

## TABLE DES MATIERES

Remerciements .....	6
Table des matières .....	7
Table des figures .....	12
Table des tableaux.....	14
Table des annexes .....	14
Liste des abréviations et acronymes.....	15
Introduction .....	17
PARTIE 1 : Généralités sur la maladie [1] [2] [3].....	18
I/Données épidémiologiques [4] [5].....	18
I/1) Répartition Mondiale [6] [7] [8] [9] .....	18
I/2) Prévalence en France [11] [12] [13].....	20
II/ Quelques notions d'hématologie.....	20
II/1) L'hémoglobine [14] .....	20
II/1)1) Structure de l'hémoglobine.....	20
II/1)2) Les différentes hémoglobines [16].....	22
II/2) Le fer : un minéral essentiel [18] [19] .....	24
II/2)1) Rôles du fer.....	24
II/2)2) Distribution du fer dans l'organisme [20] .....	25
II/2)3) Circuit du fer dans l'organisme [21] .....	26
II/3) La production des globules rouges : l'érythropoïèse [22] [23] [24] .....	28
II/3)1) Mécanisme général .....	28
II/3)2) Régulation de l'érythropoïèse .....	29
III/ Aspect génétique des $\beta$ -Thalassémies.....	30
III/1) Anomalies génétiques liées à la pathologie [17] [25].....	30
III/2) Mode de Transmission d'une maladie autosomique récessive [26] [27] .....	33
IV/ Corrélation génotype-phénotype [28] [29] [30] .....	34
IV/1) La $\beta$ -Thalassémie Majeure ( $\beta$ -TM) ou Maladie de Cooley [31] [29] [32] .....	34

IV/2) La $\beta$ -Thalassémie Intermédiaire [12] .....	35
IV/3) La $\beta$ -Thalassémie mineure ou 'Trait $\beta$ -Thalassémique' .....	36
V/ Physiopathologie des différentes $\beta$ -Thalassémies [33] [34] [13] .....	37
V/1) Conséquences primaires de la $\beta$ -Thalassémie .....	37
V/1)1) Conséquences d'un faible taux ou d'une absence de globines $\beta$ .....	37
V/1)2) Conséquences de l'excès de chaîne de globines $\alpha$ [29] [13].....	38
V/2) Conséquences secondaires de la $\beta$ -Thalassémie [1] [37] [38] .....	40
V/2)1) La surcharge en fer et ses complications [39] [40] [29].....	40
V/2)2) Complication neuropsychologique [54] [55] [29].....	47
V/2)3) Hématopoïèse extramédullaire [12] [55] [56] .....	48
V/2)4) Complications thromboemboliques [44] [57] [43] .....	48
V/2)5) Complications rénales [58].....	49
V/2)6) Complications infectieuses.....	49
VI/ Diagnostic & données biologiques et biochimiques [59] [60] .....	49
VI/1) Bilans biologiques [61].....	49
VI/1)1) Bilan de l'anémie [62] [63] [31] .....	49
VI/1)2) Autres bilans biologiques perturbés .....	50
VI/2) Analyses des hémoglobines [64] [31] [59] [13] .....	51
VI/2)1) Techniques courantes [65] .....	51
VI/2)2) Analyses complémentaires [65] .....	53
VI/3) Diagnostic différentiel [65] [31] .....	54
VI/4) Etude des mutations [13] [66] [67].....	55
VI/5) Circonstances du diagnostic [68] [1].....	55
<b>PARTIE 2 : Traitements conventionnels .....</b>	<b>57</b>
I/ La transfusion sanguine .....	57
I/1) Place de la transfusion dans le traitement des $\beta$ -Thalassémies [69].....	57
I/1)1) Patients concernés [70] [12].....	57
I/1)2) Intérêt de la transfusion .....	57
I/1)3) Régime transfusionnel [29] [71] .....	58
I/2) La transfusion en pratique [13] [72] [73] .....	59
I/2)1) Bilan pré-transfusions.....	59
I/2)2) Déroulement d'une transfusion en France .....	59

