygotes obligatoires et portent une seule copie d'une mutation du gène *HBB* responsable de la maladie. Les parents porteurs de la maladie ont la possibilité de 25% d'engendrer des enfants atteint de la beta-thalassémie homozygotes, 25% des enfants sains et 50% des enfants hétérozygotes pour chaque grossesse [Thein, 1992].

Les sujets hétérozygotes d'une bêta-thalassémie ne sont pas anémiques ; exceptionnellement, une splénomégalie a été observée sous le grill costal. Le taux d'hémoglobine est normal ou légèrement faible, le nombre des réticulocytes est normale ou un peu élevé [Ragusa *et al.*, 2003]. Les deux signes biologiques caractéristiques sont la microcytose avec une élévation de l'hémoglobine A2 (> 3,5%). Ce dernier signe peut être masqué par une carence en fer, c'est pourquoi, en pratique, on peut être amené à faire un contrôle biologique après un traitement martial de quelques semaines, si le fer sérique est bas au premier examen [Bruneteau *et al.*, 2000]. La bêta-thalassémie majeure ou anémie de Cooley (β^0 thal) où le patient présente une anémie hémolytique pouvant se compliquer de lithiase biliaire, des déformations morphologiques, une hypertrophie de la lignée érythroblastiques, une splénomégalie, une hépatomégalie et une surcharge en fer [Hageg *et al.*, 2001; Bradai *et al.*, 2003]. Les cellules érythropoïtiques médullaires ne subissent pas après la naissance la répression au niveau du gène γ et synthétisent l'hémoglobine F ($\alpha 2\gamma 2$), la synthèse d'HbA2 étant possible ($\alpha 2\delta 2$) [Giro, 1994].

II.1.3. Différentes endocrinopathies associés à la beta-thalassémie majeure

Tableau 6. Fréquences des différentes endocrinopathies associés à la bêta-thalassémie majeure de nos patients.

Endocrinopathies	Nombre	Pourcentage (%)
L'ostéoporose	5	26,31%
Hypothyroïdie	2	10,5%
Hypo-parathyroïdie	2	10,5%
Diabète	1	5,26%
Déficit en GH	4	21,05%
Hyperglycémie modéré à jeun	0	0%
L'hypogonadisme	5	26,31%

D'après nos résultats (Tab.6), des différentes endocrinopathies sont associés à la beta-thalassémie majeure de nos sujets. Les complications endocriniennes sont

particulièrement fréquentes chez les patients bêta thalassémiques majeurs polytransfusés. La surcharge en fer semble jouer un rôle prépondérant.

A travers cette étude nous avons montré que ces complications étaient dominées par l'ostéoporose (26,31%) et l'hypogonadisme (26,31%). Une anomalie de l'hypothyroïdie et l'hypo-parathyroïdie étaient objectivées presque dans la moitié des cas (10,5%). Le déficit en GH était retrouvé aussi dans les cas précédents (4 patients : 21,05%). Pour le diabète il a été trouvé que chez (5,26%). Et l'inexistence des l'hyperglycémie modéré à jeun dans les cas précédents.

De multiples endocrinopathies, y compris hypogonadotrophique, hypogonadisme, un déficit en hormone de croissance et le diabète, sont connus comme complications dans la bêta-thalassémie majeure [**Vogiatzi et al., 2009**].

L'hypogonadisme est la plus fréquente des complications endocriniennes [**Sanctis et al., 2004**] due a la surcharge en fer atteint directement le parenchyme glandulaire ainsi que l'axe hypothalamo-hypophysaire. La glande pituitaire, sécrétant les hormones sexuelles, est sensible au stress oxydatif consécutif à cette accumulation ferrique. Une diminution de la sécrétion des hormones gonadotrophines (LH, hormone lutéinisante et FSH, hormone folliculostimulante) est donc observée, sans doute, causée par une perte de réponse sélective de la zone sécrétrice : elle est moins sensible à la stimulation par la GnRH (Gonadotrophine Release Hormone). Cet hypogonadisme est donc qualifié d'hypogonadotrophique [**Vogiatzi et al., 2009**].

D'après [**Vogiatzi et al., 2009**], les patients avec des concentrations croissantes de ferritine sérique ($P = 0.002$) et ceux avec la bêta-thalassémie majeure avaient des taux plus élevés de plusieurs endocrinopathies, la présence de l'hypogonadisme ($P = 0.01$) et les chances de hypogonadisme ont augmenté de 13,9% à partir du 5 ans.

Le retard pubertaire est lié principalement à une insuffisance gonadotrope, l'antéhypophyse étant particulièrement sensible au stress oxydatif. Plus rarement le fer en excès provoque aussi des lésions gonadiques directes [**Thuret, 2008**].

D'après [**Karamifar et al., 2005**] 10 des 11 adolescents ou jeunes adultes beta-thalassémiques avaient une hypogonadisme [**Karamifar et al., 2005**].

L'ostéoporose est responsable de la morbidité importante chez les patients adultes atteints de β -thalassémie majeure affectant 40-50% de cette population et conférant un risque significativement accru de fractures [Terpos et Voskaridou, 2010].

La pathogénèse de l'ostéoporose est multifactorielle et comprend de l'environnement (régime alimentaire et le mode de vie), iatrogènes (médicaments) acquise (expansion de la moelle osseuse, l'hémochromatose, l'hépatite, l'insuffisance de l'hormone de croissance ou un facteur de croissance de l'insuline I et hypogonadisme) et les facteurs génétiques [Skordis et Toumba, 2011].

La surcharge en fer a de nouveau un rôle prépondérant dans cette complication du système osseux. D'une part, des dépôts de fer s'effectuent à la surface des ostéoïdes, empêchant leur maturation et la minéralisation locale des os. Il en résulte un phénomène d'ostéomalacie: une décalcification osseuse. D'autre part, ce fer intoxique les ostéoblastes ce qui, aboutit à un taux réduit de formation osseuse. Enfin, l'incorporation de fer dans les cristaux d'hydroxyapatite de calcium affecte la croissance de ces cristaux et réduit leur résistance. De plus, les ostéoclastes montrent également une augmentation de leur activation [Haidar, 2011].

L'hypothyroïdie, caractérisée par des faibles valeurs de thyroxine (T4) et de thyroxine libre (FT4) avec des signes et des symptômes tels que la lenteur mentale et physique, le gain de poids, sensation de froid, de la somnolence, de la bradycardie et la constipation [Farmaki *et al.*, 2010].

D'après La Haute Autorité de Santé (HAS) [2008], l'hypoparathyroïdie varie selon l'âge des patients étudiés, les critères diagnostiques de l'hypoparathyroïdie d'un dosage annuel de parathormone (PTH) de dépistage. L'hypoparathyroïdie, par atteinte des glandes parathyroïdiennes est diagnostiquée devant des anomalies du métabolisme phosphocalcique et des taux sanguins abaissés de PTH.

L'hypoparathyroïdie est une autre complication du système endocrinien dans la thalassémie, qui peut se développer à la fin de l'adolescence et de contribuer à l'ostéopénie, puis l'ostéoporose. Une étude récente a rapporté la prévalence de 13,5%, sans différence de sexe [Angelopoulos *et al.*, 2006].

La surcharge en fer avec le dépôt sur des cellules parathyroïdes et la fibrose des tissus sont les principales causes de l'hypoparathyroïdie tandis que l'anémie chronique est un facteur supplémentaire causant la dysfonction parathyroïdienne [Karimi *et al.*, 2003].

L'hypoparathyroïdie se manifeste par un faible taux de PTH (parathormone), un faible taux de calcium (Ca) (inférieur à 2,1 mmol/L, associé à une hypercalciurie), tandis que la concentration en phosphore (P) est significativement augmentée par rapport aux valeurs physiologiques [Angelopoulos *et al.*, 2006].

Un déficit en hormone de croissance GH est estimé à présent à 8-50% des courts enfants thalassémiques, déficit de croissance est souvent observée chez les patients atteints de bêta-thalassémie polytransfusés, surtout à l'adolescence. Il ne dépend pas entièrement de l'absence de leur poussée de croissance pubertaire [Cavallo *et al.*, 1997].

Dans une étude sur Soixante-neuf patients touchés par bêta-thalassémie majeure, 21 ont de grave déficience en GH et 18 autres patients avaient déficience partielle en GH. et 20 des patients avec de graves GH déficience [Danesi *et al.*, 2007].

Nos résultats accordent avec [La Rosa *et al.*, 2005] qui ont trouvés 4 sur 16 de ces patients jeunes adultes atteints de la maladie de Cooley sont diagnostiquée dans l'enfance avec GH déficience partielle.

L'hormone de croissance (GH) et les stéroïdes sexuels jouent un rôle crucial dans le remodelage osseux et dans le maintien de l'architecture squelettique pendant la vie adulte. il stimule l'expression des protéines morphogénétiques osseuses, qui sont importants pour la différenciation des ostéoblastes et de la formation osseuse, Via ces Mécanismes le GH stimule la croissance osseuse longitudinale [Toumba et Skordis, 2010].

Le diabète de type 1 est une complication fréquente chez les patients atteints de bêta-thalassémie [Khalifa *et al.*, 2004], un dépôt en fer sur les îlots de Langerhans du pancréas induit un déficit en insuline est considérée comme la principale cause des anomalies dans le métabolisme du glucose observé chez les thalassémiques [Cher *et al.*, 2001 ; Monge *et al.*, 2001].

D'autres études ont rapporté une hyper-insulinémie avec des tests de tolérance au glucose par voie orale, ce qui suggère un rôle pour la résistance à l'insuline dans la médiation de ces anomalies métaboliques [Maerker *et al.*, 1998]. L'hémossidérose, les infections du foie, et les facteurs génétiques semblent être crucial dans le développement du diabète [Jansen *et al.*, 1997].

Chez les patients bêta-thalassémie majeur , c'est la résistance à l'insuline qui est significativement augmentée, engendrant une intolérance au glucose. Chez les bêta-thalassémie ayant des transfusions régulières [Swaminathan *et al.*, 2007].

Nos résultats concordent avec ceux de [Khalifa *et al.*, 2004] qui ont trouvé que Sur ces 48 patients atteints de bêta-thalassémie majeure, cinq (10,4%) sont des patients diabétiques.

II.2. Etude des paramètres biologiques de notre population

II.2.1.Variation du nombre des GR, des GB, des réticulocytes et des plaquettes chez des enfants bêta-thalassémiques homozygotes

Tableau 7. Variation du nombre des GR, des GB, des réticulocytes et des plaquettes chez des enfants beta-thalassémiques homozygotes.

Etat/ Test biologique	TEMOINS	MALADES
Globules rouges ($10^6 /mm^3$)	4,72 ± 0,1245	3,08 ± 0,07572**
Réticulocytes (/mm ³)	24701 ± 287	16372 ± 419,1**
Leucocytes ($10^3 /mm^3$)	4304± 111	7186±556***
Plaquettes ($10^3 /mm^3$)	168356 ± 19131	336987 ± 34719***

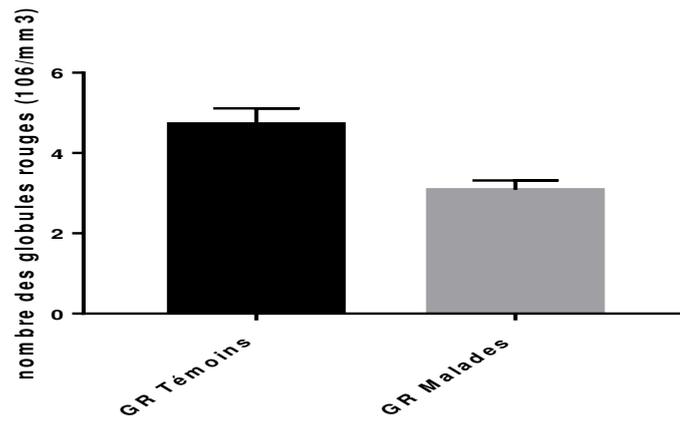


Figure 20. Variation du nombre des globules rouges ($10^6 / \text{mm}^3$) chez les malades de β -thalassémies homozygotes ($P < 0,01$ **)

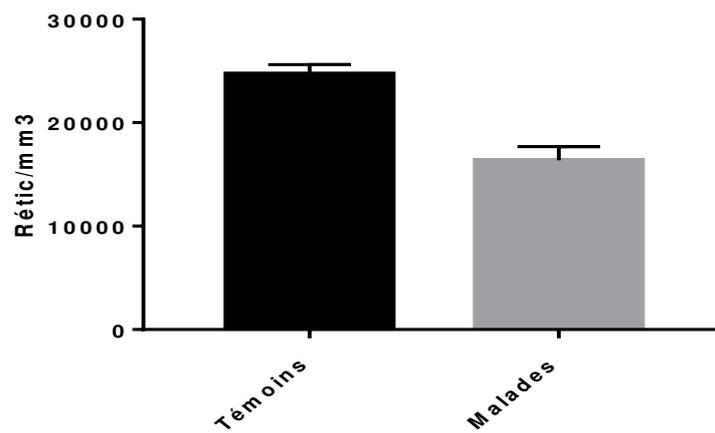


Figure 21. Variation du nombre des réticulocytes (Rétic / mm^3) chez les malades de béta-thalassémies homozygotes ($P < 0,01$ **)

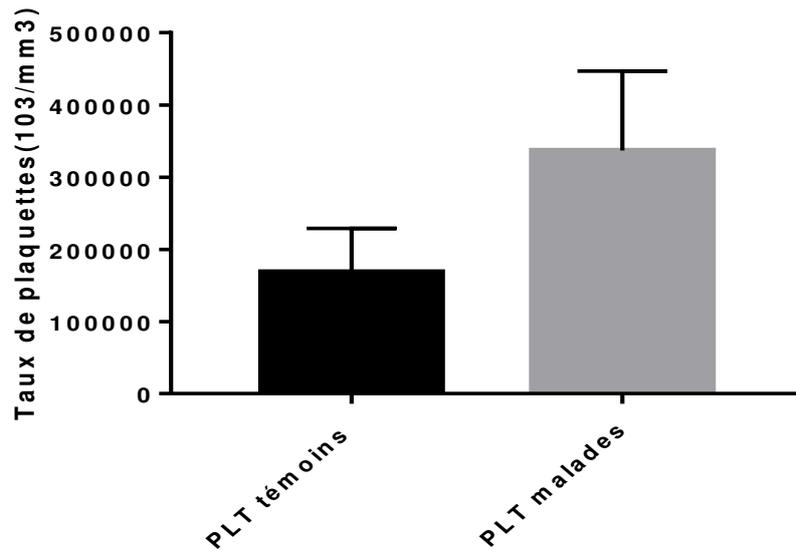


Figure 22. Variation du taux des plaquettes ($10^3/\text{mm}^3$) chez les malades de béta-thalassémies homozygotes ($P < 0,005$ ***).

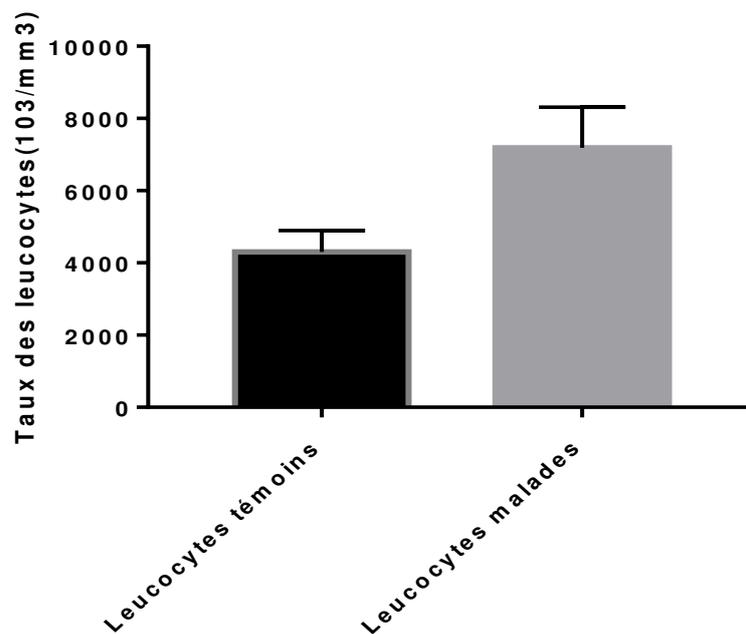


Figure 23. Variation du nombre des leucocytes ($10^3/\text{mm}^3$) chez les malades de béta-thalassémies homozygotes ($P < 0,005$ ***).

Nos résultats révèlent, une différence statistiquement très significative ($P < 0,01$ **) des hématies chez nos patients ($3,08 \pm 0,07572$) par rapport aux témoins ($4,72 \pm 0,1245$) (**Fig.20**), ainsi une diminution très significative ($P < 0,01$ **) des réticulocytes chez nos patients ($16372 \pm 419,1$) par rapport aux témoins (24701 ± 287) (**Fig.21**).

Cependant une augmentation hautement significative ($P < 0,005$ ***) des plaquettes chez nos patients (336987 ± 34719) par rapport aux témoins (168356 ± 19131) (**Fig.22**) ainsi que une augmentation hautement significative ($P < 0,005$ ***) des leucocytes chez nos patients (7186 ± 556) par rapport aux témoins (4304 ± 111) (**Fig.23**) ont été constatés.

D'après [Hagege *et al.*, 2001], il n'y a pas d'anémie à la naissance puisque l'Hb F est le principal constituant de l'hémoglobine à ce moment de la vie. La dysérythropoïèse qui en résulte est le principal mécanisme de l'anémie dans la β -thalassémie homozygote. Certains érythroblastes, particulièrement ceux qui produisent de l'Hb F, parviennent à donner naissance à un réticulocyte, puis à un érythrocyte mature qui passe dans le sang périphérique. L'hématie circulante, appauvrie en hémoglobine (hypochromie), déformée (poïkilocytose), a une demi-vie raccourcie et rend compte du deuxième mécanisme de l'anémie: l'hyperhémolyse [Thuret, 2014]. La plupart des érythroblastes étant détruits dans la moelle, l'anémie est peu régénérative, moins que ne le voudrait le taux d'hémoglobine circulant si la moelle fonctionnait correctement. Ainsi, l'érythropoïèse inefficace et l'hyperhémolyse sont les deux composants de l'anémie [De Montalembert, 2002].

L'érythropoïèse inefficace étant le processus dominant. Par contre, comme dans toute anémie hémolytique, l'hyperhémolyse peut augmenter du catabolisme des noyaux et de l'ADN qu'ils contiennent explique la tendance à un taux excessif d'acide urique dans le sérum sanguin [Olivieri *et al.*, 1994].

Le tissu hématopoïétique s'étend hors de la moelle osseuse sous forme tuméroides. Une déformation osseuse peut alors être observée. C'est l'hématopoïèse extramédullaire qui est rencontrée dans près de 1 cas sur 5 entre 20 et 30 ans, et 1 sur 3 après 30 ans des patients béta-thalassémiques [Thuret, 2014].

Nos résultats sont en accord avec [Agouti *et al.*, 2015] qui ont trouvé un taux élevés des plaquettes chez 37 patients jeunes et adultes atteints de la maladie béta-thalassémie majeure.

Des études sur l'activité plaquettaire des patients β -thalassémiques montrent que la durée de vie de leurs plaquettes est diminuée. Cependant, une agrégation plaquettaire chronique anormale a été confirmée. En effet, la P-selectin, un marqueur de l'activation plaquettaire, est augmentée sur les plaquettes normales des patients thalassémiques. Les agrégats plaquettaires sont donc plus fréquents dans la circulation sanguine, d'autant plus chez les patients splénectomisés [Panigrahi et Agarwal, 2007].

Une perte des activités de filtrage de la rate peut permettre aux cellules endommagées de persister dans la circulation, ce qui conduit à des changements dans l'endothélium qui aboutissent à hypercoagulabilité. La splénectomie peut également contribuer au risque de thrombose en augmentant les leucocytes et les plaquettes avec une activation accrue et d'agrégation plaquettaire [Frey *et al.*, 2014].

II.2.2.Variation du volume globulaire moyen (VGM) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) chez les malades de β -thalassémies homozygotes

Tableau 8. Variation du volume globulaire moyen (VGM) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) (pg) chez les malades de beta-thalassémies homozygotes

Etat/Test biologique	Témoins	Malades
VGM (fl)	74,3 ± 5,224	59,3 ± 0,7311**
TCMH (pg)	29,2 ± 0,5333	15,1 ± 0,6574***

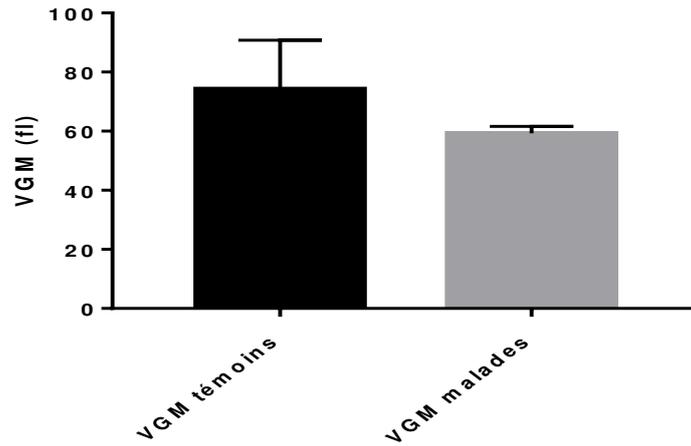


Figure 24. Variation du volume globulaire moyen (VGM) (fl) chez les malades de béta-thalassémies homozygotes ($p < 0,01$ **).