I/2)3) Suivi post-transfusionnel .....	60
I/3) <i>Risques et complications</i> [1] [62] [72] [73] .....	61
I/3)1) Accidents immunologiques [75] .....	61
I/3)2) Accidents non immunologiques de la transfusion sanguine [73] .....	63
II/ Traitement de la surcharge en fer : Les chélateurs .....	65
II/1) <i>Place des chélateurs dans le traitement de la <math>\beta</math>-Thalassémie</i> [12] [13] [77] .....	65
II/2) <i>Les molécules disponibles</i> [29] [78] [79] .....	65
II/2)1) La Déféroxamine [80] [81] [82] .....	66
II/2)2) La Défériprone [86] .....	68
II/2)3) Le Déférasirox [87] .....	69
II/2)4) La Bithérapie : Une possibilité ? .....	71
II/2)5) Recommandations officielles [86] [92] [93] [94] [95] .....	73
II/3) <i>Suivi de la surcharge en fer</i> [96] [97] [98] .....	73
II/3)1) Dosage de la ferritine .....	74
II/3)2) Biopsie hépatique .....	74
II/3)3) Méthode SQUID (Biomagnétométrie) [3] .....	74
II/3)4) IRM [99] .....	75
III/ La splénectomie .....	75
III/1) <i>Place de la splénectomie dans le traitement de la <math>\beta</math>-Thalassémie</i> [12] .....	75
III/2) <i>Conséquence de la splénectomie</i> [100] .....	76
III/3) <i>Suivi des patients splénectomisés</i> [100] .....	77
III/3)1. Les vaccinations .....	77
III/3)2. L'Antibiothérapie préventive .....	77
IV/ Hydroxycarbamide [13] [101] [102] .....	77
IV/1) <i>Place des inducteurs de l'HbF dans le traitement de la <math>\beta</math>-Thalassémie</i> [103] [104] .....	77
IV/2) <i>Données pharmacologiques</i> .....	78
IV/3) <i>Posologie et mode d'administration</i> .....	79
IV/4) <i>Effets secondaires de l'Hydroxycarbamide</i> .....	79
IV/5) <i>Surveillance du traitement</i> [106] .....	80
V/ La Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) [107] [24] .....	80
V/1) <i>Place de la greffe de CSH dans le traitement de la <math>\beta</math>-Thalassémie</i> [108] .....	80
V/2) <i>Modalités de la greffe de cellules souches hématopoïétiques</i> [109] [110] .....	81

V/2)1) Avant la Greffe : la préparation du receveur .....	81
V/2)2) Quel donneur ?.....	83
V/2)3) Quelles cellules pour le greffon?.....	84
V/2)4) La transplantation .....	85
V/3) <i>Suivi post-greffe [109] [115]</i> .....	85
V/3)1) Suivi immédiat.....	85
V/3)2) Prévention de la Maladie du Greffon Versus Hôte (MGVH) [116].....	86
V/3)3) Rejet du greffon .....	86
V/3)4) Réduction de la surcharge martiale .....	87
V/4)5) Maladie veino-occlusive [117] .....	87
VI/ Conclusion sur les recommandations officielles .....	88
VI/1) <i>Les limites des traitements symptomatiques</i> .....	88
VI/2) <i>Les limites du traitement curatif par la greffe de CSH</i> .....	89
<b>PARTIE 3 : Nouvelles pistes thérapeutiques.....</b>	<b>90</b>
I/ Amélioration de la prise en charge de la surcharge en fer.....	90
I/1) <i>Prévenir la surcharge en fer : induire l'hepcidine [118]</i> .....	90
I/1)1) Présentation de l'hepcidine.....	90
I/1)2) Les agonistes de l'hepcidine, outils thérapeutiques [120] [124] .....	95
I/1)3) Une potentielle cible thérapeutique: l'érythroferrone [12] [132].....	98
I/2) <i>Améliorer la chélation : développer de nouvelles molécules [89] [135] [136]</i> .....	100
I/3)1) La Deferitine : un premier échec [135] [137].....	101
I/3)2)Le Deferitazole (FBS0701 ou SPD602) [138] .....	102
I/3)3) SP-420 [136] [139] .....	102
I/3) <i>Autres stratégies de régulation de la surcharge en fer [140]</i> .....	104
I/3)1) L'apotransferrine [12] [141] .....	104
I/3)2) Les inhibiteurs de HIF2 $\alpha$ [142] [143] .....	104
II/Correction de l'anémie [144].....	105
II/1) <i>Les inhibiteur de Jak2 : INC424 [12]</i> .....	105
II/1)1) Jak2, son rôle dans la $\beta$ -Thalassémie .....	105
II/1)2) INC424 (ruxolitinib) [145] [146].....	105
II/2) <i>Les pièges à ligands</i> .....	106
II/2)1) GDF-11, son rôle dans la $\beta$ -Thalassémie [147] .....	106