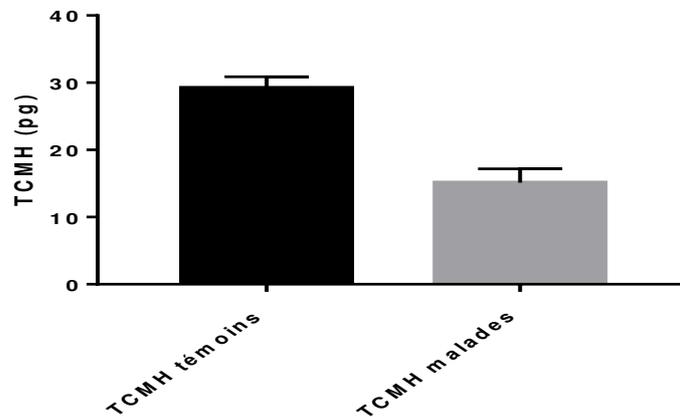


Figure 25. Variation la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) (pg) chez les malades de béta-thalassémies homozygotes ($p < 0,001$ ***).

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une diminution très significative de volume globulaire moyen ($p < 0,01$ **) chez ces malades ($59,3 \pm 0,7311$) par rapport aux témoins ($74,3 \pm 5,224$) (**Fig.24**).

L'hémogramme révèle une anémie ($Hb < 70$ g/l), microcytaire (VGM : $59,3 \pm 0,7311$ fl), hypochrome (TCMH : $15,1 \pm 0,6574$ pg), avec réticulocytose, moins élevée que ne le voudrait le degré de l'anémie. La moelle est très riche en érythroblastes [**Bruneteau et al, 2000**].

Selon nos résultats, on ne constate qu'une diminution hautement significative de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ($p < 0,001$ ***) chez ces malades ($15,1 \pm 0,6574$) par rapport aux témoins ($29,2 \pm 0,5333$) (**Fig.25**). Selon

Vanbourdolle *et al.*, 2007; le défaut de production d'hémoglobine entraîne une anémie microcytaire hypochrome. L'hémoگرامme révèle une anémie souvent microcytaire, hypochrome (teneur globulaire moyenne en hémoglobine inférieure à 26 pg) [Giro, 1994].

II.2.3. Variation du taux de l'hémoglobine (g/dl) chez les malades de béta-thalassémies homozygotes

Tableau 9. Variation du taux de l'hémoglobine (g/dl) chez les malades de beta-thalassémies homozygotes

Etat/ Test biologique	Témoins	Malades
Taux de l'Hb (g/dl)	12,4 ± 0,3055	5,8 ± 0,6464***

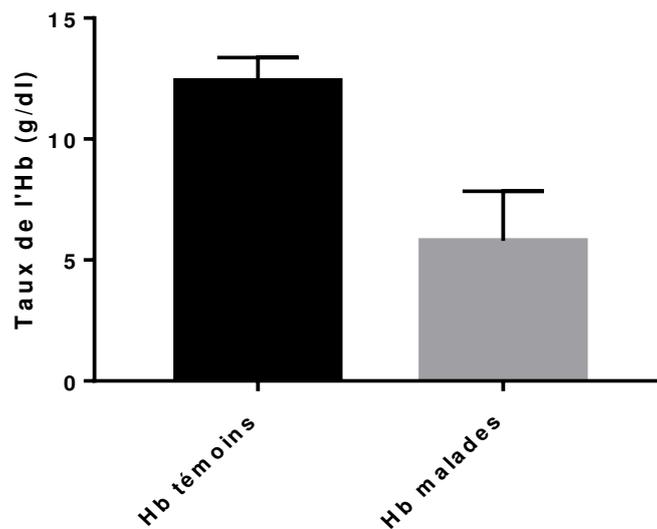


Figure 26. Variation du taux de l'hémoglobine (g/dl) chez les malades de β -thalassémies homozygotes ($p < 0,001$ ***).

D'après nos résultats, on a constaté un allongement très hautement significatif ($p < 0,001$) du taux de l'Hb chez les témoins ($12,4 \pm 0,3055$) par rapport aux malades ($5,8 \pm 0,6464$) (Fig. 26).

L'hémoglobine A, tétramère $\alpha_2\beta_2$ est synthétisée en quantité extrêmement réduite ou nulle au cours des β -thalassémies majeurs, proportionnelle au déficit de synthèse de la beta-globine [Giro, 1994].

Le motif d'hémoglobine chez les patients souffrant de thalassémie homozygote (bêta-thalassémie majeure) consiste en une augmentation variable HbF, qui représente alors de 8% à 90% de la concentration d'hémoglobine totale [Marengo-Rowe, 2007].

Les chaînes α célibataires sont instables et précipitent dans les érythroblastes. Cet excès de chaîne α libre induit des oxydations anormales, provoque à la mort cellulaire ce qui entraîne à une érythropoïèse inefficace [Drefys, 1992; Maier et Girot, 1996].

II.2.4. Etude d'aspect cytologique du sang chez les enfants beta-thalassémiques homozygotes

On admet que la supériorité de la formule sanguine automatisée se limite aux globules blancs matures, tandis que la microscopie manuelle est principalement utilisée pour différencier les cellules plus immatures et anormales. Ainsi, en plus des données quantitatives, les analyseurs donnent des informations qualitatives, qui avertissent l'opérateur de possibles résultats inexacts en raison d'interférences ou de la présence de cellules anormales. Au vu de cela, seule une revue manuelle sélective du frottis sanguin est indispensable, sur la base de données quantitative anormale.

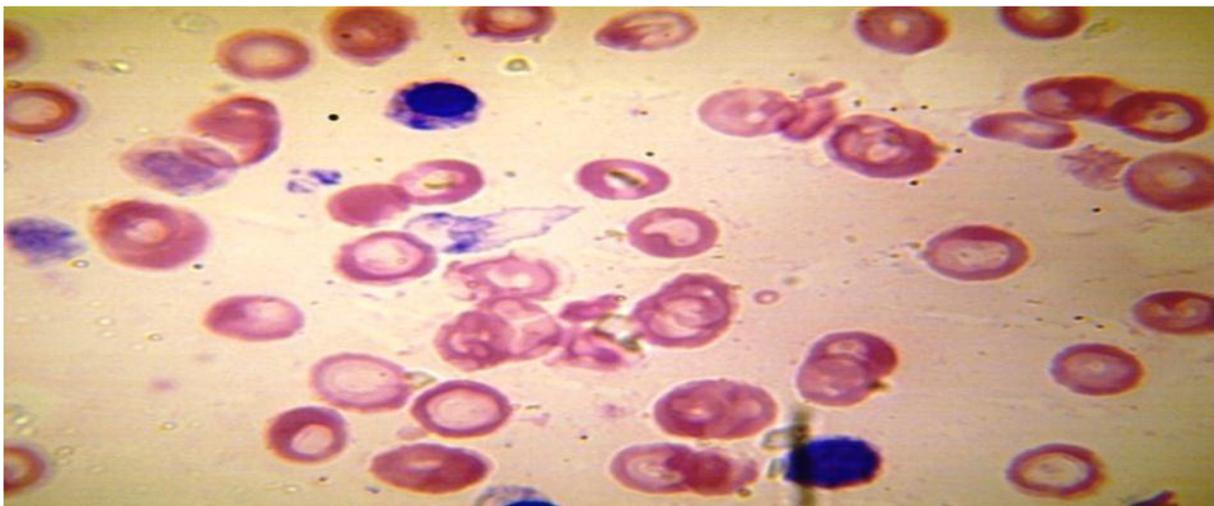


Figure 27. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote montrant des hématies hypochromes microcytaires avec une anisocytose et poïkilocytose. (Coloration de Wright : 40×100)

D'après les photo-lames obtenues, des enfants beta-thalassémiques homozygotes, et dans toutes les observations microscopiques on a constaté des modifications morphologiques de microcytose, hypochromie, anisocytose, poikilocytose (**Fig. 27**).

La synthèse de la chaîne bêta est presque complètement inhibée dans la thalassémie majeure, une anémie sévère commence à environ 3 à 6 mois, le moment où la synthèse gamma-chaîne diminue normalement [**Badens, 2011**]. L'anémie produit une situation de stress dans la moelle osseuse. Cela conduit à la poursuite de la synthèse HbF mais à un rythme bien inférieur à ce qui est nécessaire pour une compensation adéquate de l'anémie. Le HbF produit est inégalement répartie dans les globules rouges et représente pour l'anisochromasie. Un grand nombre de globules rouges imparfaits sont détruits dans la moelle osseuse, ce qui donne lieu à une érythropoïèse inefficace, ce qui est une caractéristique importante de la maladie. apoptose accélérée, la principale cause de l'érythropoïèse inefficace, est causée par la chaîne alpha excédentaire déposé dans les précurseurs érythroïdes [**Pootrakul et al., 2000**].

Dans l'érythroblaste, l'excès relatif de chaînes alpha précipite sous la forme d'inclusions, toxiques pour les membranes cellulaires et nucléaires. La déformation de ces membranes entraîne une destruction de l'érythroblaste dans la moelle [**Beris et al., 1991**]. Cette dysérythropoïèse intéresse essentiellement les érythroblastes polychromatophiles et acidophiles [**Weatherall et Clegg., 1981**].

Lorsque les chaînes α insolubles sont contenues dans des hématies circulants, elles forment alors des hémichromes, qui précipitent sous la forme d'un corps de Heinz. Ces derniers provoquent l'hémolyse des globules rouges qui sont détruits de manière précoce dans la rate [**Badens, 2011**].

II.2.5. Etude de l'Hb par électrophorèse avant toute transfusion (Hb pré-transfusionnelle)

Tableau 10. Etude de l'Hb par électrophorèse avant toute transfusion (Hb pré-transfusionnelle)

Patients	HbF%	HbA2%	HbA%
P1	87	6	7
P 2	58	7	35
P3	93,3	5	1,7
P 4	63	5	32
P 5	86,5	9	4,5
P 6	75	6	19
P 7	87,5	8	4,5
P8	58	5	37
P 9	65	4	31
P 10	73	7	20

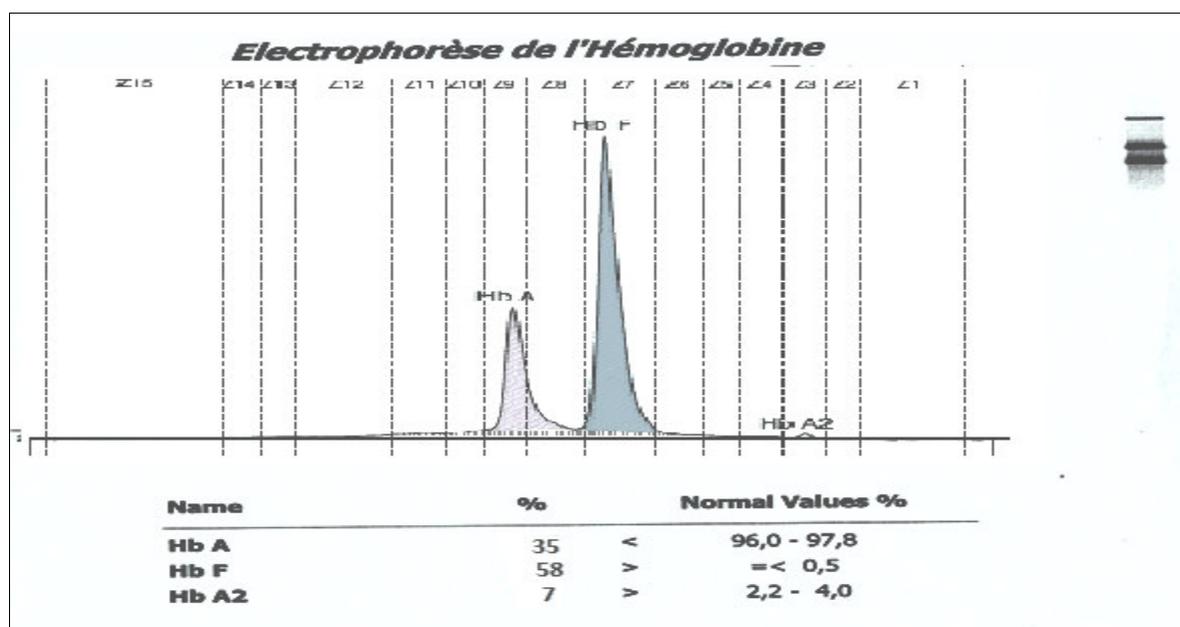


Figure 28. Exemple d'un profil électrophorétique de l'Hb à pH alcalin chez un enfant béta-thalassémique homozygote

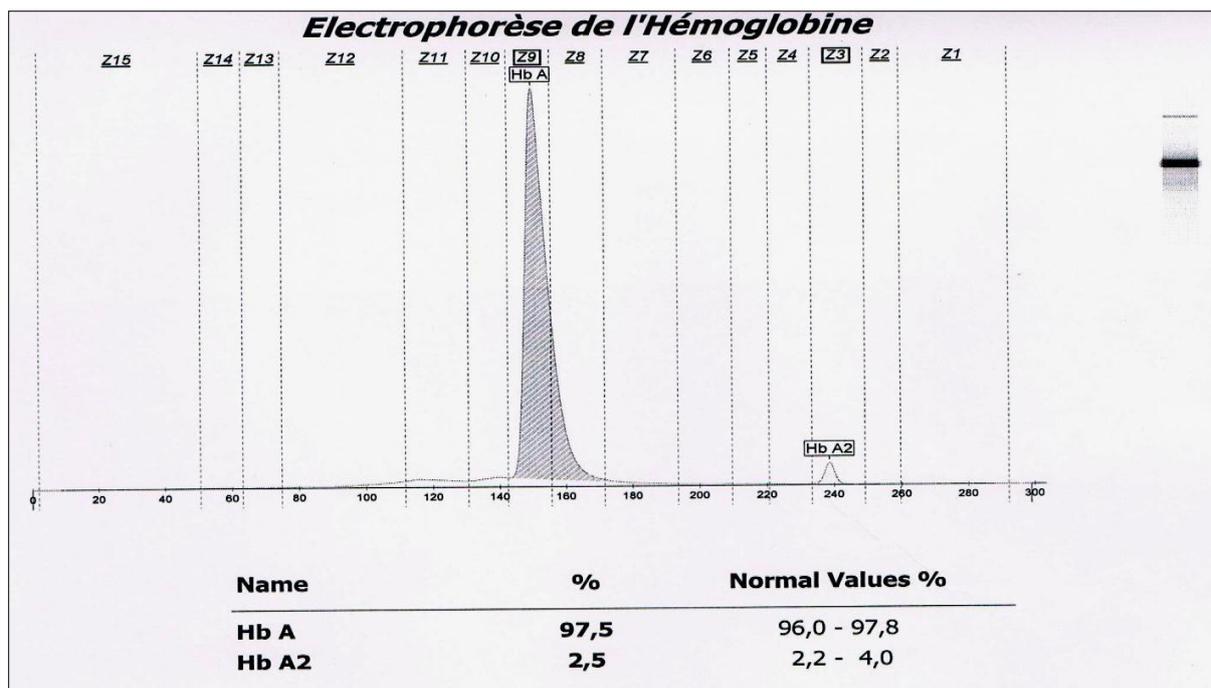


Figure 29. Exemple d'un profil électrophorétique d'un sang normal.

Les résultats obtenus montrent le pourcentage de l'HbF est de 58 à 93,3% et augmentation de l'Hb A2 de 4 à 9 %) chez un enfant β -thalassémique homozygote (**Fig 28**). La beta-thalassémie est associée à un tableau hématologique assez caractéristique qui rend le diagnostic clinique facile à établir (ou tout du moins à suspecter) phénotypiquement. Une bêta- thalassémie majeure se caractérise par une anémie très profonde avec absence d'HbA et des HbA2 et F élevées (> 80 % pour l'HbF) ; ou absente et des HbA2 et HbF élevées. Chez l'adulte normal, le taux d'Hb F est inférieur à 0,5 % mais il existe des variations génétiques et liées à l'âge [**Maier-Redelsperger et Girot, 1996**].

La coexistence d'un taux d'Hb F entre 50 et 80 % et d'une anémie microcytaire hypochrome évoque une β -thalassémie majeure [**Bardakjian-Michau et al, 2003**]. En effet, il existe une répartition hétérogène de l'Hb F dans les hématies : une population d'hématies contient de l'Hb F, l'autre non [**Montalembert, 2002**].

L'anémie sévère dans la thalassémie reflète à la fois une érythropoïèse inefficace, ainsi que la persistance de l'expression d'HbF, couramment observée, est en grande partie liée à la survie sélective des cellules normalement riches en HbF, ou cellules F, dont la proportion est génétiquement déterminée [**Forget, 2001**].

II.2.6. Evaluation de la surcharge en fer par le dosage de la ferritine de notre population

Tableau 11. Evaluation e la surcharge en fer par le dosage de la ferritine de notre population

Paramètre	Témoins	Patients
Ferritine ($\mu\text{mol/l}$)	$175,2 \pm 7,728$	$1278 \pm 87,74^{***}$

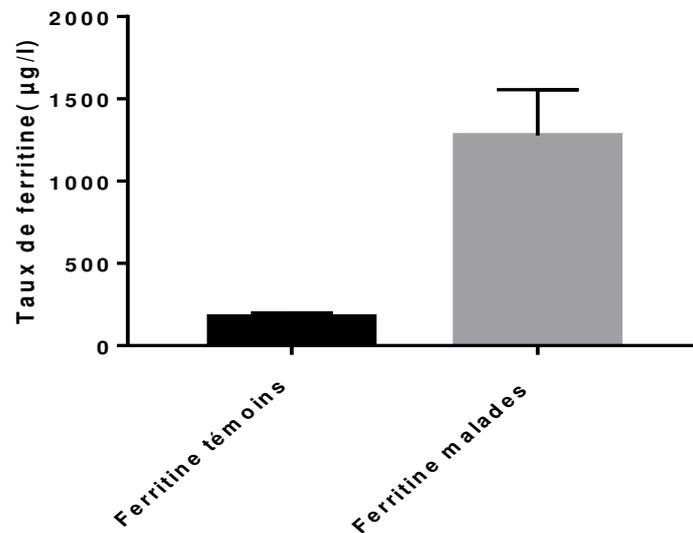


Figure 30. Variation du taux de la ferritine chez des enfants beta-thalassémiques homozygotes ($P < 0,001^{***}$).

D'après nos résultats, on remarque un taux très hautement significatif ($p < 0,001^{***}$) du taux de ferritine chez les témoins ($1278 \pm 87,74$) par rapport aux malades ($175,2 \pm 7,728$) (**Fig 30**). D'après [Olivieri et Brittenham, 1997], la ferritine est le paramètre le plus généralement utilisé pour surveiller la surcharge de fer. On remarque que le taux de la ferritine des malades est très élevé par rapport aux témoins, Les surcharges en fer sont toxiques pour l'organisme en raison de la capacité du fer à réagir avec l'oxygène pour former des radicaux libres. D'après [Shamsian *et al.*, 2012], la surcharge de fer a été due aggraver à la transfusion et à l'absorption élevée de fer. Nos résultats concordent avec ceux de [Ghone *et al.*, 2008] qui ont trouvé que les patients beta-thalassémies majeurs ont un taux de ferritine élevée et d'anémie grave due à l'érythropoïèse inefficace qui est la raison primaire de la surcharge de fer et de la transfusion sanguine [Shamsian *et al.*, 2012].

Quand les chaînes β globines sont réduites ou absentes, les chaînes α non assemblées précipitent au niveau des précurseurs des érythrocytes et conduisent à une destruction oxydative de la membrane cellulaire des hématies provoquant une apoptose, les chaînes agrégées déclenchent également la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui endommagent encore les protéines et les constituants lipidiques des membranes cellulaires. Ainsi que l'hème et libère le fer [Rund *et al.*, 2005].

Ainsi, le dépôt de fer peut affecter tous les organes comme le cœur, le foie et le pancréas. Une fois que l'insuffisance cardiaque ou hépatique se produit, l'espérance de vie du patient serait réduite en raison de changements irréversibles [Shamsian *et al.*, 2012].

La distribution du fer est également différente pour chaque patient béta-thalassémie majeur. [Kolnagou *et al.*, 2013], ont proposé que cette variation de la concentration en fer chez les patients souffrant béta-thalassémie majeur puisse être due aux procédés de chélation, ainsi que des facteurs génétiques, alimentaires et pharmacologiques. Il est donc recommandé que la surcharge en fer de tous les organes soit surveillée de près pour les patients atteints de béta-thalassémie majeure.

II.3. Quantification de l'ADN par le spectrophotomètre Nanodrop

Les ADN sont quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000) en déposant 1 μ l d'échantillon. Les avantages primordiaux du dosage au Nanodrop sont le faible volume d'échantillon et l'absence de la dilution de l'échantillon. L'ADN absorbe habituellement à 260 nm. D'après les résultats du contrôle au Nanodrop, le degré de pureté de l'ADN des échantillons est bon.

II.4. Contrôle de la qualité d'ADN après extraction : Résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose 2%

M



Figure 31. Exemple représentatif d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par PCR1 (355pb) gène *HBB*. La piste **M** indique le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 100 pb). Les autres pistes correspondent à des cas β -thalassémiques.

La réaction du PCR1 visant l'amplification d'une séquence de 355pb située dans le gène *HBB*, permet la détermination de la taille de chaque fragment d'ADN en mesurant leur distance en le comparant à celle d'un marqueur de taille. Tous les cas ont montré une amplification de ce gène témoignant de la présence d'ADN de bonne qualité pouvant servir à notre étude (**Fig31**).

II.5. Identification des mutations fréquentes du gène *HBB* par la méthode de miniséquençage multiplex à l'aide du kit SnapShot

Cette étude est la première enquête au niveau moléculaire de la β -thalassémie dans la région de Batna (nord-est de l'Algérie).

La sélection des mutations cibles est une considération importante affectant l'applicabilité de la méthode. Nos choix étaient basés uniquement sur la prévalence de la mutation dans notre population algérienne. Pour détecter les quatre variantes génétiques algériennes du gène *HBB*, Une PCR allèle-spécifique a été réalisée, suivie d'une réaction de miniséquençage hautement multiplexée. Dans cette étape,

les mutations ont été détectées par extension nucléotidique unique d'amorces directement adjacente à la terminaison de la mutation d'intérêt. Les tailles des amorces spécifiques du gène *HBB* allaient du 18 au 20 nucléotides.

Ainsi, la position du pic dans l'électrophérogramme d'amorce allongée est spécifique au locus de la mutation, tandis que la couleur crête (s) / fluorescence indique le génotype. L'ADN des échantillons provenant des enfants atteints de la beta-thalassémie ont été analysés par cette technique.

Le séquençage d'ADN direct des régions complètes de l'intron et de l'exon du gène *HBB* ont été effectuées après miniséquençage et l'obtention d'un SnapShot normale. Les électrophoréogrammes obtenues de nos patients sont présentés dans les figures 32, 33, 34,35 et 36.

Tableau 12. Résultats de l'analyse moléculaire (génotype des patients en fonctions des mutations identifiées)

Nom de la mutation du gène <i>HBB</i>	Phénotype	Localisation Dans le gène <i>HBB</i>	Variation génomique (HGVS)	N° d'Allèles	%
Codon 39 (C>T)	β°	Exon 2	c.118C>T	32	84,21
IVS-I-110 (G>A)	β^{+}	Intron 1	c.93-21G>A	3	7,89
Codon 27 (G>T) Hb Knossos	β^{+}	Exon 1	c.82G>T	1	2,63
Codon 54(-T)	β°	Exon 1	c.165delT	2	5,26

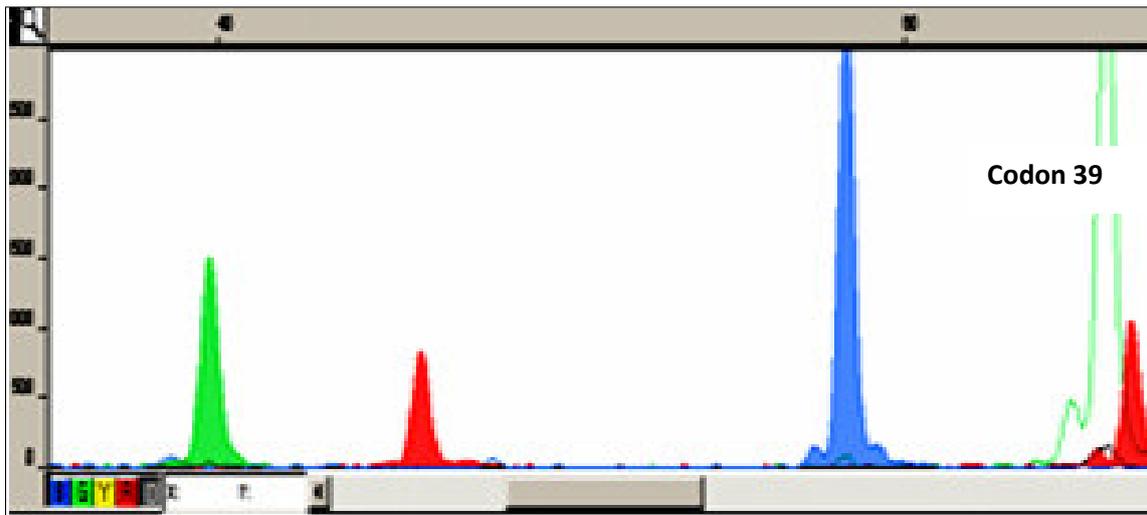


Figure 32. Electrophérogramme montre un pic pour codon 39 (C> T) mutation à l'état homozygote.

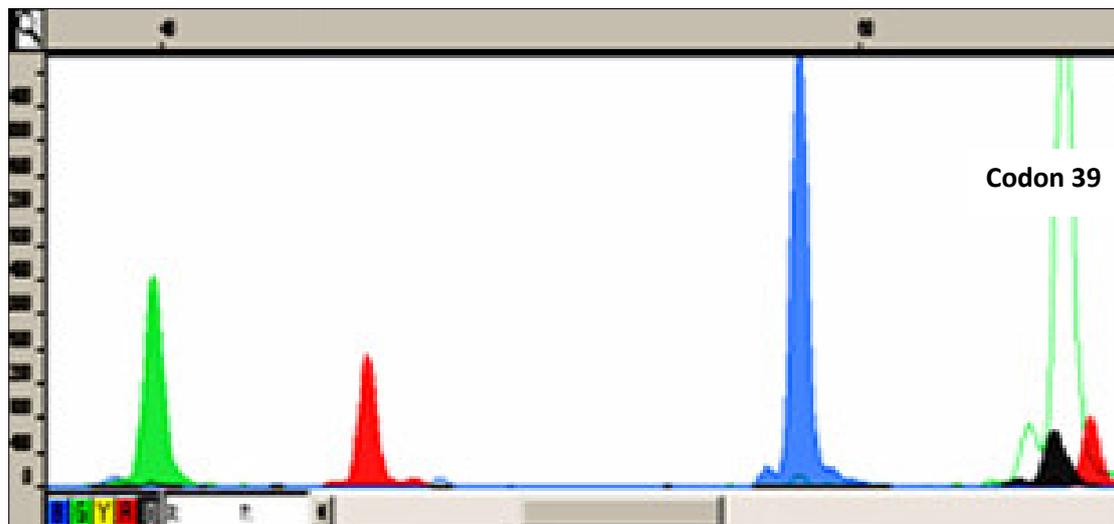


Figure 33. Electrophérogramme montre un pic pour codon 39 (C> T) mutation à l'état hétérozygote

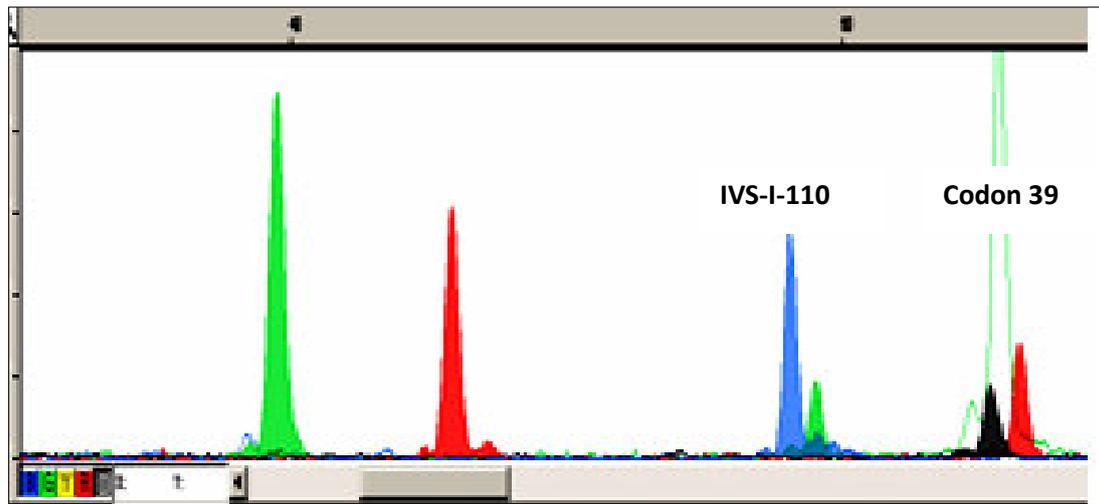


Figure 34. Electrophéogramme montre un pic pour codon 39 (C> T) et un pic pour IVS-I-110 (G>A) mutation à l'état hétérozygote composite.

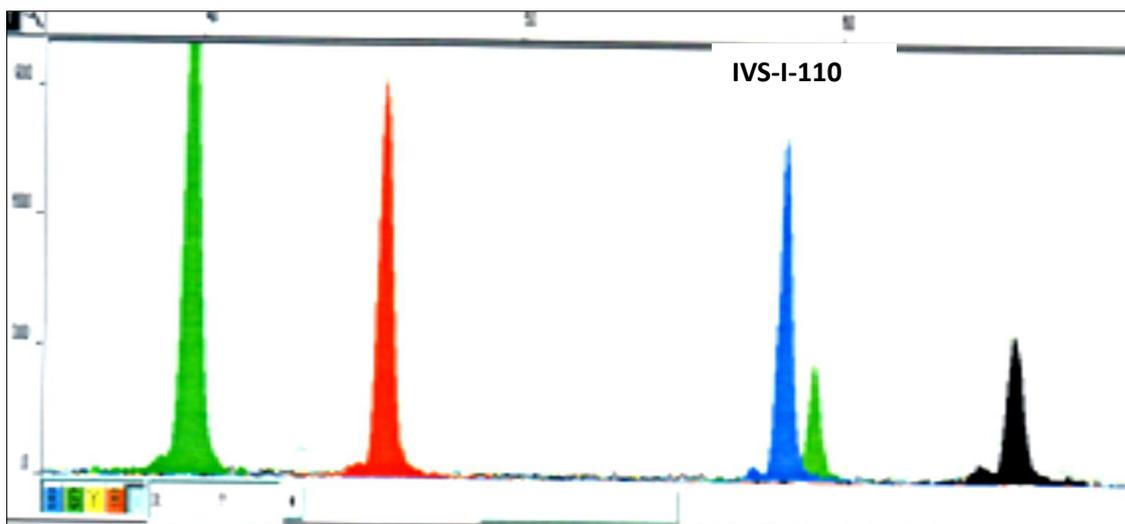


Figure 35. Electrophéogramme montre un pic pour IVS-I-110 (G>A mutation à l'état hétérozygote).

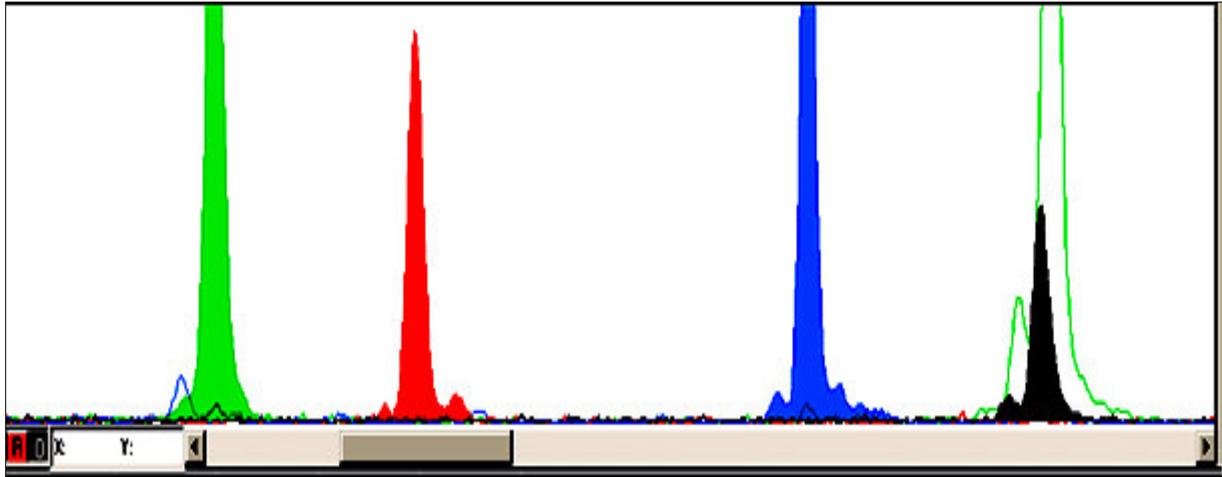


Figure 36. SNaPshot normale à séquencer

Les résultats obtenus montrent la présence des mutations différentes responsables de β -thalassémie avec une prédominance de la mutation non-sens au codon 39 (C > T) qui représente 84,21% des allèles étudiés.

Trois autres mutations ont été décrites dans notre population : IVS-I-110 (G>A) qui représente une fréquence minoritaire (7,89%), cette mutation est associée avec la mutation non sens codon 39 (C>T) aussi elle est détectée à l'état hétérozygote. Deux rares mutations ont été observées avec des fréquences différentes, il s'agit du codon 54(-T) (5,26%) cette lésion est détectée chez une deuxième famille algérienne et la mutation du codon 27 (G > T) ou Hb Knossos (2,63%) qui représente une première association avec la mutation non sens du codon 39 (C > T). Bien que les défauts moléculaires à l'origine de cette pathologie soit d'une extrême diversité, chaque population se caractérise par un groupe de 4 à 5 mutations qui lui est spécifique. Presque chaque type d'anomalie qui diminue la synthèse de l'ARN messenger ou d'une protéine a été identifiée comme cause de la β -thalassémie.

Les deux mutations codon 39(C>T) et IVS-I-110 ont été déjà décrites dans la population Algérienne [Addour *et al.*, 2009; Bennani *et al.*, 1994]. Ces deux mutations sont retrouvées à égale fréquence, représentent 80% des allèles β -thalassémique. Une grande hétérogénéité des défauts moléculaires à l'origine de β -thalassémie en Algérie est détectée. Le nombre de mutations de β -thalassémie en Algérie est de 25 mutations [Cao *et al.*, 1989]. D'autre part, la population algérienne est caractérisée par quatre mutations dominantes, qui représentent plus de 80% des allèles β -thalassémique. Ce sont le non-sens de la mutation du codon 39 C \rightarrow T; IVS-I-

110 substitution G → A; framshift le codon 6 (-A) et la mutation IVS-I-1 G → A [Lemsaddek *et al.*, 2004]. La β-thalassémie en Algérie, est par son fréquence et sa gravité pose un grand un problème de santé publique, principalement dans le soutien de la transfusion [Cao *et al.* , 1989].

Les défauts moléculaires responsables de β-thalassémie sont la plupart des mutations ponctuelles, et plus de 200 de ces mutations ont été décrits dans le monde entier et près de 300 allèles de β -thalassémie ont été caractérisés (<http://globin.cse.psu.edu>). Le nombre de mutations détectés dans chaque population varie en fonction de son origine et l'interaction avec d'autres populations, ainsi que la les méthodes utilisées pour la caractérisation, bien que généralement une poignée de ces mutations sont responsables de la majeure partie des cas dans une population donnée parmi les Arabes, l'hétérogénéité de ces mutations varie de 44 mutations différentes [Al-Ali *et al.*, 2005; Baysal, 2001]. La mutation la plus répandu et commune chez les Arabes est l'IVS-I-110 (G> A). Cette mutation a sa plus forte prévalence de Chypre et de la Grèce [Baysal *et al.*, 1992; Kattamis *et al.*, 1990]. Selon [Labie *et al.*, 1990], la prévalence des mutations de la β-thalassémie en Afrique du Nord, passerait de l'ouest vers l'est des pays méditerranéens (le Maroc 0,94%, l'Algérie 1,4%, la Tunisie 3% et l'Egypte 4,5%) [Bennani *et al.*, 1993 ; Bennani *et al.*, 1994].

La mutation non sens du codon 39 (C> T) a été décrite pour la première fois en Sardaigne en 1981 [Trecartin *et al.*, 1981]. Au niveau du codon n ° 39, il y a la conversion du codon CAG codant pour la glutamine au niveau du codon TAG, qui est un codon d'arrêt et, par conséquent, il a l'arrêt de la synthèse des protéines. Tout cela est dû à la substitution d'une cytosine par une thymine, dont le résultat final est la terminaison prématurée de la traduction de la chaîne protéique, responsable d'un phénotype d'une β-thalassémie homozygote [Orkin et Goff, 1981].

La mutation non sens du codon 39 (C> T) est très répandue en Algérie avec une fréquence de 25, 94%, 27,6% [Barragan *et al.*, 2006] et est plus fréquente dans l'ouest et diminue dans le centre elle peut être prédominante dans l'Est [Tadmouri et Basak, 2001].

Dans notre étude cette mutation représente 84,21% des allèles bêta thalassémiques. Sa distribution en Algérie est en relation avec la présence des

Romain qui a duré pendant plus de cinq siècles en Afrique du Nord avec ses deux principaux pôles d'entrée, l'Espagne de l'ouest et l'Italie à l'est. Au Maroc, elle représente la mutation la plus fréquente (26.2%) [**Lemsaddek et al., 2004**].

Cette lésion moléculaire est une mutation de la méditerranée occidentale éventuellement une origine romaine, ayant son plus haut dans le monde entier la prévalence en Sardaigne, où elle est associée à neuf différents haplotypes [**Pirastu et al., 1987**]. Sa distribution dans le monde arabe est plus ou moins conforme à la règle de l'Empire romain, qui a prolongé jusqu'à le Ve siècle [**Agouti et al., 2008**; **El-Latif et al., 2002**; **Haj Khelil et al., 2010**; **Makhoul et al., 2005**]. Ce dernier a conduit Haj Khelil et ses collègues de suggérer une possible origine locale de cette mutation en Afrique du Nord [**Haj Khelil et al., 2010**].

La mutation IVS-I-110 G> A, bien que cette mutation a été découverte en 1981 [**Spritz et al., 1981** ; **Westaway et Williamson, 1981**] et est provoquée par le remplacement d'une guanine par l'adénine dans la séquence consensus, située dans le premier intron du gène β -globine de 19 nucléotides loin du site d'épissage AG. Le résultat de la substitution est l'activation d'un site cryptique d'épissage qui provoque à son tour un défaut dans la reconnaissance de la région de jonction exon / intron [**Orkin et al., 1982**]. Le dinucléotide AG, formé à la suite de la mutation, en concurrence avec la normale, en elle-même identique; mais que ce qui a changé favori, ce qui entraîne la transformation anormale de 80% de pré-ARNm [**Husman, 1993**] et la production de molécules d'ARNm anormaux et instable, en une quantité quatre fois plus élevés que les cellules normales. La pathologie résultant est la β -thalassémie sévère, [**Denmat, 1997**], qui, dans une des conditions homozygotes ou hétérozygotes pour d'autres défauts associés au gène de la β -globine, pourrait provoquer à la fois la plus grande que la β -thalassémie intermédiaire [**Asano et al., 1999**].

Cette mutation est dominante dans la partie centrale et orientale du pays. Elle est la plus fréquemment observée en Grèce [**Kattamis et al., 1990** ; **Boussiou et al., 2008**], et presque seule au Liban [**Makhoul NJ, et al. 2005**]. Elle est également présent en Tunisie [**Fattoum et al., 2004** ; **Chouk et al., 2004**], mais exceptionnelle au Maroc. Elle est apparu, par conséquent, à coïncider avec le Empire Ottoman diffusion [**Perrin et al., 1998**].

L'analyse de l'ADN de cet enfant par la méthode de miniséquençage du gène *HBB* a permis d'identifier la présence de deux mutations différentes, une mutation du codon 39 C>T sur un allèle et une autre mutation IVS-1-110 G>A sur l'autre allèle. Electrophérogramme de ce patient montre un pic pour codon 39 (C> T) et un pic pour IVS-I-110 (G>A) mutation à l'état hétérozygote composite. Ce patient a un frère qui est hétérozygote pour cette mutation.