II/2)2) Les molécules [148] [149].....	106
II/3) HSP70 ( <i>Heat Shock Protein70</i> ) [155] [156].....	110
II/3)1) HSP70, son rôle dans la $\beta$ -Thalassémie [157].....	110
II/3)2) HSP70, son utilisation thérapeutique.....	111
III/ Correction et prévention de l'anomalie génétique .....	112
III/1) <i>La thérapie génique</i> .....	112
III/1)1) Principe et challenge de la thérapie génique ex vivo [158] .....	112
III/1)2) Vectorisation [159] [160].....	113
III/1)3) Etapes cliniques de la thérapie génique.....	119
III/1)4) Les essais cliniques [170].....	120
III/1)5) La thérapie génique: de multiples possibilités thérapeutiques [170] [187] .....	131
III/1)6) Conclusion sur les thérapies géniques [195] [196] .....	133
III/2) <i>L'espoir thérapeutique d'un diagnostic particulier</i> .....	135
III/2)1) Les deux types de diagnostics anténataux [1] [197] [198] [199] .....	135
III/2)2) Le double diagnostic préimplantatoire [198].....	136
III/2)3) Le double DPI : entre éthique et législation [207] [208] [209].....	142
Conclusion.....	150
Bibliographie .....	152
ANNEXES .....	168

# TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Les foyers $\beta$ -Thalassémiques [10] .....	19
Figure 2 : Représentation du tétramère d'hémoglobine avec 2 chaînes $\alpha$ et deux chaînes $\beta$ (à gauche). Structure organique de l'hème (à droite). [15] .....	22
Figure 3: Globines humaines en fonction du stade de développement et leur site de synthèse .....	23
Figure 4 : Les différentes combinaisons hémoglobiniques et leurs gènes correspondants [17] .....	24
Figure 5 : Schéma de l'érythropoïèse [23]. .....	28
Figure 6 : Les mutations les plus fréquentes en fonction des populations [3] .....	32
Figure 7 : Arbre généalogique d'une famille dont les deux parents sont porteurs d'une mutation [27] .....	33
Figure 8 : Physiopathologie générale de la $\beta$ -Thalassémie [29] .....	39
Figure 9 : Déformation mandibulaire chez un patient $\beta$ -TM de 6ans1/2 [53] .....	45
Figure 10 : Electrophorèse d'un patient atteint de $\beta$ -Thalassémie majeure [53] .....	54
Figure 11 : A gauche la DFO seule, à droite le complexe DFO-fer [83] .....	66
Figure 12 : A gauche le DFP, à droite le complexe DFP-fer [83] .....	68
Figure 13 : La molécule de DFX à gauche et le complexe DFX-fer à droite [88] .....	70
Figure 14 : La molécule d'Hydroxycarbamide [105] .....	78
Figure 15 : Interaction ferroportine-hepcidine et son impact sur la régulation du fer [121] .....	91
Figure 16 : Expérience montrant l'effet de l'hepcidine sur l'état clinique de souris $\beta$ -Thalassémiques. [122] [118] .....	92
Figure 17 : Voies de régulation de la synthèse hépatique d'hepcidine chez des sujets sains et localisation des cibles potentielles pour traiter la $\beta$ -Thalassémie [21] [120] .....	93
Figure 18 : Régulation indirecte du relargage du fer par l'érythroferrone [132] .....	99
Figure 19 : La molécule de desferrithiocine et ses analogues de synthèse [135] [136] .....	101
Figure 20 : Comparaison des Cinétiques d'excrétion biliaire du fer chez des rats non surchargés en fer en fonction du chélateur administré (dose du chélateur de 300 $\mu$ mol/kg). [136] .....	103
Figure 21 : L'action des pièges à GDF-11 sur la physiopathologie de la $\beta$ -Thalassémie [150] .....	107
Figure 22 : Organisation des deux générations du gène du vecteur LentiGlobin <sup>TM</sup> [162] [163] .....	114
Figure 23 : Configuration schématique des 3 principaux plasmides et principe de la production du lentivirus LentiGlobin <sup>TM</sup> HPV569 par transfection de ces plasmides [168] [169] .....	117
Figure 24 : Protocole clinique de thérapie génique [169] .....	119
Figure 25 : Concentration de l'hémoglobine dans le sang du patient X (les flèches rouges représentent les transfusions et les bleues les phlébotomies). [159] .....	121