Dans des conditions de homozygotie, d'un point de vue clinique, ce changement semble être prédominant dans les cas de beta-thalassémie majeure; Au contraire, en cas d'hétérozygotie, ils ont été détectés des symptômes cliniques plus ou moins différents à la fois de la beta-thalassémie majeure, associés à la co-héritage avec IVS-I-110 G> A, et autre fois celui de la beta-thalassémie intermédiaire, associée à IVS- I-6 T> C [Le Rigoli *et al.*, 2001]. En outre, cette mutation a également été trouvée en association avec HbC et HbE [Husman, 1993].

La mutation IVS-I-110 a été trouvée associée à un seul l'haplotype RFLP (haplotype I) au Liban, dans les territoires palestiniens et en Tunisie, à Chypre [El-Latif *et al.*, 2002 ; Filon *et al.*, 1994; Flint *et al.*, 1993; Makhoul *et al.*, 2005]. L'haplotype I est aussi le prédominant de deux haplotypes vus en Egypte, Le Maroc et l'Algérie [Flint *et al.*, 1993 ; Haj Khelil *et al.*, 2010]. IVS-I-110 est associée à quatre haplotypes RFLP (I, II, IV et IX) en Turquie, suggérant qu'il pourrait être originaire de Turquie (Anatolie), probablement période néolithique, puis propagée à d'autres parties Méditerranée orientale et en Afrique du Nord par Grecs, Phéniciens ou plus tard par Othmans [Haj Khelil *et al.*, 2010; Tadmouri *et al.*, 2001; Tadmouri et Gulen, 2003]. Les haplotypes séquentiels ont soutenu ces dernières suggestions puisqu'il a été trouvé que IVS-I-110 était associé avec six haplotypes en Turquie, deux au Liban, deux en Algérie et en Tunisie [Haj Khelil *et al.*, 2010; Perrin *et al.*, 1998; Tadmouri *et al.*, 2001; Zahed *et al.*, 2002].

II.6. Identification des mutations rares du gène *HBB* par la méthode de Sanger (séquençage direct)

Deux mutations rares sont identifiées par un séquençage génomique. La mutation codon 54(-T) (c.165delT) présente dans 26% des chromosomes séquencés et la mutation du codon 27 (G>T) (Hb Knossos) est de 2,63%. En raison de leur

importance clinique et géographique, ces deux mutations rares sont présentées en détail.

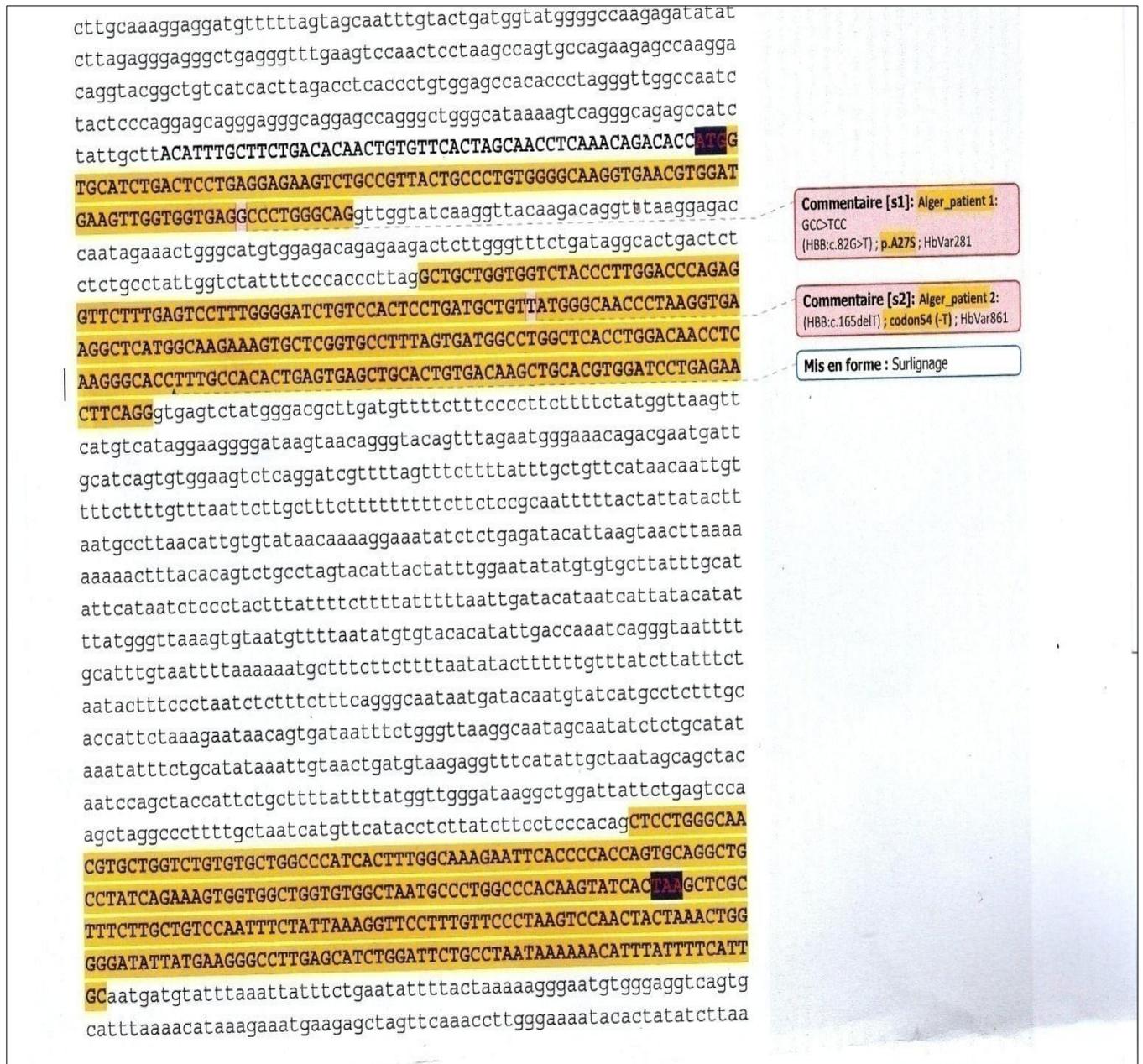


Figure 37. Séquence d'ADN du gène β -globine humaine, y compris la localisation des deux mutations rares détectées.

II.6.1. Identification de la mutation codon 54(-T) (c.165 delT)

L'échantillon de sang est d'un garçon de 8 ans atteint de la β -thalassémie modérée, et il présente une anémie microcytaire hypochrome qui conduit à un ictère, une légère hépato splénomégalie et sans os évident expansion de la moelle

osseuse , en plus des autres signes cliniques et qui s’expriment par un faciès thalassémiques . L'analyse hématologique du révèle Hb de 8,1g / dl, GR= 3,8(10⁶ /mm³) , GB= 6,9(10³ /mm³), plaquettes = 246 (10³ /mm³), VGM= 65fl, TCMH= 24 ,8 pg, avec Hb A2= 5% et HbF = 58%

Le frottis sanguin de ce patient a montré une anisocytose avec tendance microcytaire, hypochromie et une présence de nombreux annulocytes.

Après séquençage direct, l’ADN du patient a montré la présence de la mutation du codon 54(-T) (**Fig.38**). C’est la deuxième famille algérienne qui présente cette lésion moléculaire d’après (<http://globin.cse.psu.edu>) et [**Landin et Berglund , 1996**].

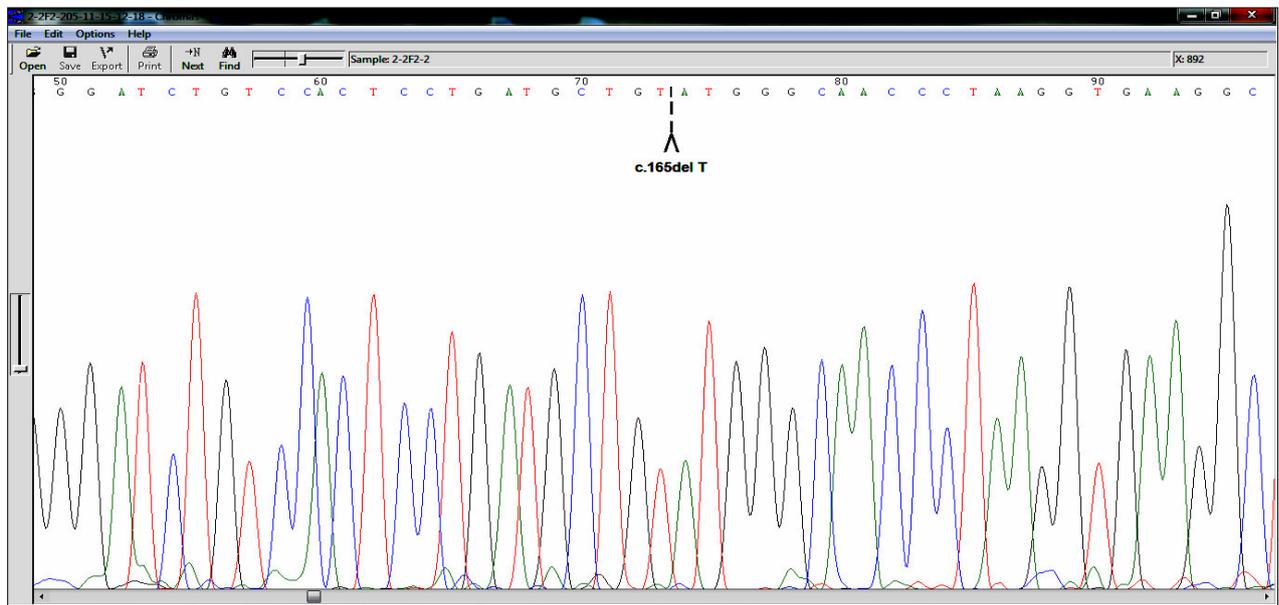


Figure 38. Une partie d’électrophérogramme obtenu par séquençage de l’ADN génomique provenant du patient beta-thalassémique homozygote montre la présence de la mutation Codon 54(-T) (c.165delT)

D’après **Landin et Berglund [1996]**, la délétion de T du codon 54 conduit à un décalage de cadre avec un codon non-sens au codon 60 (TGA) et à la terminaison prématurée de la traduction. La séquence nucléotidique:

GGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGT **[T]** ATGGGCAACCCTAAGGTGAAG
GTC

La mutation du codon 54 (-T); modifié la séquence C-terminal: (54) Val-Trp-Ala-Thr-Leu-(59)Arg-COOH

Tableau 13. Les paramètres hématologiques d'un patient qui présente la mutation du codon 54 (-T) à l'état hétérozygote d'après **Landin et Berglund [1996]**

Présentation clinique	Paramètres hématologiques
Hétérozygote	<ul style="list-style-type: none"> • Hb 9.5 - 12.3 g/dL • Hb A2 5.1 - 6.2 % • MCV 58 - 66 fL • Reticulocytes 56 - 69 10⁹/L

Une étude décrit une très rare mutation génique de la β-globine, le codon 54 (-T) (*HBB*: c.165delT), dans une famille du nord de l'Iran. Le séquençage nucléotidique de l'ADN amplifié obtenu à partir d'un homme de 28 ans révèle une délétion (-T) au codon 54 du gène de la β-globine qui se traduit par une séquence non-sens au niveau du codon 60 et une terminaison en phase au codon 59. Il s'agit du deuxième article relatant la mutation du codon 54 dans le monde et le premier rapport de cette mutation dans la population iranienne [**Nadia- Ghasemian et al., 2015**].

II.6.2. Identification d'une nouvelle association de l' Hb Knossos avec la mutation du codon 39 (C> T) dans la population algérienne

Nous avons constaté ce variant de l'hémoglobine en association avec la mutation du codon 39 (C> T) chez un patient d'originaire de la région de Batna. Le proband était un garçon de 13 ans, lorsqu'il était étudié pour la première fois. Il a été référé à cause de l'anémie microcytaire hypochrome. L'analyse hématologique du révèle Hb 7,2 g / dl; GR= 2,9 10⁶ /mm³ GB= 6,6 10³ /mm³, PLT= 226 10³ /mm³, VGM = 71,1 fl, TCMH= 25pg. L'électrophorèse d'hémoglobine en milieu alcalin montre Hb A2= 4 % HbF= 65% et le frottis sanguin confirme une microcytose hypochromie, et montrant la présence de nombreux dacryocytes avec une hyper éosinophilie. Aucune Hb anormale n'a été détectée par électrophorèse Capillarys en milieu alcalin.

L'exploration moléculaire, nous a permis d'identifier la présence de deux mutations différentes sur les deux allèles. Nous avons conclu que cet enfant est doublement hétérozygote pour un génotype. L'analyse d'ADN par la méthode de miniséquencage du gène *HBB* a révélé la mutation du codon 39(C> T) et le séquençage direct de l'ADN a révélé une seconde mutation au niveau du codon 27 de l'exon 1 avec GCC> TCC (*HBB*: c.82G> T) c'est la substitution du G par T à la position nucléotidique 82 (**Fig.39**). Ce changement a été identifié comme *HBB*: c.82G> T, connu sous le nom Hb Knossos dans la base de données HbVar.

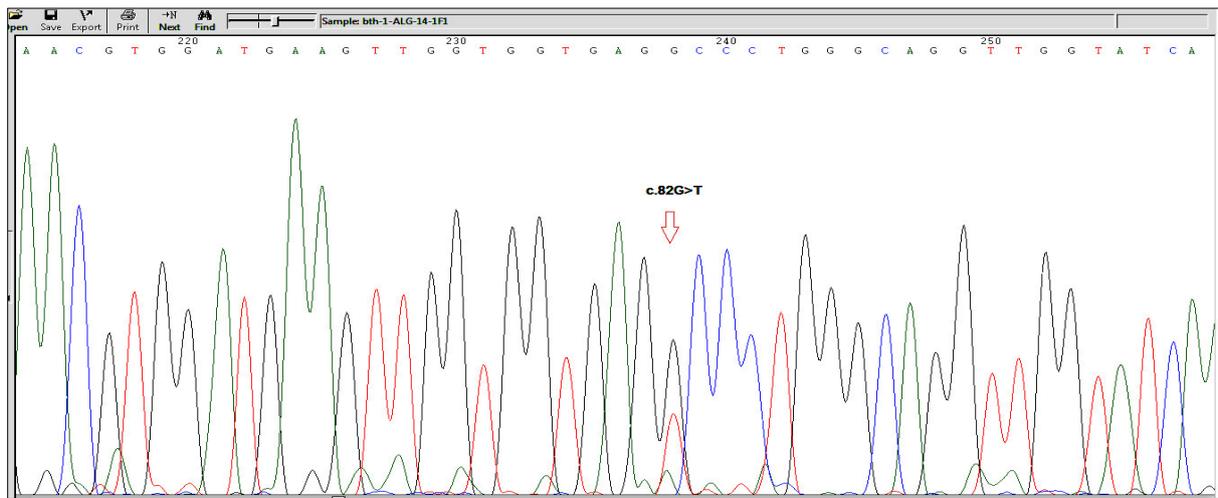


Figure 39. Une partie d'électrophérogramme obtenu par séquençage de l'ADN génomique provenant d'un enfant beta-thalassémique montre la présence de la mutation c.82G>T (Hb Knossos) à l'état hétérozygote.

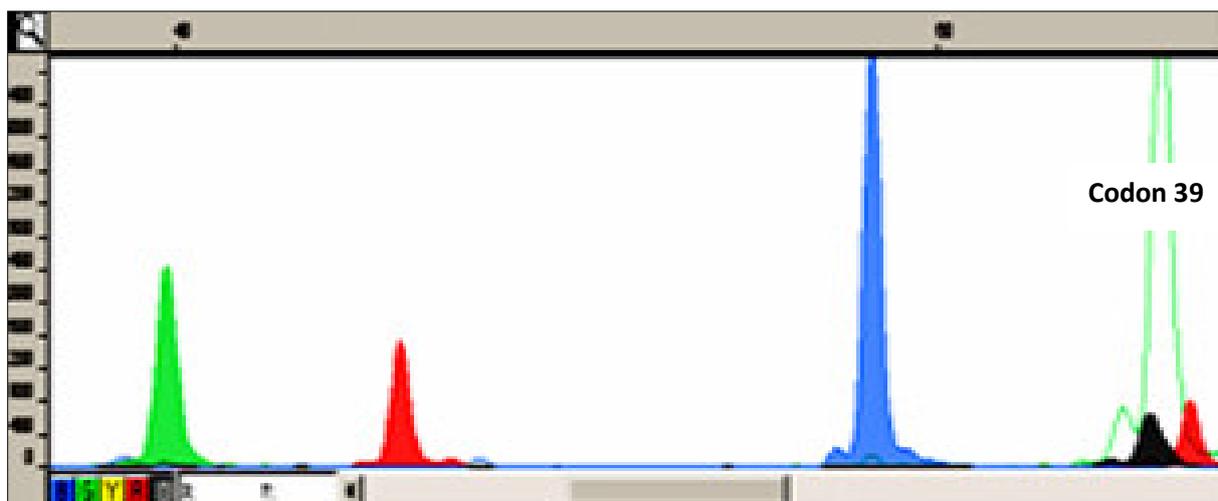


Figure 40. Electrophérogramme montre un pic pour codon 39 (C> T) mutation à l'état hétérozygote.

Depuis la première description de l'hémoglobine Knossos dans une famille grecque en 1982, comme variante silencieuse β -thalassémie, cette variante Hb a été observée dans d'autres familles d'origine méditerranéenne (Turquie, Egypte, Algérie, Chypre). Il a été trouvé en association avec d'autres mutations de thalassémie: codon 8, IVS-I-1, IVS-I-6 et IVS-I-110, ainsi qu'en combinaison avec Hb S et Hb Lepore [Stanojevic *et al.*, 2006].

Cette hémoglobine a également été découverte à l'état hétérozygote dans deux familles algériennes [Rouabhi *et al.*, 1983 ; Morlé *et al.*, 1984], et une famille de l'Ouest français Indes [Galacteros *et al.*, 1984]. Le premier cas homozygote du Hb Knossos était signalé dans le nord-est de l'Algérie [Baklouti *et al.*, 1986]. Parmi les pays arabes, Hb Knossos a été identifié plus tard en Égypte [Olds *et al.*, 1991], la Tunisie, la Jordanie et la bande de Gaza avec une fréquence varie entre 0,1% et 3,3% des allèles totaux [Zahed , 2001].

D'après [Phaedon *et al.*, 1986], il devient certain que l'anomalie de Hb Knossos provoque un syndrome relativement modeste de β -thalassémie intermédiaire lorsqu'elle est associée à un gène classique de la β -thalassémie. L'hémoglobine Hb Knossos, en raison de l'interaction de cette mutation avec un gène de β - globine. Pourtant, les patients sont en bon état clinique malgré leur taux d'hémoglobine extrêmement faible (6-7 g / dl habituellement). Ils ont proposé que l'affinité faible en oxygène de Hb Knossos contribue significativement à la douceur du tableau clinique [Papasotiriou *et al.*, 1983]; Une indication similaire dérive également à partir de l'étude des Hb Knossos / Hb Lepore composés hétérozygotes [Morlé *et al.*, 1984]. Les paramètres hématologiques sont: anémie hypochromique marquée avec des indices très microcytaires. Ces altérations sont confirmées par les globules rouges à morphologie caractérisée par une poikilocytose frappante et une microcytose; ils donnent l'impression d'être causés par une fragmentation extensive des érythrocytes. Les réticulocytes ne sont que légèrement augmentés ou pas du tout associés à l'hémoglobine déficit [Phaedon *et al.*, 1986].