Figure 26 : Comparaison de l'efficacité des deux vecteurs BB305 et HPV569 in vitro [163].....	125
Figure 27 : Organisation du vecteur lentiviral TNS9 [161]. .....	129
Figure 28 : Organisation du vecteur GLOBE [161]. .....	130
Figure 29 : Déroulement de l'ICSI [204] .....	139
Figure 30 : Développement d'un embryon et sa division en blastomères [205] .....	139
Figure 31 : Ponction de blastomère en vue de leur biopsie [204] .....	140
Figure 32 : Processus du double DPI [206] .....	142

Rapport-Gratuit.com

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Distribution du fer et valeur biologique à l'état physiologique normal .....	25
Tableau 2 : Valeurs biologiques des différents paramètres pris en compte dans le diagnostic des $\beta$ -Thalassémies [65] [29].....	53
Tableau 3 : Résultats préliminaires des essais cliniques de Phase II dans la $\beta$ -Thalassémie pour le sotatercept et le luspatercept [148] : effet de la dose sur le taux d'hémoglobine et sur les besoins transfusionnels. ....	109
Tableau 4 : Résultats de l'essai clinique (LentiGlobin <sup>TM</sup> HPV569) [174] .....	123
Tableau 5 : Bilan des essais menés sur 7 patients $\beta$ -Thalassémiques majeures avec le LentiGlobin <sup>TM</sup> BB305.....	127
Tableau 6 : Evolution des pratiques de diagnostics génétiques en France et dans le Monde [198].	146

## TABLE DES ANNEXES

Annexe 1: Fiche de suivi du patient [224] .....	169
Annexe 2: Proposition de fiche informative destinée au patient [1] [2] [3] [227].....	170
Annexe 3: Tableau comparatif des chélateurs du fer [79] [226] .....	172
Annexe 4: Diagramme des possibilités thérapeutiques officiellement recommandées .....	173
Annexe 5: Critère d'inclusion des patients $\beta$ -Thalassémiques majeurs dans l'essai clinique du LentiGlobin <sup>TM</sup> BB305 [175].....	174
Annexe 6: Données de l'Agence de Biomédecine [227] .....	175

## LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN : Acide DésoxyriboNucléique	FSH : Hormone Folliculo-Stimulante
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	GATA : Facteur de Transcription
AMP : Assistance Médicale à la Procréation	G-CSF : Granulocyte- Colony Stimulating Factor
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé	GDF : Growth Differentiation Factor
ARN : Acide RiboNucléique (si : Small Interfering)	GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone
ATP : Adénosine TriPhosphate	HAMP : Hecpidin Antimicrobial Peptide
BMP : Bone Morphogenic Protein	HAS : Haute Autorité de Santé
BPF : Bonne Pratique de Fabrication	Hb : Hémoglobine
CCNE : Comité Consultatif National d'Ethique	HbA <sub>1</sub> /A <sub>2</sub> : Hémoglobine Adulte
Cf : Confer	HbE : Hémoglobine E
CGR : Concentré de Globules Rouges	HbF : Hémoglobine Fœtale
CHF : Concentration Hépatique en Fer	HCG : Hormone Chorionique Gonadotrope
CMV : Cytomegalovirus	HEK : Human Embryonic Kidney
CPDPN : Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal	HFE : High Fer
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique	HIF : Hypoxia Inducible Factors
EMA : European Medicines Agency	HJV : Haemojuvelin
EPO : Erythropoïétine	HLA : Human Leukocyte Antigen
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases	HPLC : High Performance Liquid Chromatography
GR : Globule Rouge	HSP : Heat Shock Protein
DFO : Déféroxamine	ICSI : Injection intra cytoplasmique de spermatozoïde
DFP : Défériprone	Ig : Immunoglobuline
DFX : Déférasirox	IMG : Interruption Médicale de Grossesse
DPN : Diagnostic PréNatal	iPSC : Cellule Souche Pluripotente induite
DPI : Diagnostic PréImplantatoire	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
FDN : Fiche de Distribution Nominative	JAK : Janus Kinase
FIT : Fiche d'Incident Transfusionnel	LCR : Locus Control Region
FIV : Fécondation In Vitro	LH : Hormone Lutéinisante

MGVH : Maladie du Greffon Versus Hôte  
MOI : Multiplicity Of Infection  
MT : Matriptase  
pb : paire de base  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PNDS : Protocole National de Diagnostic et de Soins  
RAI : Recherche d'Agglutinine Irrégulière  
ROS : Reactive Oxygen Species  
SAL : Serum Anti-Lymphocytaire  
SIN : Self Inactivating  
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nucleases  
TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine  
Tf : Transferrine  
TGF : Transforming Growth Factor  
TI : Thalassémie Intermédiaire  
TD : Transfusion Dépendant  
TM : Thalassémie Majeure  
VCN : Virus Copy Number  
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
VGM : Volume Globulaire Moyen

## INTRODUCTION

La  $\beta$ -Thalassémie est une pathologie héréditaire présentant une répartition géographique inégale. Rare en France, elle est beaucoup plus fréquente dans d'autres régions du globe et se place aujourd'hui comme une problématique de santé grandissante.

Cette maladie génétique est caractérisée par une synthèse déficiente de la chaîne  $\beta$ -Globine, un des composants les plus importants de l'hémoglobine adulte. Non prise en charge, elle entraîne le décès des malades dans l'enfance.

Depuis plus de trente ans, le duo transfusion-chélateur constitue la base des traitements symptomatiques actuellement recommandés. Contraignants pour le patient, ils ne permettent pas toujours de contrôler la surcharge en fer induite par la pathologie et les transfusions à répétition. Cette surcharge en fer est délétère pour de nombreuses fonctions organiques, et est ainsi facteur de comorbidité. A l'heure actuelle, seule la greffe de cellules souches hématopoïétiques permet une guérison complète de la  $\beta$ -Thalassémie, elle n'est malheureusement pas une réussite ou bien envisageable pour tous les patients.

Face à ce constat d'impasse thérapeutique, de nombreuses recherches ont été entreprises depuis 10ans afin d'améliorer la prise en charge des patients, de diminuer les contraintes liées aux traitements chroniques actuels, et de tendre vers un accès à la guérison pour tous les patients atteints de  $\beta$ -Thalassémie.

Cette thèse s'établit en trois parties. La première expose la pathologie, son origine génétique et ces nombreuses répercussions sur l'organisme. La seconde partie présente l'arsenal thérapeutique actuellement employé, et ses limites menant à l'impasse thérapeutique. Enfin, la dernière partie explore les pistes scientifiques qui présentent un réel potentiel thérapeutique dans la  $\beta$ -Thalassémie; entre améliorations des outils actuels et vraies avancées menant à l'éviction du gène pathologique, régies par les limites de la science et de l'éthique.