II.7. Effets des mutations du gène *HBB* sur les variations des paramètres biologiques de nos patients avant toute transfusion et sur l'aspect cytologique des hématies

II.7.1. Effets des mutations du gène *HBB* à l'état homozygote sur les variations des paramètres biologiques de nos patients avant toute transfusion

Tableau 14. Effets des mutations du gène *HBB* à l'état homozygote sur les variations des paramètres biologiques

Nom de la mutation du gène <i>HBB</i>	GR (10 ⁶ /mm ³)	GB (10 ³ /mm ³)	PLT (10 ³ /mm ³)	VGM (fl)	TCMH (pg)	Hb totale (g/dl)	Hb A2 %	Hb F %	Ferritine (ng/ml)
Homozygote : Codon 39 (C>T)	3,220 ±0.2778**	12,4±11***	390,9±141.1***	60,80 ± 2.014***	18,47 ± 0.6023***	3,0±0.9***	5 à 9	58 à 93,3	>2000
Hétérozygote composite : IVS-1-110 (G>A)- Codon 39 (C>T)	3,4580	10, 84	366	63,53	19,85	5,1	8	87,5	>2000
Hétérozygote composite : Codon 27 - (G>T)- Codon 39 (C>T)	2,9	6,6	226	71,1	25	7,2	4	65	>2000
Homozygote : Codon 54(-54)	3,18	6,9	246	65	24,8	8,1	5	58	>2000

Différentes mutations dans un même gène peuvent produire des phénotypes cliniques très différents. En d'autres termes, l'hétérogénéité génétique à un locus donné (hétérogénéité allélique) est souvent responsable de l'hétérogénéité clinique. Une illustration dramatique de ce point est donnée par les mutants de structure de la β-globine. Les présentations cliniques des mutations sont tellement différentes que, du point de vue cliniques, il n'est pas toujours évident qu'elles touchent une seule et même protéine. Une partie de la variabilité de la présentation clinique reflète la propriété spécifique de la protéine qui a été perturbée (par exemple, la fonction de liaison de l'oxygène de l'hémoglobine dans les polycythémies c'est-à-dire une augmentation significative de la quantité totale d'érythrocytes circulants).

D'après le tableau (14) les enfants beta-thalassémiques homozygotes pour la mutation du codon 39 présentent les mêmes signes cliniques (hypogonadisme, Hypothyroïdisme, Hématopoïèse extra médullaire) ainsi une anémie sévère avec une microcytose, une hypochromie. En outre une hyperleucocytose, une thrombocytose.

Ces résultats sont semblables que chez le patient qui présente un génotype composite IVS-I-110 (G>A)- Codon 39 (C>T).

Évidemment, le patients hétérozygote composite pour la mutation du codon 27 -(G>T)/ codon 39 présente une anémie sévère, une hypochromie microcytaire mais ces paramètres biologiques sont moins sévères par rapport à ceux des patients qui présentent la mutation du codon 39(C>T).

Le patient homozygote de la mutation du codon 54(-T) est caractérisé par des manifestations anémiques modérées, une tendance microcytaire, hypochromie. Cette mutation relativement sévère par rapport aux autres mutations et qui est intermédiaire dans la gravité de la maladie. Une différence significative a été observée sur la sévérité de la maladie entre la mutation du codon 39 avec les trois autres mutations du gène de la β -globine. En tenant compte des résultats de cette recherche.

Le principal déterminant de la gravité de la maladie est le degré de déficit en chaîne β -globine résultant de la nature des allèles β -thalassémie. Comme le phénotype est en corrélation avec la déficience en chaîne de β -globine et le déséquilibre amélioré de la chaîne α / non- α , un taux résiduel accru de HbF dans la vie adulte compense la diminution de la chaîne β -globine, donc un déterminant majeur de la gravité de la maladie [El-Kamah, *et al.*, 2009 ; Thein *et al.*, 2009].

La diversité des mutations et la variable consécutive degré de déséquilibre de la chaîne des globines sont les principaux déterminants pour des phénotypes plus doux, la coïncidence d'homozygotie ou hétérozygotie composée pour la β -thalassémie. Les allèles étant responsables d'une production de chaînes β à partir du locus de β -globine affecté. Cependant, une grande partie de la variabilité phénotypique expliqué par d'autres déterminants génétiques capables de réduire le déséquilibre α / non α -chaîne entraînant ainsi un degré moindre d'une précipitation en chaîne [Cao *et al.*, 1994].

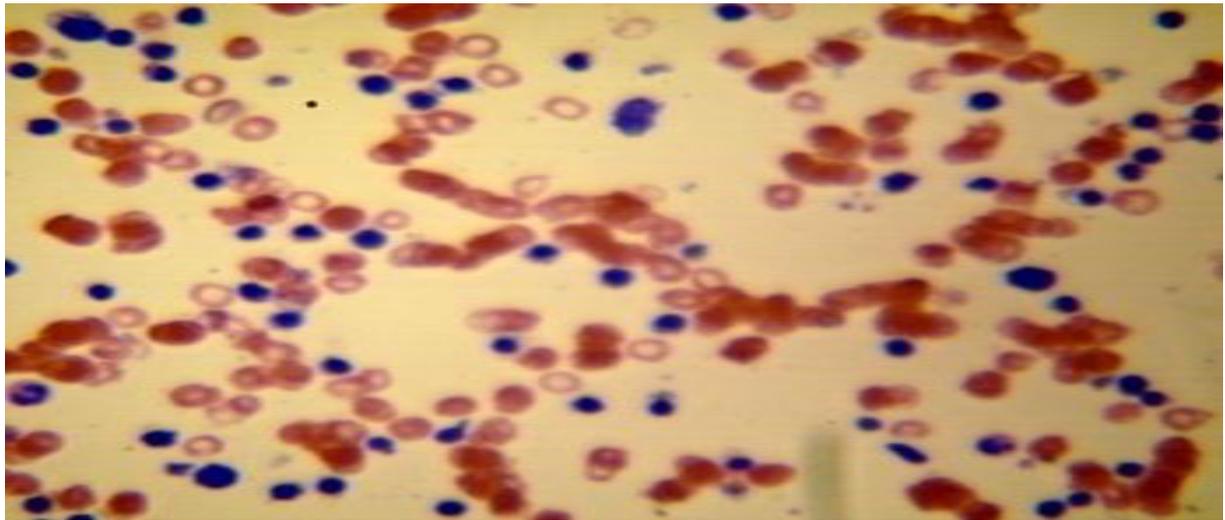
II.7.2. Effets des mutations du gène *HBB* sur l'aspect cytogique des hématies

Figure 41. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote présente de la mutation codon 39 (C>T) montrant la présence des érythroblastes basophiles et érythroblastes acidophiles, une augmentation du taux des plaquettes et des leucocytes avec des hématies hypochromes microcytaires. (Coloration de Wright : 40×100).

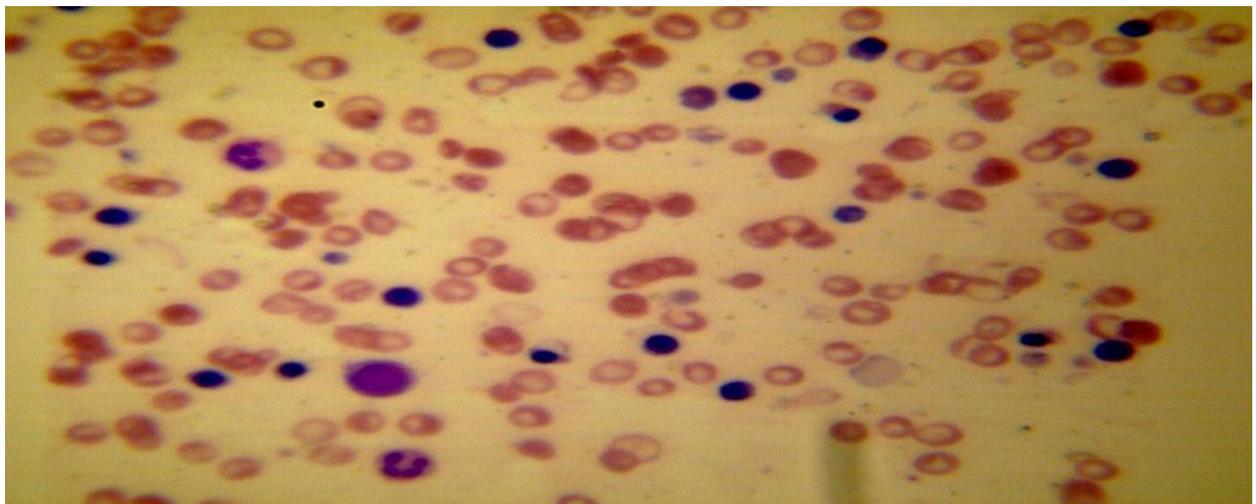


Figure 42. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote présente de la mutation hétérozygote composite IVS-I-110 (G>A)- Codon 39 (C>T) montrant la présence d'érythrocytes anormalement petits, une augmentation du taux des plaquettes et des leucocytes avec des hématies hypochromes microcytaires. (Coloration de Wright : 40×100).

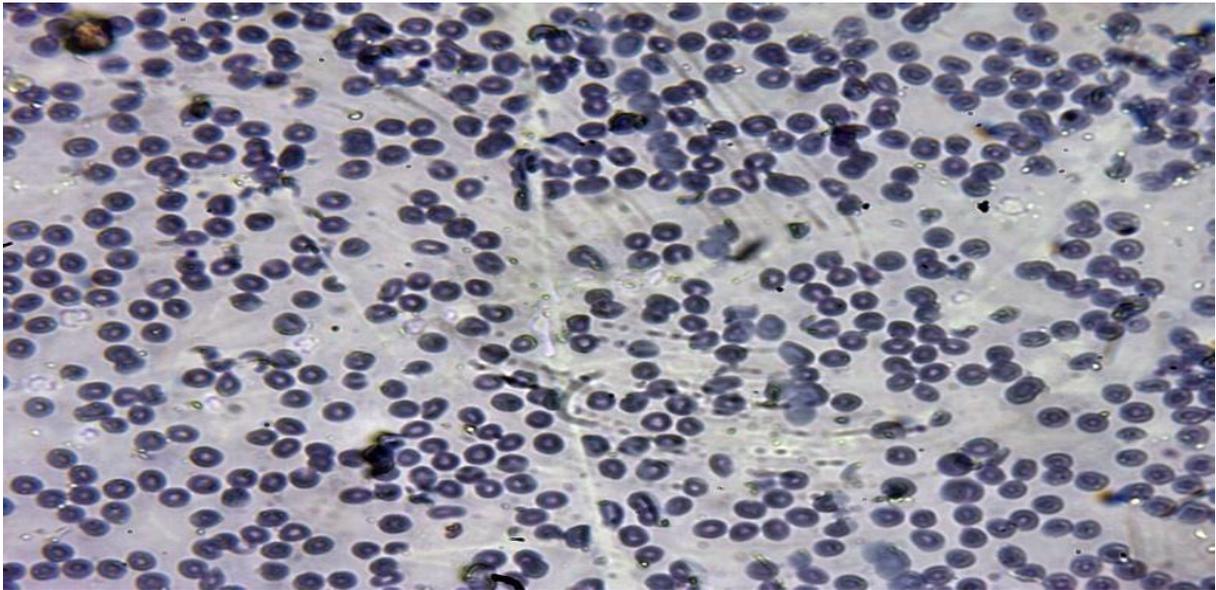


Figure 43. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote présente une association de l' Hb Knossos avec la mutation du codon 39 (C> T) montrant une microcytose hypochromie, une présence de nombreux dacryocytes avec une hyper éosinophilie. (Coloration de Wright : 40×100).

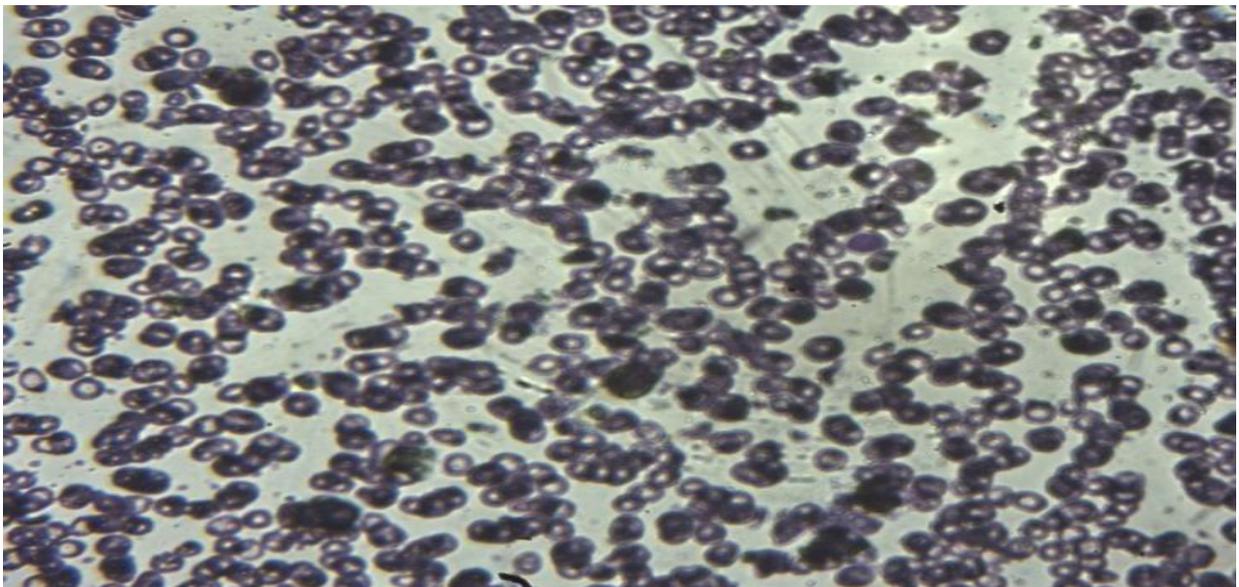


Figure 45. Photo-lame d'un enfant beta-thalassémique homozygote présente de la mutation Codon 54(-T) (c.165delT) montre une anisocytose avec tendance microcytaire, hypochromie et une présence de nombreux annulocytes. (Coloration de Wright : 40×100).

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de chaque mutation détectée sur l'aspect cytologique des hématies. A partir des observations microscopiques des frottis sanguins de nos patients, on a constaté que les mutations peuvent être à l'origine de modification d'intensité variable du phénotype macroscopique.

L'examen des frottis sanguins du sang périphérique de nos patients montre une anisopoikilocytose et une hypochromie microcytaire chez tous les patients mais chaque mutation est caractérisée par une morphologie spécifique des hématies.

Tant que la mutation du codon 39 (C>T) est la plus sévère par rapport aux autres mutations, on a détecté des modifications morphologiques de microcytose, hypochromie, anisocytose, poikilocytose (spiculée larme et cellules allongées) des hématies avec la présence des érythroblastes basophiles et érythroblastes acidophiles (globules rouges nucléés) en outre une augmentation du taux des plaquettes et des leucocytes (**Fig.41**). Ce sont les mêmes aspects morphologiques sont observées dans la mutation hétérozygote composite IVS-I-110 (G>A)- Codon 39 (C>T) (**Fig.42**).

Alors que l'association de l' Hb Knossos avec la mutation du codon 39 (C> T) montrant une microcytose hypochromie, une présence de nombreux dacryocytes avec une hyper éosinophilie(**Fig.43**).

Enfin la mutation codon 54(-T) (c.165delT) montre une anisocytose avec tendance microcytaire, hypochromie et une présence de nombreux annulocytes (**Fig.44**).

Malheureusement l'absence de recherches sur les effets des mutations du gène *HBB* sur l'aspect cytologique des hématies que pour l'Hb Knossos ou les paramètres hématologiques sont uniformes: anémie hypochromique marquée avec des indices très microcytaires. Ces altérations sont confirmées par la morphologie des hématies qui sont caractérisées par une poikilocytose frappante et une microcytose; ils donnent l'impression d'être causés par une fragmentation extensive des érythrocytes. Les réticulocytes ne sont que légèrement augmentés ou pas du tout liés au déficit de l'hémoglobine [**Phaedon, 1986**].

Les patients β -thalassémiques sont caractérisés par la présence de différents degrés et types de poikilocytose qui pourrait être liée à la gravité de l'état clinique de la patients [**Weatherall, 2001**]. L'état poikilocytaire signalé chez les patients β -

thalassémiques qui conduisent à des troubles hémodynamiques, les globules rouges déformés aggravent les conditions cliniques des patients, mais ils ont suggéré que l'amélioration des propriétés rhéologiques des traitements de la thalassémie [**Chen et al., 1996**].

D'après [**Gauravi et al., 2014**], les frottis sanguins des patients beta thalassémiques homozygotes montrent une anémie modérée à sévère, le volume globulaire moyen et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine sont réduits. Un degré marqué d'anisopoikilocytose est évident avec des globules rouges microcytaires hypochromiques avec peu de cellules en forme de crayon. Cellules cibles et de nombreux globules rouges nucléés sont visibles [**Galanello et Origa, 2010**].

Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude, on a pu montrer que la beta-thalassémie résulte d'un mécanisme d'altérations fonctionnelles du gène *HBB* qui conduit à la production réduite de l'hémoglobine. Cette maladie est essentiellement due un grand nombre de mutation du gène de la beta-globine, elle est caractérisée par une anémie sévère, Celle-ci se traduit à l'âge de diagnostic par une pâleur, ictère, fatigue, abdomen très volumineux et une déformation osseuse. L'anémie s'accompagne par des complications d'endocrinopathies diverses (l'hypogonadisme et l'ostéoporose, déficit en GH.....). Selon la gravité de l'anémie, les premiers signes vont apparaître dans la petite enfance (entre 6 et 12 mois) ou plus tardivement.

Cette pathologie est très rare dans la région de Batna. D'après les résultats obtenues on a constaté que cette maladie est une anomalie de l'enfant que tous nos patients avaient un âge inférieur a 15ans, elle est a dominance masculine. Par ailleurs tous les paramètres biologiques étudiés ont révélé des différences significatives entre les patients et les témoins.

Le diagnostic moléculaire repose sur la recherche des mutations du gène *HBB*. Dans notre étude, nous avons utilisé la technique de miniséquençage comme une rapide procédure de diagnostic génotypique ce qui nous a permis d'identifier les quatre mutations génétiques les plus fréquentes du gène *HBB* dans la population algérienne. Tandis que le séquençage direct par la méthode de Sanger de l'ADN afin de détecter les mutations rares.

Nos données ont révélé la prédominance de la mutation du codon 39 (C> T) du gène *HBB* dans la région de Batna, malgré l'hétérogénéité des mutations de la beta-thalassémie dans la population algérienne. Quatre mutations différentes ont été identifiées dans la population de la wilaya de Batna. La mutation du codon 39 (C> T) est la plus fréquente dans notre province, suivie par la mutation du codon 54 (- T), et une première association de Hb Knossos: codon 27 (G> T) avec le codon 39 (C> T) dans notre population algérienne. Nous avons également détecté l'association du codon 39 (C> T) avec la mutation IVS-I-110 (G> A).

Nos résultats ont contribué à démontrer les mutations prédominantes qui pourraient être recherchées en premier lieu dans le cas d'un diagnostic moléculaire. Nous construisons une base de données pour les différents types de mutations β -thalassémie en Algérie.

Nous proposons également d'éviter les mariages consanguins qui favorisent l'apparition des maladies génétiques à transmission autosomique récessive. Ainsi que le conseil génétique est recommandé pour que les couples à risque puissent faire un choix éclairé entre les différentes options dont celle du diagnostic prénatal.

Par ailleurs, nous promouvons les efforts de recherche scientifique qui mettent l'accent sur l'utilisation des outils moléculaires modernes pour le diagnostic génétique.

Références

- Abed mahdi Elham. (2014).** Relationship between oxidative stress and antioxidant status in beta thalassemia major patients. *Acta Chim Pharm. Indica*, 4(3).
- Addour N.B., Zidani N., Carion N., Labie D., Belhani M., Beldjord C., (2009).** Molecular heterogeneity of β -thalassemia in Algeria: how to face up a major health problem. *Hemoglobin*, 33 (1):24-36.
- Adib-Hajbaghery M. et Ahmadi M. (2015).** Health Related Quality of Life, Depression, Anxiety and Stress in Patients with Beta-Thalassemia Major. *Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 5(4): 193–205.
- Aessopos A., Kati M., and Meletis J. (2007).** Thalassemia intermedia today: should patients regularly receive transfusions? *Transfusion*. 47(5):792-800.
- Agouti I., Badens C., Abouyoub A., Levy N., Bennani M. (2008).** Molecular basis of beta-thalassemia in Morocco: possible origins of the molecular heterogeneity. *Genet Test*, 12:563-568.
- Aguilar Martinez P. (2007).** Diagnostic d'une hémoglobine instable. Diagnostic moléculaire. *Congrès Tuniso-français. Tunis*; p. 6-7.
- Alain J. et Marengo-Rowe. (2007).** The thalassemias and related disorders. *Proc Bayl Univ Med Cent*). Jan, 20(1): 27–31.
- Al-Ali AK., Al-Ateeq S., Imamwerdi BW., Al-Sowayan S., Al-Madan M., Al-Muhanna F., Bashaweri L., Qaw F. (2005).** Molecular bases of beta-thalassemia in the Eastern Province of Saudi Arabia. *J Biomed Biotechnol*, 45:322–325.
- Al-Riyami A. Z., Al-Mahrooqi S., Al-Hinai S., et al. (2014).** Transfusion therapy and alloimmunization in Thalassemia Intermedia : A 10 year experience at a tertiary care university hospital. *Transfusion and Apheresis Science*, 51, (11): 42-46.