## PARTIE 1 : GENERALITES SUR LA MALADIE [1] [2] [3]

### I/Données épidémiologiques [4] [5]

La Drépanocytose et les Thalassémies sont les principales pathologies de l'hémoglobine, et elles forment une problématique de santé non négligeable pour 71% des 229 pays du globe. Sachant que ces mêmes pays représentent 89% des naissances mondiales, ce sont donc près de 330000 enfants qui naissent chaque année avec une hémoglobinopathie, dont 17% d'entre eux avec une Thalassémie. Ainsi, d'après les chiffres de l'OMS, 7% des femmes enceintes sont porteuses d'allèles mutés responsable de cette pathologie génétique, et au final, dans la population mondiale, 1 couple sur 100 présente des risques de transmission pour sa descendance.

Les Thalassémies figurent donc parmi les maladies génétiques les plus répandues dans le monde.

#### I/1) Répartition Mondiale [6] [7] [8] [9]

Le terme Thalassémie provient du grec 'thalassa', la mer, et de 'haema' le sang, en référence à la localisation des premiers cas. En effet, La  $\beta$ -Thalassémie est à l'origine prévalente dans les pays du pourtour méditerranéen (Sardaigne, Chypre, Grèce), mais est également très présente en Inde (près de 20millions de personnes concernées par les mutations), en Asie centrale, dans le sud de la Chine, au Moyen-Orient.

L'incidence moyenne dans le monde, représentative du nombre de nouveaux cas par an, est de 1 personne atteinte sur 100000.

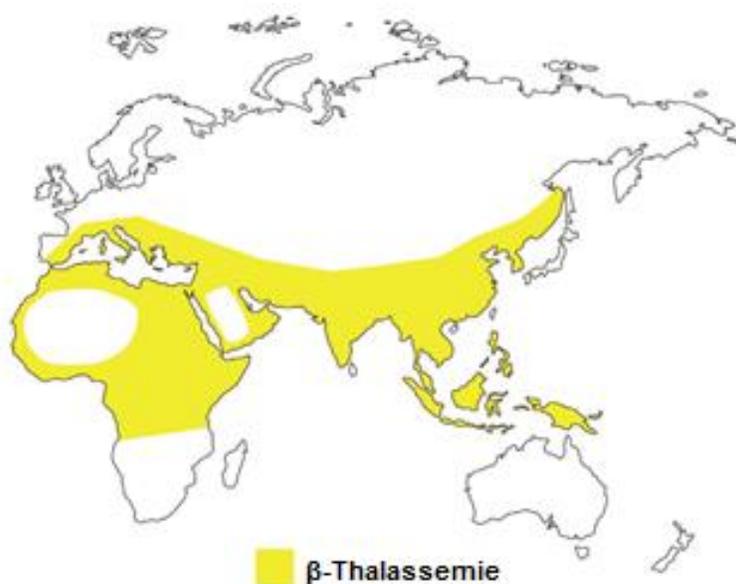


Figure 1 : Les foyers  $\beta$ -Thalassémiques [10]

A l'instar de la drépanocytose, une autre hémoglobinopathie, la  $\beta$ -Thalassémie est fréquemment rencontrée dans les régions où le paludisme est également endémique. En effet, les modifications érythrocytaires engendrées par ces pathologies attribuent aux porteurs hétérozygotes de la mutation une certaine protection face à l'infection par le *Plasmodium falciparum*. Une théorie montre une diminution de l'adhérence entre les cellules affectées par le parasite et les cellules endothéliales, ce qui minimise les inflammations micro vasculaires habituellement manifestées dans le paludisme. Une autre hypothèse avance que le cycle de reproduction du parasite est perturbé chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques, limitant la prolifération du parasite dans l'organisme.

Avec les phénomènes migratoires actuels et la mobilité croissante de la population mondiale, cette pathologie à l'origine endémique voit sa prévalence progressivement augmentée dans d'autres régions. Elle s'est propagée depuis le bassin méditerranéen à tout le territoire européen, américain (nord et sud), australien. Ces pathologies représentent donc un problème de santé publique grandissant, et nécessitent une prise de conscience suivie d'une mise en place de programmes thérapeutiques adaptés dans les pays auparavant non concernés par les  $\beta$ -Thalassémies.

En Europe, la  $\beta$ -Thalassémie est la deuxième maladie rare la plus répandue, après la drépanocytose (une maladie rare est définie par une prévalence seuil d'1 personne atteinte sur 2000). Une mutation nouvellement découverte dans une famille française, avec un génotype global plus proche de

celui des européens du nord que de celui de la population méditerranéenne, témoigne de l'évolution de la distribution de la maladie.

## I/2) Prévalence en France [11] [12] [13]

Chaque année, 5 à 10 nouveaux cas de  $\beta$ -Thalassémies, majeures ou intermédiaires, sont découverts.

En 2014, 570 patients étaient répertoriés en France, dont 70% étaient atteints de la forme majeure. La prévalence estimée, correspondant au nombre de cas dans la population française à un instant t, était de 0,5/100000 personnes. Pour comparaison, cette prévalence est similaire à celle de l'Allemagne ou de la Belgique, et est un peu plus faible que celle enregistrée en Angleterre.

Un registre national officiel, instauré depuis 2005, permet de suivre l'évolution de la maladie. Un tel registre recueille non seulement les données épidémiologiques mais permet également un suivi de l'évolution des thérapies, évaluant ainsi la qualité de la prise en charge globale et l'amélioration de celle-ci avec les nouvelles stratégies de traitement.

## II/ Quelques notions d'hématologie

### II/1) L'hémoglobine [14]

#### *II/1)1) Structure de l'hémoglobine*

L'hémoglobine (Hb) est la principale protéine contenue dans les globules rouges (elle représente 95% des protéines intraérythrocytaires). Elle a pour rôle physiologique d'assurer le transport de l'oxygène (O<sub>2</sub>) des poumons vers les tissus. A l'inverse, l'Hb permet aussi la prise en charge du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) des organes vers les poumons.

L'hémoglobine est un tétramère, constitué de 4 protomères identiques 2 à 2.

Chaque protomère est composé d'une globine (chaîne de glycoprotéines globulaires) et d'hème (groupement prosthétique).

### •Les globines

Les globines, synthétisées dans l'érythroblaste, sont formées d'une seule chaîne polypeptidique. 9 gènes différents codent pour ces chaînes polypeptidiques. Le tétramère peut donc finalement se présenter sous de multiples formes de par la diversité des chaînes polypeptidiques de globines.

Les 9 gènes à l'origine des globines sont localisés sur 2 chromosomes différents :

- Sur le chromosome 16, on trouve 4 gènes du 'cluster\* $\alpha$ ' :  
 **$\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\zeta 1$ ,  $\zeta 2$**
- Sur le chromosome 11, 5 gènes du 'cluster  $\beta$ ' sont présents :  
 **$\delta$ ,  $g\gamma$ ,  $a\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$**  (Les gènes  **$g\gamma$**  et  **$a\gamma$**  sont strictement identiques, excepté au niveau du codon 136, codant une glycine pour l'un et une alanine pour l'autre).

Les 4 chaînes polypeptidiques s'assemblent par 2 pour former deux dimères fonctionnels au sein d'une Hb. (2 globines du cluster  $\alpha$  associées à 2 globines du cluster  $\beta$ ).

*\*Cluster : Génétiquement parlant, un **cluster de gènes** est un ensemble de gènes issus de la même famille, et juxtaposés au niveau de la même région chromosomique, appelée un locus.*

### •L'hème

A l'intérieur de chaque globine se situe une partie non protéique, l'hème. L'hème résulte de l'association entre une protoporphyrine de type IX et d'un atome de fer ferreux,  $Fe^{2+}$ , central. Cet atome de fer, hexacoordinable, établit une liaison avec l' $O_2$  permettant ainsi son transport tissulaire. Au maximum, 4 molécules d' $O_2$  peuvent donc être transportées par une molécule d'Hb.