Amato Antonia., Giordano Piero. (2009). Screening and genetic diagnosis of hemoglobinopathies in Southern and Northern Europe: two examples. *Blood revue*, 1(1).

Anderson LJ., Wonke B., Prescott E., Holden S., Walker JM., Pennell DJ. (2002). Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. *Lancet*, 360:516–20.

Andersson B.A., Wering M.E., Luo H.Y., Basran R.K., Steinberg M.H., Smith H.P., Chui D.H. (2007). Sickle cell disease due to compound heterozygosity for Hb S and a novel 7.7-kb β -globin gene deletion. *Eur JHaematol*, 78: 82–85.

Angelopoulos N.G., Goula A., Rombopoulos G., Kaltzidou V., Katounda E., Kaltsas D., Tolis G. (2006). Hypoparathyroidism in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia. *J Bone Miner Metab*, 24(2):138-45.

Anguilar Martinez P., Badens C., Bonnelo-Palot N., et al.(2010). Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Annal Biol Clin*, 68(4):455-64.

Annaix V., Thuillier A. (2000). Hématologie: Pharmacie-Biologie- Préparation de l'internat-Enseignement post-universitaire. *Tome 3, 2e édition*.

Asadi Pooya., Ali Akbar, Doroudchi Mehrnoosh. (2004). Thalassemia major and consanguinity in Shiraz city, *Iran Turk J Haematol*, 21(3): 127-130.

Asano H., Li XS., Stamatoyannopoulos G. (1999). FKLf: un facteur de romanescque Kruppel Ce d'ingrédients actifs embryonnaires humains et des gènes de globine bêta-like fœtales. *Mol Cell Biol*, 19 : 3571-3579.

Badens C., Thuret I., Lena-Russo D. (2000). Les syndromes thalassémiques. *Elsevier. paris*, 5 : 324.

Baklouti F., Dorléac E., Morlé L., Laselve P., Peyramond D., Aubry M., et al. (1986). Homozygous hemoglobin Knossos ($\alpha 2 \beta 2 27(B9) Ala \rightarrow Ser$): a new

variety of beta -thalassemia intermedia associated with delta (0)-thalassemia. *Blood*, 67:957 – 61.

Barragan E., P Bolufer, Maria LP., F Prieto., Miguel. A. S., (2006). Molecular detection of Spanish $\delta\beta$ -thalassemia associated with β -thalassemia During prenatal appropation diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, 368: 195-198.

Baysal E. (2001). Hemoglobinopathies in the United Arab Emirates. *Hemoglobin*, 25:247-253.

Baysal E., Indrak K., Bozkurt G., Berkalp A., Aritkan E., Old J.M., Ioannou P.,Angastiniotis M., Droushiotou A., Yuregir GT. (1992). The beta-thalassaemia mutations in the population of Cyprus. *Br J Haematol*, 81:607–609.

Bedir Leila. et Miloudi Radia. (2005). Prévalence de la thalassémie dans la wilaya d'ElOued. *Mémoire de magister en Biologie*, 35.

Belhadi K. (2011). Etude des hémoglobinopathies dans la population de la région de Batna. *Mémoire de magister en Biologie, Université de Batna 2*, 25.

Belhani M. (2009). Epidémiologie de la beta thalassémie homozygote en Algérie. *Revue algérienne de l'hématologie*, Septembre: n°1, 22.

Belhani M., (2012). *Revue Santé-Mag*, n° 03 Février, 9.

Bellis G., C Valentin., Glavce C., Popescu I., Ciovica C., Vladareanu F., Gerard N., Krishnamoorthy R., De Braekeleer M. (2001). Genetic population of thalassemia in Sicily and Algeria - data compared to Romania. *Antropo*, 1-5.

Bennani C., Tamouza R., Rouabhi F., et al. (1993). The spectrum of β -thalassemia in Algeria: Possible origins of the molecular heterogeneity and a tentative diagnostic strategy. *Br J Haematol*, 84(2):335–337.

Beris P., Darballay R., Extermann P. (1995). Prevention of beta-thalassemia major and Hb Bart's hydrops fetalis syndrome : *Semin Hematol*, 32 : 244-61.

Beris P., Kitundu MN., Baysal E., et al . (1991). Black beta-thalassemia homozygous with specific sequence variations in the 5' hypersensitive site-2 of the locus control region have high levels of fetal hemoglobin. *Am J Hematol*, 41: 97-101.

Bernard J., Lévy J.P., Bruno V., Pierre Clauvel J., Didier Rain J ., Yvette S. (1998). *Revue d'Hématologie*, 9^e édition .43.

Bibi Shahin Shamsian., Shadi Abdar Esfahani., Hani Milani., Shahram Akhlaghpour., Saeid Mojtahedzadeh., Abdollah Karimi., Ahmad Reza Shamshiri., Samin Alavi., Alieh Safari., Nima Rezaei., Mohammad Taghi Arzanian. (2012).Magnetic resonance imaging in the evaluation of iron overload: a comparison of MRI, echocardiography and serum ferritin level in patients with β -thalassemia major. *Clinical Imaging*, 36: 483–488.

Bieglmayer C., Chan D.W., Sokoll L., et al. (2004) .Multicentre performance evaluation of the E170 module for modular analytics. *Clin Chem Lab Med*, 42:1186–1202.

Blessum C., Jeppsson J.O., Aguzzi F., Bernon H., Bienvenu J., (1999). L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. *Annales de Biologie Clinique*, 57: 6.

Bonello-Palot N. et Badens C. (2010). Bases moléculaires des syndromes thalassémiques et facteurs génétiques modulateurs de sévérité de bêta-thalassémie, *Revue méditerranéenne de génétique humaine*, 1(11) : 1-10.

Borgna-Pignatti C., Rugolotto S., De Stephano P., Zhao H., Cappellini MD., Del Vecchio GC., et al. (2004). Survival and complications in patients with thalassaemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica*, 89: 1187-93.

Borgna-Pignatti C., Vergine G., Lombardo T., Cappellini MD., Cianciulli P., Maggio A., Renda D., Lai ME., Mandas A., Forni G., Piga A., Bisconte MG. (2004). Hepatocellular carcinoma in the thalassaemia syndromes. *Br J Haematol*, 124:114–7.

Boudrahem-Addour N., Zidani N., Carion N., Labie D., Belhani M., Beldjord D . (2009). Molecular heterogeneity of beta-thalassemia in Algeria: how to face up to a major health problem. *Hemoglobin*, 33(1):24-36.

Boussiou M., Karababa P., Sinopoulou K., Tsaftaridis P., Plata E., Loutradi-Anagnostou A. (2008). The molecular heterogeneity of beta-thalassemia in Greece. *Blood Cells Mol Dis*, 40(3):311–319.

Bradai M ., Abad MT., Pissard S., Lamraoui F., Skopinski L., de Montalembert M. (2003). Hydroxyurea can eliminate transfusion requirements in children with severe β -thalassemia. *Blood*, 102: 1529-30.

Bruneteau G., Fenelon G., Khalil A., Kanfer A., Girot R. (2000). Spinal cord compression secondary to extramedullaryhematopoiesis in a patient with thalassemia. *Rev Neurol .Paris*, 156: 510-3.

Bustin S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*,25: 169-193.

Cao A . et Galanello R. (2010). Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine*, 12(2): 61-76.

Cao A., Goossens M., Piratsu M. (1989). Thalassaemia mutations in Mediterranean populations. *Br J Haematol*, 71(3): 309–312.

Cao A., Galanello R., Rosatelli MC. (1994). Genotype-phenotype correlations in beta-thalassemias. *Blood Rev*, 8(1):1-12.

Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. (1998). Le diagnostic prénatal et le dépistage des hémoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol*, 11: 215-238.

Cappellini M.D. (2008). Long-term efficacy and safety of deferasirox. *Blood Rev*, 22, Suppl 2:35–41.

Caroline Thomas. et Andrew B. (2012). Physiology of haemoglobin. Continuing Education in Anaesthesia. *Critical Care & Pain j*, 12 (5): 251.

Carding SR., Lu D., Bottomly KA. (1992). A polymerase chain reaction assay for the detection and quantification of cytokine gene expression in small number of cells. *J.Immunol.Methods*, 151: 277-287.

Casilli F., Di Rocco ZC., Gad S., Tournier I., Stoppa-Lyonnet D., Frebourg T., Tosi M. (2002). Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat*, 20:218–226.

Cavallo L., Gurrado R., Gallo F., Zacchino C., De Mattia D., Tatò L. (1997). Growth deficiency in polytransfused beta-thalassaemia patients is not growth hormone dependent. , *Jun*;46(6):701-6.

Cavazzana-Calvo M., Payen E., Negre O., Wang G., Hehir K., Fusil F., Bas J., Denaro M., Brady T., Westerman K., Cavallesco R., et al. (2010). Transfusion indépendance et HMGA2 activation après la thérapie génique humaine de β -thalassémie. *Nature*, 467 :318-22

Chen S., Eldor A., Barshtein G., Zhang S., Goldfarb A., Rachmilewitz E., Yedgar S., (1996). Enhanced aggregability of red blood cells of beta-thalassemia major patients. *American Journal of Physiology*, 270 (6):1951-1956.

Cher Jps., Lin Kh., Lu My., Lin Ks., Chen Jd., Fu C. (2001). Abnormal glucose tolerance in transfusion dependant beta thalassemia. *Diabetes Care*, 24: 850-854.

Chomarar M., Breyse F. (2011). Technique d'analyse des courbes de fusion haute résolution (FHR) ou High Resolution Melting analysis (HRM) en infectiologie. *Elsevier Masson SAS*, 26 : 207-211.

Chouk I., Ben Daoud B., Mellouli F., et al. (2004). Contribution to the description of the beta-thalassemia spectrum in Tunisia and the origin of mutation diversity. *Hemoglobin* ,28(3):189–195.

Codrington J.F., LiH-W., Kutlar F., Gu L. H., Ramachandran M., Huisman THJ. (1990). Observations on the levels of Hb A2 in patients with different b-thalassemia mutations and a d chain variant. *Blood*, 76: 1246–1249.

Cotton F., Vertongen F., Gulbis B. (2006). Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21 : 45–50.

Couque N., De Montalembert M. (2013). Diagnostic d'une hémoglobinopathie. *Feuillets de Biologie*, 311 : 5-18.

De Girot Robert. (2012). Diagnostic biologique des maladies génétiques de l'hémoglobine. *Journée de Biologie Clinique*, 47.

De Montalembert M. (2002). Syndromes thalassémiques. *Encycl Med Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier. Hématologie*, 13-006-D17.

Denmat C. et Duchassaing D. (1997). Diagnostic rapide des mutations de thalassémie β dans Méditerranéens par PCR et analyse de restriction de sites naturels ou créés. *Clinical Biochemistry*, 30 (5): 433-437.

De Sanctis V., Eleftheriou A., Malaventura C. (2004). Thalassaemia International Federation Study Group on growth and endocrine complications in thalassaemia. Prevalence of endocrine complications and short stature in patients with thalassaemia major: a multicenter study by the Thalassaemia International Federation (TIF). *Pediatric Endocrinology Reviews*, 2(Suppl. 2): 249–255.

De Vernejoul MC., Girot R., Gueris J., Cancela L., Bang S., Bielakoff J., et al. (1982). Calcium phosphate metabolism and bone disease in patients with homozygous thalassaemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 54: 276-281.

Donze D; Townes T.M; Bieker J.J. (1995). Role of erythroid Krüppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*, 270: 1955-9.

Drefys B., Janine BG., Reyes F., Rochant H., Rosa J and Vernant JP. (1992). L'hématologie de Bernard Drefys, 3ème éd. Paris : Flammarion Médecine-Sciences :147.

Edward F Chang., Catherine P Claus, Hendrik J Vreman., Ronald J Wong., Linda J Noble-Haeusslein. (2005). Heme regulation in traumatic brain injury: relevance to the adult and developing brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25:1401–1417

Efremov GD. (2007). Dominantly Inherited beta-Thalassaemia. *Hemoglobin*, 31(2):193-207.

El-Latif MA., Filon D., Rund D., Oppenheim A., Kanaan M.(2002). The beta+ IVS-I-6 (T->C) mutation accounts for half of the thalassemia chromosomes in the Palestinian populations of the mountain regions. *Hemoglobin*, 26:33-40.

EL Sayed Salah Mohamed., Abou Taleb Ashraf., Mahmoud Hany Salah., et al.(2014). Percutaneous excretion of iron and ferritin (through Al-hijamah) as a novel treatment for iron overload in beta-thalassemia major, hemochromatosis and sideroblastic anemia. *Medical Hypotheses*,.83:238-46.

Eleftheriou Androulla. (2007). À propos de la thalassémie, *Fédération internationale de la thalassémie*, 170.

El-Kamah G Y., Hosny L. A., Sobh H. A. (2009). Exploring Phenotypic Alterations in Response to High Hemoglobin F Level in Egyptian Beta Thalassemia Patients. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(10).

Erlich H.A. Ed., IR., (1989). PCR technology: principles and applications for DNA amplification. *Press at Oxford Univ. Press, Oxford, UK*.

Fattoum S., Messaoud T., Bibi A. (2004). Molecular basis of beta-thalassemia in the population of Tunisia. *Hemoglobin*, 28(3):177–187.

Filon D., Oron V., Krichevski S., Shaag A., Shaag Y., Warren TC.,Goldfarb A., Shneor Y., Koren A., Aker M. (1994) .Diversity of beta-globin mutations in Israeli ethnic groups reflects recent historic events. *Am J Hum Genet*, 54:836–843.

Forget BG. (2001). Molecular mechanisms of b-thalassemia. In: Steinberg. *Cambridge: Cambridge University Press*, 252–76.

Flint J., Harding RM., Clegg JB., Boyce AJ. (1993). Why are some genetic diseases common? Distinguishing selection from other processes by molecular analysis of globin gene variants. *HumGenet*, 91:91–117.

Frey, M.K., Alias, S., Winter, M.P., Redwan, B., St ubiger, G., Panzenboeck, A., Alimohammadi,A., Bonderman, D., Jakowitsch, J., Bergmeister,H., Bochkov, V., Preissner, K.T. & Lang, I.M. (2014). Splenectomy is modifying the vascular remodeling of thrombosis. *Journal of the American Heart Association*, 3:772.

Sébahoun G. (2001). Anémies Hémolytiques congénitales de l'hémoglobine :65-68.

Galacteros F., Garin JD., Monplaisir N., Namoune S., Arous N., Blouquit Y., et al.(1984). Two new cases of heterozygous for hemoglobin knossos 27 Ala →Ser detected in the French west Indies and Algeria. *Hemoglobin*,8:215-28.

Galanello R. et Origa R. (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet, Journal of Rare Diseases*, 5:11.

Galanello R., Campus S. (2009). Deferiprone chelation therapy for thalassemia major. *ActaHaematol*, 122:155–64.

Gauravi A Dhruva., Amit H Agravat., Kinjal H., Kotak. (2014). Evaluation of blood indices and peripheral smear examination in beta thalassemia patients. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*. 3 (2):674-678.

Ghanei M., Adibi P., Movahedi M., Khami MA., Gha semi RL., Azarm T., Zolghaderi B., Jamshidi HR., Sadri R. (1997). Pre-marriage prevention of thalassemia. Report of a 100.000 case experience in Isfahan. *Public Health*, 111:153-6.

Ghanem N., Girodon E., Vidaud M., Martin J. (1992). A comprehensive scanning method for rapid detection of betaglobin gene mutations and polymorphisms. *Human Mutation*, 1 : 229-39.

Giambona A., Lo Gioco P., Marino M., Abate I., Di Marzo R., Renda M., Di trapani F., Messina F., Siciliano S., Rigano P., Cheab F.F., Kazazian H.H., Maggio A.(1995). The great heterogeneity of thalassemia molecular defect in Sicily. *Human Genetics*, 95: 526-530.

Giardine B., Borg J., Higgs DR., Peterson KR., Philipsen S., Maglott D., Singleton BK., Anstee DJ., Basak AN., Clark B., et al., (2011). Systematic

documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nat Genet*, 43: 295–301.

Girot R. et De Montalembert M. (2006). Thalassémies chez l'enfant. *EMC Pédiatrie*, 4 : 80-30.

Girot R. (1994). Thalassémies : physiopathologie et diagnostic. *Revue du praticien*, 44 : 52-28.

Girot R. (1999). Thalassémies chez l'enfant. *Elsevier. Paris*, 4 : 80-30.

Girot R. et de Montalembert M. (2006). Thalassémies chez l'enfant. *Elsevier SAS*, 4 : 080-A-30.

Girot R. (2003). La bêta-thalassémie. *Encyclopédie Orphanet*.

Greene Dina N., Vaugn Cecily, et al. (2015). Advances in detection of hemoglobinopathies. *Clinica Chimica Acta*, 439:50-7.

Gyamong W. et Jobin M. (2005). Physiologie médicale. Edition: 2.

Haddad A., Tyan P., Radwan A., Mallat N., Taher A. (2014). β -Thalassemia Intermedia: A Bird's-Eye View. *Turk J Haematol*, 31(1):5-16.

Hadj Khelil A., Denden S., Leban N., Daimi H., Lakhdhar R., Lefranc G., Ben CJ., Perrin P.(2010). Hemoglobinopathies in North Africa: a review. *Hemoglobin*, 34:1–23.

Hagege I., Becker A., Kerdaffrec T., Kanfer A., Girot R. (2001). Long-term administration of high-dose deferoxamine 2 days per week in thalassemic patients. *Eur J Haematol*, 67 : 230-1.

Haidar R., Musallam K., Taher A., et al. (2011). Bone disease and skeletal complications in patients with beta thalassemia major, *Bone*, 48(13): 425-432.

Hamamy H. A., Al-Allawi, N. A. S. (2013). Epidemiological profile of common haemoglobinopathies in Arab countries. *Journal of Community Genetics*, 4(2), 147–167.

Hardison R.C. (2012). Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2:a011627.

Harju S., McQueen K. J., Peterson KR. (2002). Chromatin structure and control of β -like globin gene switching. *Exp. Biol. Med*, 227(9): 683-700.

Harteveld CL., Den Dunnen JT., Voskamp A., White SJ., Phylipsen M., Akkermans N. (2005). Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta- thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation -dependent probe amplification. *J Med Genet*, 42: 922-931.

Harteveld C.L., Refaldi C., Cassinerio E., Cappellini M.D., Giordano PC. (2008). Segmental duplications involving the alphas globin gene cluster are causing beta-thalassaemia intermedia phenotypes in beta-thalassaemia heterozygous patients. *Blood Cells Mol*, 40:312-6.

Hashemi Nasab A . (1979). Clinical and laboratory findings in the initial diagnosis of homozygous beta thalassaemia in Fars province, Iran. *Br J Haematol*, 43:57-61.

Haute Autorité de Santé. (2008). Syndromes thalassémiques majeurs et intermédiaires : Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare, *Saint-Denis La Plaine*.

Henry Wajcman. (2005). L'hémoglobine: structure et fonction. *EMC hematologie*, 2:145-57.

Henry Wajcman., Laurent Kiger. (2002). L'hémoglobine des micro-organismes à l'homme: un motif structural unique des fonctions multiples. *Comptes rendus biologie*, 325(12):1159-74.

Hessissen L., Harif M. (2010). Quelles nouveautés dans la thalassémie?. *Amether*,2(1):11.

Higgs DR., Engel JD., Stamatoyannopoulos, G. (2012). Thalassaemia. *Lancet*, 379(9813):373-383.

Higgs DR, Thein SL., Woods WG. (2001). The molecular pathology of the thalassemias. In: The thalassemia syndromes. *4th ed. Blackwell Science, Oxford:* 133-91.

Howard A., Pearson Alan., Cohen R., Patricia-Jane., Giardina V., Haig H. Kazazian. (1996) .The Changing Profile of Homozygous β -Thalassemia: Demography, Ethnicity, and Age Distribution of Current North American Patients and Changes in Two Decades. *Pediatrics Mar*, 97 (3) 352-356.

Huisman TH. (1992). The beta-and delta-thalassemia repository. *Hemoglobin*.16:237-58.

Husman THJ. (1993). La β - δ -thalassémie. *Hémoglobine*, 17: 479-499.

Huisman THJ. (1997). Levels of Hb A2 in heterozygotes and homozygotes for β - thalassemia mutations: Influence of mutations in the CACCC and ATAAA motifs of the globin gene promoter. *Acta Haematol*, 98: 187–194.

Jansen CE, Tuck SM, Old J et al. (1997). Incidence of endocrine complications and clinical disease severity related to genotype analysis and iron overload in patients with beta-thalassemia. *Eur J Haematol*, 59: 76-81.

Joy Ho P. et Thein SL. (2000). Gene regulation and deregulation: a β globin perspective. *Blood Rev*.14, 78-93.

Joutovsky Alla., Hadzi-Nesic Joan., Nardi Michael A. (2004). HPLC retention time as a diagnostic tool for the hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clinical chemistry*, 50(10):1736-47.

Kaiser J. (2009). Thérapie génique. Traitement bêta-thalassémie réussit, avec une mise en garde. *Science*, 326: 1468-9.

Kaplan J.C., Delpech M., (2007). Le modèle des maladies de l'hémoglobine. *Biologie moléculaire et médecine 3ème édition* , 379 - 393.

karamifar Hamdollah., Shahriari Mehdi., Hossein Gholam., Hakimi Amir. (2005). Failure of puberty and linear growth in beta-thalassemia major .*Turk J Haematol*, 22(2): 65-69 .

Karimi M., Habibzadeh F., De Sanctis. (2003). Hypoparathyroidism with extensive intracerebral calcification in patients with beta-thalassemia major. *J Pediatr Endocrinol Metab* Jul-Aug, 16(6):883-6.

Kattamis C., Hu H., Cheng G., Reese AL., Gonzalez-Redondo JM., Kutlar A., Kutlar F., Huisman TH. (1990). Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Br J Haematol*, 74:342–346.

Kazazian HH., Antonarakis S., (1997), Molecular genetics of the hemoglobin genes. In: *SINGER M & BERG P (Eds) – Exploring genetic mechanisms. University Science Book, Sausalito, Cali-fornia*, 301-336.

Khalifa A.S., Salem M., Mounir E., El-Tawil M.M., El-Sawy M., Abd Al-Aziz MM. (2004). Abnormal glucose tolerance in Egyptian beta-thalassemic patients: possible association with genotyping. *Pediatr Diabetes*, 5(3):126-32.

Khayat D., Auclerc G., (1990). Hématologie. *Deuxième édition. Maloine, Paris*, 136- 139.

Kolnagou A., Natsiopoulos K., Kleanthous M., Ioannou A., Kontoghiorghes GJ. (2013). Liver iron and serum ferritin levels are misleading for estimating cardiac, pancreatic, splenic and total body iron load in thalassemia patients: factors influencing the heterogenic distribution of excess storage iron in organs as identified by MRI T2, *Toxicol. Mech Methods*, 23(1):48-56.

La Rosa, C., De Sanctis, V., Mangiagli A., Mancuso M., Guardabasso V., Galati M.C. & Caruso-Nicoletti M. (2005). Growth hormone secretion in adult patients with thalassaemia. *Clinical Endocrinology*, 62, 667–671.

Labie D., Bennani C., Beldjord C. (1990). Thalassemia in Algeria. *Ann NY Acad Sci*, 612:43–54.

Labie D., Elion J. (2005). Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine Molecular and pathophysiological bases of haemoglobin diseases. *EMC- Hematologie*, 2 220-239.

Lacan P., et al. (2002). Hb Aubagne [β 64(E8) Gly \rightarrow Ala]: a new unstable beta-chain variant found in a French family. *Hemoglobin*, 26(2): 163-7.

Lainé A. (2004). La drépanocytose, regards croisés sur une maladie orpheline, Karthala. *Paris, Karthala*, 331.

La Nasa G., Argiolu F., Giardini C., Pession A., Fagioli F., Caocci G., Vacca A., De Stefano P., Piras E., Ledda A., Piroddi A., Littera R., Nesci S., Locatelli F. (2005). Transplantation de moelle osseuse pour la bêta patients-thalassémie: L'expérience de la moelle osseuse Transplant Group italienne. *Ann NY Acad Sci*, 1054 :186-95.

Landers JP. (1995). Clinical capillary electrophoresis. *ClinChem*, 41: 495-509.

Landin B., Berglund S. (1996). A novel mutation in the beta-globin gene causing beta-thalassaemia in a Swedish family. *European journal of haematology*, 57(2):182-4.

Leila Danesi., Agnese Cattaneo., Elena Valassi., Francesca Pecori Giraldi., Crocetta Argento., Emanuela D'Angelo., Nadia Mirra., Vittorio Carnelli., Laura Zanaboni., Maria Domenica Cappellini and Francesco Cavagnini. (2007). Growth hormone deficiency (GHD) in adult thalassaemic patients Massimo Scacchi . *Clinical Endocrinology*, 67: 790–795.

Lemsaddek W., Picanc Seuanes F., Nogueira, Mahmal L., Benchekroun., Khattab M., OsorioL. (2004). The β -Thalassaemia Mutation / Haplotype Distribution in the Moroccan population. *Hemoglobin Flight*, 28 (1):25-37.

Le Rigoli., Meo A., Miceli MR., Alessio K., RA Caruso., La Rosa MA., Salpietro DC., Rich M. (2001). Analyse Barbiere I. moléculaire des patients atteints de β -thalassémie dans une zone de haute incidence de l'Italie méridionale. *Clin Lab hème* , 23 : 373-378.

Lerman LS., Silverstein K. (1987). Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. In : *Methods in enzymology. Academic Press, New York*, 482-501.

Lin M., Jiao JW., Zhan XH., Zhan XF., Pan MC., Wang JL., et al. (2014). High Resolution Melting Analysis: A Rapid Screening and Typing Tool for Common β -Thalassemia Mutation in Chinese Population. *PloS One*, 9(8):102-243.

Li Q., Zhang M., Duan Z., Stamatoyannopoulos G. (1999). Analyse structurale et cartographie de la DNase I hypersensibilité de HS5 de la région de contrôle du locus bêta-globine. *La génomique*, 61 : 183-193.

Lo YM. (2005). Les progrès récents dans les acides nucléiques fœtales dans le sang maternel. *J Histochem Cytochem*, 53: 293-296.

Lukens, J.N. (1999). The thalassaemia and related disorders: Quantitative disorders of haemoglobin synthesis. In: Wintrob's. *Clinical Haematology*, 1: 1103-1145.

Maggio A., Giambona A., Cai SP., Wall J., Kan YW., Chehab C. (1993). Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean β -thalassemia mutations by covalent reverse dot blot analysis: Application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood*, 81: ;239- 343.

Mai A., Jelcic K., Rotili D., et al., (2007). Identification of two new synthetic histone deacetylase inhibitors that modulate globin gene expression in erythroid cells from healthy donors and patients with thalassemia. *Mol Pharmacol*, 72(5):1111-1123.

Maier-Redelsperger M., Girot R., (1996). Les aspects cellulaires de la distribution et de la production de l'hémoglobine fœtale. *Hématologie*, 2: 437-42.

Maier-Redelsperger M., Girot R. (1989). Diagnostic biologique des maladies de l'hémoglobine. *Feuillet Biol*, 30: 170: 29-38.

Makhoul N.J., Wells R.S., Kaspar H., Shbaklo H., Taher A., Chakar N., Zalloua P.A. (2005). Genetic heterogeneity of Beta thalassemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. *Ann Hum Genet*, 69: 55–66.

Mavrou A., Kouvidi E., Antsaklis A., Souka A., Kitsiou Tzeli S., Kolialexi A. (2007). Identification des globules rouges nucléés dans la circulation maternelle: une deuxième étape dans le dépistage des aneuploïdies fœtales et les complications de la grossesse. *Prenat Diagn*, 27 : 150-153 .

Merkel PA., Simonson DC., Amiel SA et al. (1988). Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with thalassemia major treated by hypertransfusion. *N Engl J Med*, 318: 809-814.

Meropi Toumba. et Nicos Skordis. (2010). Osteoporosis Syndrome in Thalassemia Major. *An Overview J Osteoporos*, 537673.

Modell B., Berdoukas V. (1984). The clinical approach to thalassaemia. London : Grune and Stratton.

Monge L., Pinach S., Caramellino L., Bertero MT., Dall'omo A., Carta Q. (2001). The possible role of autoimmunity in the pathogenesis of diabetes in b-thalassemia major. *Diabetes Metab*, 27 (2 Part 1): 149-154.

Morlé L., Morlé F., Dorléac E., Baklouti F., Baudonnet C., Godet J., et al. (1984). The association of hemoglobin Knossos and hemoglobin Lepore in an Algerian patient. *Hemoglobin*, 8: 229-38.

Mosca A., Paleari R., Galanello R., Sollaino C., Perseu L., Demartis FR., et al. (2008). New analytical tools and epidemiological data for the identification of HbA2 borderline subjects in the screening for beta-thalassemia. *Bioelectrochemistry*, 73 : 137-40.

Musallam K.M., Rivella S., Vichinsky E., Rachmilewitz EA. (2013). Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica*, 98: 833-44.

Nadia Ghasemian Dastjerdy., Ali Banihashemi., Mandana Azizi ., Haleh Akhavan-Niaki. (2015). Identification d'un Rare β^0 thalassémie Mutation, Codon 54 (-T) (HBB : c.165delT) dans une famille iranienne international, *journal for hemoglobin research*, 39 :6.

Olds R.J., Sura T., Jackson B., Wonke B., Hoffbrand AV., Thein SL. (1991). A novel delta 0 mutation in cis with Hb Knossos: a study of different genetic interactions in three Egyptian families. *Br J Hematol*, 78:430 - 6.

Olivieri N.F., Brittenham G.M. (1997). Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood*, 89: 739-761.

Olivieri NF. (1999). The beta-thalassemias. *New England Journal of Medicine*, 341: 99-109.

Olivieri N., Nathan DG., MacMillan JH., et al. (1994). Survival in medically treated patients with homozygous bêta-thalassemia. *N Engl J Med*, 331: 574-78.

Olivieri NF. et Weatherall DJ. (2009). Clinical aspects of beta-thalassemia and related disorders. In: Steinberg. Forget BG, Higgs D, Weatherall DJ (eds), *Second ed. New-York . Cambridge University Press*, 2: 357-416.

Opazo J.C., Hoffman FG., Natarajan C., Witt C.C., Berenbrink M., Storz J.F.(2015). Gene turnover in the avian globin gene family and evolutionary changes in hemoglobin isoform expression. *Mol Biol Evol*, 32: 871–887.

Orkin S.H et Goff S.C. (1981). Nonsense et mutations de déphasage dans β^0 - thalassémie détecté dans les gènes de β -globine clonés. *Le Journal of Biological Chemistry*, 256 (19) : 9782-9784.

Orsini A., Perrimond H., Vovan L., Mattei M. (1982). Hématologie pédiatrique. *ED. Flammarion, Paris*, 442.

Qari Mohamad H., Wali Yasser., H Albagshi Muneer., et al. (2013). Regional consensus opinion for the management of Beta thalassemia major in the Arabian Gulf area. *Orphanet J Rare Dis*, 8: 143.

Papasotiriou J., Karaklis A., Loukopoulos D., Fessas Ph. (1983). Hemoglobin Knossos; Functional properties. *Barcelona: 6th Meeting ISH (European and African Division), Abstract 261.*

Panigrahi I. et S. Agarwal.(2007). The thromboembolic complications in β -thalassemia : beyond the horizon. *Thrombosis research*, 120(16): 83-789.

Panja Amrita., K Ghosh Tapan., Basu Anupam., (2012). Genetics of Thalassemia in India population, *Journal of community nutrition and health*,1(1):39-46.

Pantaleo A., Giribaldi G., Mannu F., Arese P., Turrini F. (2008). Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun Rev*, 7(6):457-462.

Patel, N. A., Unadkat, S. V., Mehta, J. P., & Yada, S. B. (2016). A study on transfusion transmitted infections (TTIs), transfusion-related complications, and quality of life among the beta-thalassemia major patients in Jamnagar district. *Int J Med Sci Public Health*, 5(7): 1447-1451.

Perelman R. (1977). Pédiatrie pratique. *Tome I.ED. Maloine, Paris*, 420-422.

Personnes DA. (2009). Transfert hématopoïétiques souches de cellules de gène pour le traitement des troubles de l'hémoglobine. *Hématologie Am Soc programme Educ Hematol* , 690-7.

Perrimond H. (2001). β -thalassémie, manifestations cliniques. *Bull Soc Pathol Exot*, 94(2) : 92-94.

Perrin P., Bouhassa R., Mselli L., et al. (1998). Diversity of sequence haplotypes associated with beta-thalassaemia mutations in Algeria: Implications for their origin. *Gene*, 213(1–2):169–177.

Phaedon Fessas., Dimitris Loukopoulos., Stavroula Kokkinou., Yannis Papatiriou., Aris Karaklis. (1986). Hemoglobin Knossos: A Clinical, Laboratory, and Epidemiological Study. *American Journal of Hematology*, 21:119-133.

Philip J. et Jain N. (2014). Resolution of alloimmunization and refractory autoimmune hemolytic anemia in a multi-transfused beta-thalassemia major patient. *Asian J Transfus Sci*, 8(2):128- 30.

Philippe Joly., Corinne Ponderre., Catherine Badens. (2014). Les bêta-thalassémie : aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. *Ann Biol Clin*, 72(6) : 639-68.

Piga A., Gaglioti C., Fogliacco E., Tricta F. (2003). Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis. *Haematologica*, 88:489–96.

Pirastu M., Galanello R., Doherty M.A., Tuveri T., Cao A., Kan YW. (1987) .The same beta-globin gene mutation is present on nine different beta-thalassemia chromosomes in a Sardinian population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:2882–2885.

Pootrakul P., Sirankapracha P., Hemsorach S., Mounsub W., Kumbunlue R., Piangitjagum A., Wasi P., Ma L., Schrier SL. (2000). Correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in thai patients with thalassemia. *Blood*, 96(7):2606-12.

Ragusa A ., Amata S., Lombardo T., et al. (2003). Asymptomatic and mild β -thalassemia in homozygotes and compound heterozygotes for the IVS2+1G>A mutation : role of the β -globin gene haplotype. *Haematologica*, 88 : 1099-105.

Rahul A Ghone, Kumbar K M., Suryakar A N., Katkam R.V.,Joshi N G. (2008).oxidative stress and disturbance in antioxidant balance in beta thalassemia major. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23 (4) 337-340.

Ricerca B.M., Di Girolamo A., Rund D. (2009). Infections in thalassemia and hemoglobinopathies: focus on therapy-related complications. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 1: e2009028.

Rosa J., Wajkman H., Blouquit Y. (1993). Hémoglobine. Fonction. *Paris* : Elsevier SAS, *Hématologie. Encycl Méd Chir*, 14. 13-000-S-10.

Routledge S. J. et Proudfoot N. J. (2002). Definition of transcriptional promoters in the human beta globin locus control region. *J Mol Biol*, 323(4): 601-611.

Rund D. et Rachmilewitz E. (2005). Beta-Thalassemia. *N Engl J Med*3, 53:1135-1146.

Saiki RK., Walsh PS., Levenson CH., Erlich HA. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Prot.Natl Acad Sci USA*, 86:6230-6233.

Sall A., Touré A.O., Séné A., Diatta A., Diop S., et al. (2014). Approche diagnostique par le phénotype de la bêta-thalassémie hétérozygote à Dakar. *Revue Cames Santé*, 2(1):41-4.

Schechter A.N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112(10):3927-3938.

Shazia Q., Mohammad Z. H., Rahman Taibur., Uddin Shekhar Hossain. (2012). Correlation of Oxidative Stress with Serum Trace Element Levels and Antioxidant Enzyme Status in Beta Thalassemia Major Patients. *A Review of the Literature Hindawi Publishing Corporation Anemia*, 7.

Sheffield V.C., Cox DR., Lerman L.S., Myers RM . (1989). Attachment of a 40 base-pair G + C rich sequence (GC Clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 232-6.

Shrier S. (2006). Pathophysiology of the thalassaemia. In Disorders of iron, homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis. electrophoresis. *J Chromatog B*,689: 155-164.

Siguret V. et Andreux J.P. (1997). Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. *Ann Biol Clin.Paris*, 55(2):103-12.

Siguret V. et Andreux j. (1997). Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. *Annales de Biologie Clinique*, 55(2):103-12.

Sirachainan N., Chuansumrit A., Kadegasem P., Sasanakul W., Wongwerawattanakoon P., Mahaklan L. (2016). Normal hemostatic parameters in children and young adults with α -thalassemia diseases. *Blood journal*, 24(146):35-42.

Skordis N., Toumba M. (2011). Bone disease in thalassaemia major: recent advances in pathogenesis and clinical aspects. *Pediatr Endocrinol Rev*, 8 Suppl 2:300-6.

Spritz R.A., Jagadeeswaran P., Choudary P.V., Biro P.A., Elder J.T., De Riel J.K., Manley J.L., Gefter M.L., Oubliez B.G., Weissman S.M. (1981). Substitution de base dans une séquence intermédiaire d'un gène de bêta-globine humaine + -thalassemic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 (4): 2455-9.

Stefano R. (2009). Ineffective erythropoiesis and thalassemias. *Current Opinion in Hematology*, 16 (3):187-194.

Stephens AD., Angastioniotis M., Baysal E., et al. (2011). ICSH recommendations for the measurement of hemoglobin F. *Int Lab Hematol*, 34:1-13.

Swaminathan S., Fonseca V., Alam M. G, et al. (2007). The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes care*, 30 (17): 1926-1933.

Taher AT., Musallam KM., M Karimi., El-Beshlawy A., Belhoul K, Daar, saned MS., El-Chafic AH., M., Fasulo., Cappellini MD. (2010). Vue d'ensemble sur les pratiques en matière de gestion de intermedia de thalassémie visant pour abaisser les taux de complications dans une région d'endémie. *Étude de soins optimaux sang*, 115 : 1886-1892.

Taher A, Cappellini M.D, Vichinsky E, et al. (2009). Efficacy and safety of deferasirox doses of 30 mg/kg per d in patients with transfusion-dependent anaemia and iron overload. *Br J Haematol* , 147:752–759.

Tadmouri A., N Basak Ghazi O. (2001). Beta-thalassemia in Turkey. *Review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. Hemoglobin*,. 25 (2), 227-239.

Tadmouri GO., Garguier N., Demont J., Perrin P., Basak AN., (2001). History and origin of beta-thalassemia in Turkey: sequence haplotype diversity of beta-globin genes. *Hum Biol.*, 73:661–674.

Tadmouri G. O. et Gulen R. I.(2003). Deniz: the electronic database for beta-thalassemia mutations in the Arab world. *Saudi Med J*, 24:1192-1198.

Taher A., Isma'eel H., Cappellini MD. (2006). Thalassemia intermedia: revisited. *Blood cells. Molecules and Diseases*, 37(1): 12- 20.

Tarazi I., Al Najjar E., Lulu N., Sirdah M. (2007). Obligatory premarital tests for beta- thalassaemia in the Gaza Strip: evaluation and recommendations. *Int J Lab Hematol*, 29: 111–118.

Terpos E. et Voskaridou E. (2010). Reatment options for thalassemia patients with osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci*. Aug; 1202:237-43.

Trecartin RF., Liebhaber SA., Chang JC., KY Lee., YW Kan., Furbetta M., Angius A., Cao A. (1981). Beta thalassémie zéro en Sardaigne est causée par une mutation non-sens. *J Clin Invest*, 68 (4): 1012-1017.

Thanet Prajantasen., Supan Fucharoen., Goonapan Fucharon. (2015). Hight resolution melting analytical platform for rapid prenatal and posnatal diagnostic of beta- thalassemia common among Southeast Asian population. *Clinica Chimica Acta*, 441:56-62.

Thein SL., Old J.M., Wainscoat J. S., Petrou M., Modell B., Weatherall D. J. (1984). Population and genetic studies suggest a single origin for the Indian deletion β^0 thalassaemia. *Br J Haematol* ,57: 271–278.

Thein S. L. (1992). Dominant beta- thalassaemia: molecular basis and pathophysiology. *Br J Haematol*, 80(3):273-7.

Thein S. L. (1998). Beta-thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol*, 11(1):91-126.

Thein S.L. (2002). Beta-thalassaemia prototype of a single gene disorder with multiple phenotypes. *Int J Hematol*, 76(suppl 2):96-104.

Thein S. L. (2005). Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*, 90(5):649-60.

Thein, S. L. (2013). The Molecular Basis of β -Thalassemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(5):11700.

Thein S.L. et Wood WG. (2009). The molecular basis of β thalassemia, $\delta\beta$ thalassemia, and hereditary persistence of fetal hemoglobin. In Disorders of hemoglobin: Genetics, pathophysiology, and clinical management. *ed. Steinberg*

MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 323–356.

Thuret I. (2014). Prise en charge actuelle des thalassémies intermédiaires. *Transfusion Clinique et Biologique*.21:143-9.

Thuret I., Michel G., Dubus J.C., Chambost H., Lena D., et al. (1993). Evolution Clinique de la thalasso-drépanocytose. *Pédiatrie*. 48, 829-834.

Thuret Isabelle. (2008). La bêta-thalassémie. *Encyclopédie Orphanet Grand Public Maladies Rares*.

Traeger Synodinos J., Hartevelde C.L., Old J.M., Petrou M., Galanello R., Giordano P., et al. (2014). EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet EJHG*, 1-12.

Vanbourdolle M. et al. (2007). Biochimie hématologie, 6-1116.

Varawalla N.Y, Old J.M, Weatherall D.J. (1991). Rare β -thalassaemia mutations in Asian Indians. *Br J Haemato.*, 79: 640–644.

Varricchio L., Fabucci M.E., Alfani E., Godbold J., Migliaccio A.R. (2010). Compensated variability in the expression of globin-related genes in erythroblasts generated ex vivo from different donors. *Transfusion*, 50(3):672-684.

Verma S., Gupta R., Kudesia M., Mathur A., Krishan G., Singh S. (2014). Coexisting iron deficiency anemia and Beta-thalassaemia trait: effect of iron therapy on red cell parameters and hemoglobin subtypes. *ISRN Hematol*, 4:293-216.

Vogiatzi M.G., Macklin E., Trachtenber F., et al. (2009). Differences in the prevalence of growth, endocrine and vitamin D abnormalities among the various thalassaemia syndromes in North America. *British Journal of Haematology*,146, (15): 546-556.

Vogiatzi, M.A., Macklin E.A., Fung E.B., Cheung A.M., Vichinsky E., Oliveri N., Kirby M., Kwiatkowski J.L., Cunningham M., Holm I., Lane J., Schneider R., Fleisher M., Grady R.W., Peterson C. Giardina P.J. (2009). For the

Thalassemia Clinical Research Network Bone disease in thalassemia, a frequent and still unresolved problem. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24:543-557.

Wajcman H. et Riou J. (2009). Globin chain analysis : An important tool in phenotype study of hemoglobin disorders. *Clinical Biochemistry. Hemoglobin Disorders*. 42: 1802-1806.

Wajcman H., Riou J., Yapo AP. (2002). Globin chain analysis by reversed phase high performance liquid chromatography: recent developments. *Hemoglobin*, 3(26): 271-284.

Weatherall David., Alan N Schechter., David G. Nathan. (2012). Pathophysiology and Clinical Manifestations of the β -Thalassaemias A Additional Perspectives on Hemoglobin and Its Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: 11726.

Weatherall D. J. (1991). The thalassaemias. In: *Williams JW (ed) Haematology, 6th edn. McGraw Hill, New York.*

Weatherall D. J. (2001). Detection of alpha thalassaemia in negro infants. *Br.j-Haemat.* 46: 39-46.

Weatherall D. J. (2001). Phenotype.genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature reviews genetics*, 2: 245-255.

Weatherall D. J. et Clegg JB. (1981). The thalassaemia as genetically determined disorders of hemoglobin synthesis, in the thalassaemia syndromes. *Blackwell scientific publications, third edition.*

Weatherall DG., Clegg JB., (2001). The thalassaemia syndromes. *London: Blackwell Scientific Publications. 5th edition.*

Weiss M. J. Et DOS Santos C.O. (2009). Chaperoning erythropoiesis. *Blood*, 113:2136– 2144.

Westaway D . et WilliamsonR. (1981). Un variant de séquence nucléotidique dans l'intron une β thalassaémie + clonée du gène de la globine. *Nucleic Acids Res*, 9 (8) :1777-1788.

Yacouba Issaka Ramatou. (2015). La beta-thalassémie: Etude d'une cohorte de cas colligés au laboratoire de biochimie et de toxicologie de l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V (HMIMV)- Rabat, 143.

Yu X., Mollan T. L., Butler A., Gow A.J, Olson J.S., Weiss M. J. (2009). Analysis of humanaglobin gene mutations that impair binding to theahemoglobin stabilizing protein. *Blood*,113: 5961– 5969.

Yuan J., Angelucci E., Lucarelli G., Aljurf M., Snyder L.M., Kiefer C.R., Ma L., Schrier S.L. (1993). Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe β -thalassemia, *Blood* .82:374-377.

Zahed L. (2001). The spectrum of beta-thalassemia mutations in the Arab populations. *J Biomed Biotechnol*,1:129 -32.

Zahed L., Demont J., Bouhass R., Trabuchet G., Hanni C., Zalloua P., Perrin P. (2002) .Origin and history of the IVS-I-110 and codon 39 beta-thalassemia mutations in the Lebanese population. *Hum Biol*, 74:837–847.

Zidani Nadia. (2012). Le nombre des thalassémiques augmente, d'année en année. *Interview réalisée par Loubna ZAHAF , santé-Mag- N° 03 Février .*

Annexe n°1

MINISTERE DE LA SANTE, DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE

CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE BENFLIS Touhami BATNA

LABORATOIRE CENTRALE D'HEMATOLOGIE

N° : /lab./200....

ETUDE DE L'HEMOGLOBINE

1) ETAT CIVILE DU MALADE DE LA FAMILLE :

* Nom & Prénom du malade :

* Age :* Lieu de Naissance :

* Service :* N° du Lit :

* Nom et Prénom du Père :

* Age :* Lieu de Naissance :

* Nom et Prénom de la Mère : Lieu de Naissance :

* Adresse :

2) ORIGINES :

* Commune de :

* Wilaya de :

3) RENSEIGNEMENTS CLINIQUES/

3-1 Le malade a-t-il été transfusé :

- Groupe ABO & Rhésus: // - Chronique : //

- Quand : // - Ictère splénomégalie : //

- Combien : //

3-2 Antécédent Personnels :

* Ictère néonatal.

- S'agit-il d'un premier épisode ? //

- Les parents ont-ils présents ces accidents semblables ? //

- Les frères & soeurs ont-ils la même maladie ?

* Résultats des examens biologiques :

- GR : // - Fer Sérique : //

- Hb : // - Bilirubine: //

- TCMH : // - COOBS: //

- VGM : //

DIAGNOSTIC/ Thalassémies // Drépanocytose // Autres //

NB:Fiche de renseignement à remplir à l'occasion d'une demande d'exploration de l'hémoglobine.

Annexe n°2

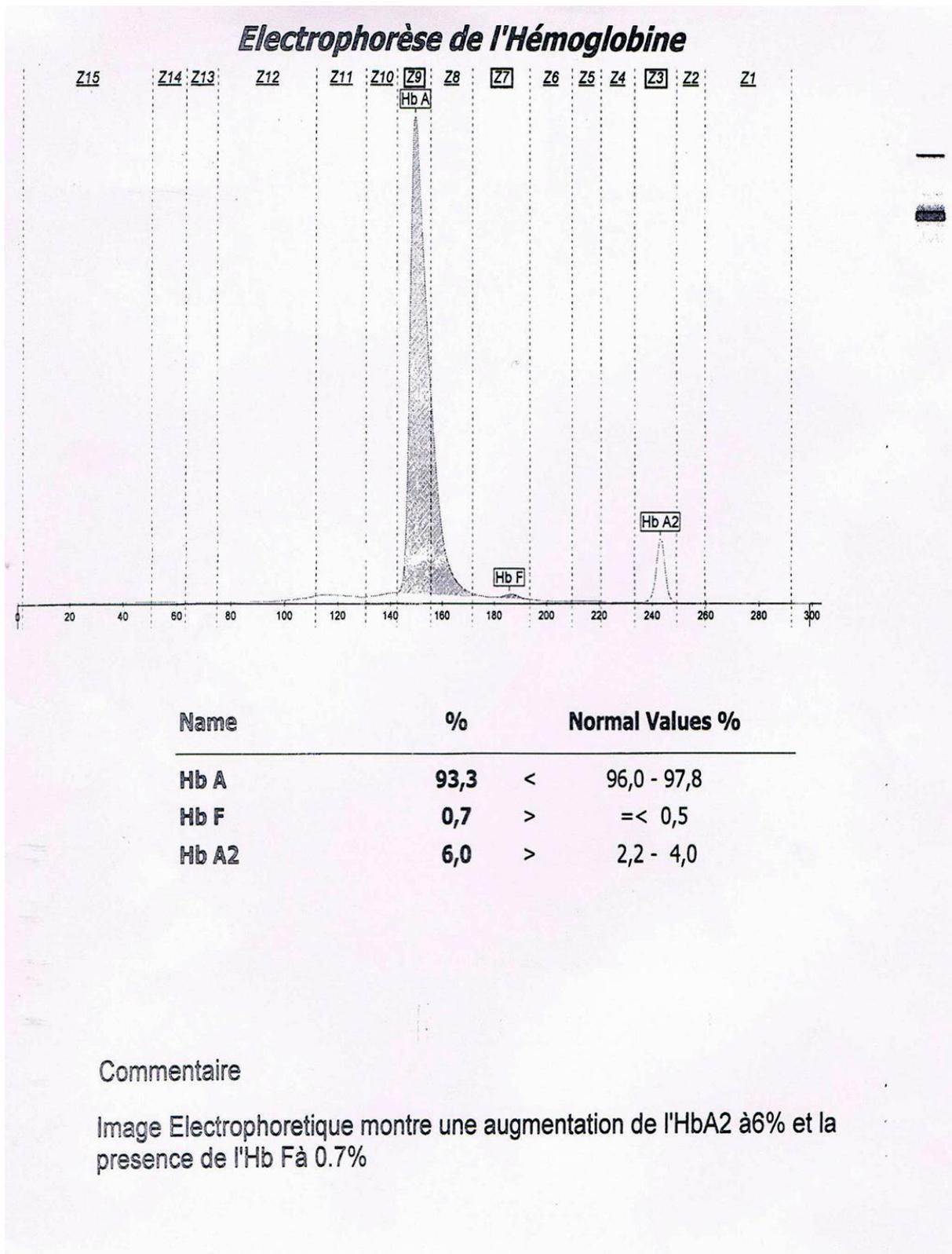


Figure 1. Exemple représentatif d'un profil électrophorétique d'un patient atteint de la beta-thalassémie hétérozygote.

Abstract

The aim of this work is to carry out a biological and molecular diagnosis in a part of the Algerian children in the wilaya of Batna (East of Algeria) to study the biological aspects as well as to characterize mutations of the gene *HBB* carried by the diseased subjects to place them in the distribution spectrum in the Algerian population. In addition, our work allows us to study the effects of mutations in the *HBB* gene on changes in biological parameters in our patients.

As regards biological diagnosis, blood samples were taken from 10 homozygous beta-thalassemic children who are transfused and managed in the Batna University Hospital. Blood samples were taken just before the transfusion. In addition, blood samples from the controls were also taken from 10 healthy children. Cases and controls were matched in age and sex. All the cases are covered by hematological tests such as blood count (red blood cell counts, erythrocyte count calculations, MCV and MCH, measurement of hemoglobin level), red blood cell examination and finally a biochemical test, in this case Electrophoresis CAPILLARYS HEMOGLOBIN and the dosage of ferritin.

The results obtained showed a distribution of our beta-thalassemic patients according to the inbreeding, gave about 70% of the major patients, the parents are cousins of the 1st degree and 2nd degree. Severe anemic cases were observed in patients with a decrease in hemoglobin compared to controls 12.4 ± 0.3055 g/dl vs 5.8 ± 0.66464 g / dl, respectively. Microcytosis with hypochromia was significantly more noticeable in patients than in controls with MCV and MCH values of 74.3 ± 5.224 fl and 29.2 ± 0.5333 pg in patients compared with 59.3 ± 0.7311 fl and 15.1 ± 0.6574 pg. In addition, significantly secondary thrombocytosis and leukocytosis have been reported in these patients. The complications of endocrinopathies are associated with the major beta-thalassemia of our subjects are hypogonadism and osteoporosis 26.31%, GH deficiency 21.05%, Thus, biochemical characteristics have shown that there is an iron overload in patients versus controls with serum ferritin 1278 ± 87.74 ng / l vs. 175.2 ± 7.728 ng / l.

However, molecular diagnosis was performed in 19 beta-thalassemic children. We have chosen the minisequencing method using the SNaPshot™ (Applied Biosystem) kit since it allows the rapid search of the 4 most common and frequent mutations (Codon39, IVS-I-110, IVS-I-1, G6V) of the *HBB* gene and direct sequencing by the Sanger method to detect rare mutations.

The results obtained show the presence of different mutations responsible for β -thalassemia with a predominance of the nonsense mutation of codon 39 (C> T) which represents 84.21% of the alleles studied. Three other mutations have been described in our population: IVS-I-110 (G> A) which represents a minority frequency (7.89%), this mutation is associated with the non-codon mutation 39 (C> T). Two rare mutations have been observed with different frequencies, codon 54 (-T) (5.26%), this lesion is detected in a second Algerian family and mutation of codon 27 (G> T) or Hb Knossos (2.63%) which represents a first association with the nonsense mutation of codon 39 (C> T) in the Algerian population. While the detected mutations of the *HBB* gene have different effects on the variations of the biological parameters as well as on the cytological aspect of the erythrocytes.

Key words: Beta-thalassemia, *HBB* gene mutations, Diagnosis, Children.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى تقييم التشخيص البيولوجي والجزئي لمرض البيتا ثلاثييميا لدى عينة من أطفال ولاية باتنة. فيما يتعلق بالتشخيص البيولوجي، تم أخذ عينات دم من 10 أطفال يعانون من لبيتا ثلاثييميا يتلقون العلاج في المستشفى الجامعي لولاية باتنة. هذه العينات تم أخذها (شرق الجزائر) ودراسة الجوانب البيولوجية و وصف الطفرات الوراثية للجين *HBB* عند هؤلاء المرضى. كما يسمح لنا بدراسة آثار الطفرات الوراثية للجين *HBB* على تغيرات فقط قبل نقل الدم. وعلاوة على ذلك تم جمع عينات الدم الشاهد أيضا من 10 أطفال أصحاء. مطابقين للمرضى من ناحية العمر والجنس. واستفاد جميع الحالات من اختبارات دموية مثل تعداد الدم الكامل (عدد كرات الدم الحمراء وكرات الدم البيضاء احتساب مؤشرات *MCV* و *MCH*، وقياس مستويات الهيموجلوبين). فحص كرات الدم الحمراء و اختبار بيوكيميائي و المتمثل في الهجرة الكهربائية للهيموغلوبين *CAPILLARYS* *HEMOGLOBIN* أخيرا حساب نسبة *Ferritin*.

أظهرت النتائج وجود درجة قرابة عالية لدى مرضى بيتا ثلاثييميا، وقدرت حوالي 70%، والآباء لديهم درجة قرابة اولى و ثانية. وقد لوحظت حالات فقر الدم الشديدة في المرضى حيث انخفاض الهيموغلوبين مقارنة مع الضوابط.

على التوالي. صغر الكريات الحمراء مع $12.4 \pm 0,3055$ g / dl مقابل $5,8 \pm 0,6464$ g / dl، نقص الانصبغ و هو ملحوظ بشكل كبير لدى المرضى مع القيم (*MCV* و *MCH*) من 5.224 fl و 74.3 ± 0.5333 pg للمرضى مقابل 59.3 ± 0.7311 fl و 15.1 ± 0.6574 pg للعينات الضابطة. وبالإضافة إلى ذلك، فقد تم تسجيل ارتفاع الصفائح الدموية الثانوية وزيادة عدد الكريات البيضاء لدى هؤلاء المرضى. كما لوحظ وجود مضاعفات للغدد الصماء كقصور الغدد التناسلية ومرض هشاشة العظام 26.31% ، 21.05% نقص *GH*، والنتائج أظهرت أيضا ارتفاع في نسبة ال *Ferritin* لدى المرضى $87,74 \pm 1278$ ng / لتر مقابل $7,728 \pm 175.2$ ng / لتر.

بالنسبة للتشخيص الجزئي فقد تم لدى 19 طفلا بيتا ثلاثييميا. اخترنا طريقة استخدام *Minisequencing SNaPshotTM* (النظم البيولوجية التطبيقية) لأنها تتيح البحث السريع لأربع طفرات (*Codon39*، *IVS-I-110*، *IVS-I-1*، *G6V*) الأكثر شيوعا وتكرارا للجين *HBB* و تقنية التسلسل المباشر (*direct sequencing*) على طريقة *Sanger* للكشف عن الطفرات النادرة.

وأظهرت النتائج وجود طفرات مختلفة مسؤولة عن بيتا ثلاثييميا مع وجود طفرة سائدة وهي *codon 39 (C> T)*، وهو ما يمثل 84.21% من الأليلات التي شملتها الدراسة. وقد وجدت ثلاث طفرات أخرى و هي: *IVS-I-110 (G> A)* التي تمثل نسبة 7.89% ، وترتبط هذه الطفرة مع ه طفرة *codon 39 (C> T)*. وقد سجلت اثنين من الطفرات النادرة، *codon 54 (-T)* 5.26% تم الكشف عن هذه الطفرة للمرة الثانية لدى سكان الجزائر وطفرة *codon 27 (G> T)* أو *Hb Knossos* 2.63% ، وهو ما يمثل الارتباط الأول مع طفرة *codon39 (C> T)* لدى سكان الجزائر. و أخيرا لوحظ تأثير متباين للطفرات الوراثية على تغير الخصائص البيولوجيا.

الكلمات المفتاحية: بيتا ثلاثييميا، طفرات الجين *HBB*، تشخيص، الأطفال.

Résumé

Le présent travail a pour but d'effectuer un diagnostic biologique et moléculaire chez une partie d'enfants algériens dans la wilaya de Batna (L'est Algérien), est d'étudier les aspects biologiques ainsi que de caractériser des mutations du gène *HBB* portées par les sujets malades pour les placer dans le spectre de répartition dans la population Algérienne. En outre notre travail nous permettra d'étudier les effets des mutations du gène *HBB* sur les variations des paramètres biologiques chez nos patients.

Concernant le diagnostic biologique, les échantillons de sang ont été prélevés sur 10 enfants beta-thalassémiques homozygotes suivis au niveau du CHU de Batna. Les prélèvements de sang ont été effectués juste avant la transfusion et également à partir de 10 enfants sains. Les patients et les témoins étaient de même âge et de même sexe. Tous les cas ont bénéficié des tests hématologiques tels que l'hémogramme (numération des hématies, calculs des indices érythrocytaire, VGM et TCMH, mesure du taux de l'hémoglobine), examen des hématies sur frottis et enfin un test biochimique en l'occurrence d'électrophorèse CAPILLARYS HEMOGLOBINE et le dosage de la ferritine.

Les résultats obtenus ont montré que 70% des cas de beta thalassémie majeure sont issus des mariages consanguins, les parents sont cousins du 1er degré et 2eme degré. Des cas anémiques graves ont été observés chez les patients où une diminution de l'hémoglobine par rapport aux témoins $12,4 \pm 0,3055$ vs $5,8 \pm 0,6464$ g / dl, respectivement. Une microcytose avec hypochromie est significativement perceptible chez les patients que chez les témoins avec des valeurs VGM et TCMH de $74,3 \pm 5,224$ fl et $29,2 \pm 0,5333$ pg chez les patients par rapport à $59,3 \pm 0,7311$ fl et $15,1 \pm 0,6574$ pg. En outre, une thrombocytose sensiblement secondaire et une leucocytose ont été signalés chez ces patients. Les complications d'endocrinopathies sont associées à la beta-thalassémie majeure de nos sujets sont l'hypogonadisme et l'ostéoporose 26.31%, déficit en GH 21.05%, Ainsi, Les caractéristiques biochimiques ont montré qu'il y a une surcharge en fer chez les patients par rapport aux témoins avec la ferritine sérique $1278 \pm 87,74$ ng / l vs $175,2 \pm 7,728$ ng / l.

Cependant le diagnostic moléculaire a été réalisé sur 19 enfants beta-thalassémiques. Nous avons choisi la méthode de miniséquençage à l'aide du kit SNaPshot™ (Applied Biosystem) puisqu'elle permet la recherche rapide des 4 mutations (Codon39, IVS-I-110, IVS-I-1, G6V) les plus communes et fréquentes du gène *HBB* et le séquençage direct par la méthode de Sanger pour détecter les mutations rares.

Les résultats obtenus montrent la présence des mutations différentes responsables de β -thalassémie avec une prédominance de la mutation non-sens du codon 39 (C > T) qui représente 84,21% des allèles étudiés. Trois autres mutations ont été décrite dans notre population : IVS-I-110 (G>A) qui représente une fréquence minoritaire (7,89%), cette mutation est associée avec la mutation non sens codon 39 (C>T). Deux rares mutations ont été observées avec des fréquences différentes, il s'agit du codon 54(-T) (5,26%), cette lésion est détectée chez une deuxième famille algérienne et la mutation du codon 27 (G > T) ou Hb Knossos (2,63%) qui représente une première association avec la mutation non sens du codon 39 (C > T) dans la population algérienne. Tandis que les mutations détectées du gène *HBB* ont des différents effets sur les variations des paramètres biologiques ainsi que sur l'aspect cytologique des hématies.

Mots clés : Beta-thalassémie, Mutations gène *HBB*, Diagnostic, enfants.