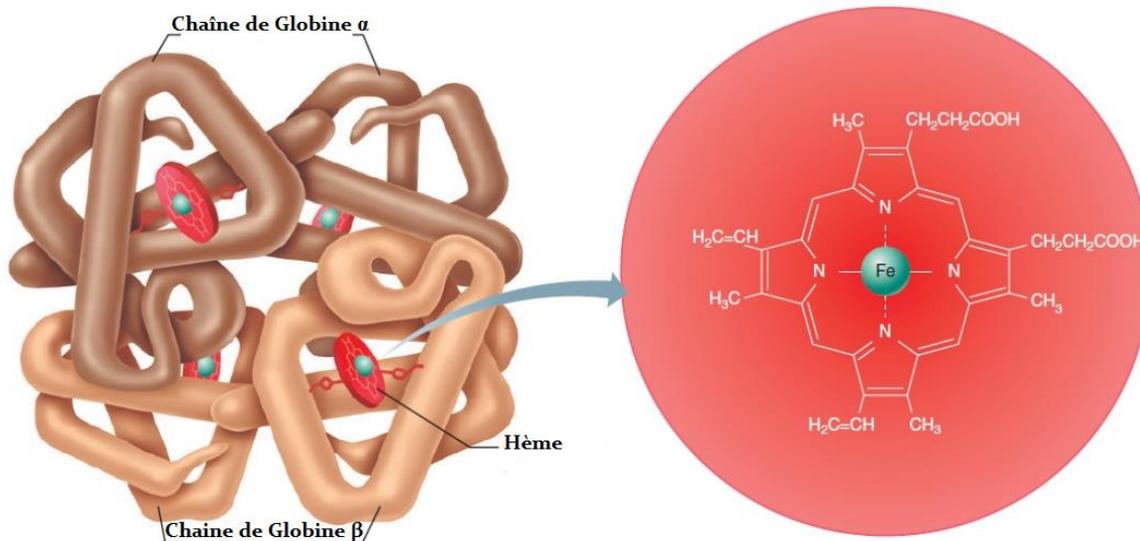


Figure 2 : Représentation du tétramère d'hémoglobine avec 2 chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$  (à gauche). Structure organique de l'hème, la protoporphyrine de type IX et l'atome de fer (à droite). [15]

## II/1)2) Les différentes hémoglobines [16]

Selon le stade de développement de l'homme, la composition de l'hémoglobine évolue. Les sites de synthèse des globules rouges varient également au cours du développement.

### II/1)2)a. Les gènes exprimés à chaque stade de développement

Concernant les gènes du cluster  $\alpha$ , les gènes  $\zeta 1$  et  $\zeta 2$  sont prédominants jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine de vie embryonnaire.

Au 2<sup>ème</sup> trimestre, débute l'expression des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ .

Concernant les gènes du cluster  $\beta$ ,  $\epsilon$  est transcrit durant les 6 premières semaines de vie embryonnaire, puis le relais est pris par les gènes  $\gamma$  et  $\delta$ .

Le gène  $\beta$  débute son expression au troisième trimestre, quelques semaines avant la naissance et devient majoritaire à 6 mois de vie ; les gènes  $\gamma$  et  $\delta$  n'ont alors plus qu'une faible expression résiduelle. Le gène  $\delta$ , ne différant que de quelques nucléotides avec le gène  $\beta$ , est activé après quelques mois de vie, avec une expression faible et constante tout au long de la vie.

Les gènes exprimés du cluster  $\beta$  subissent donc plus de variations, dites 'commutations', au cours du développement que les gènes du cluster  $\alpha$ . Les gènes  $\beta$  sont donc plus sujets à présenter des anomalies génétiques que les gènes  $\alpha$ .

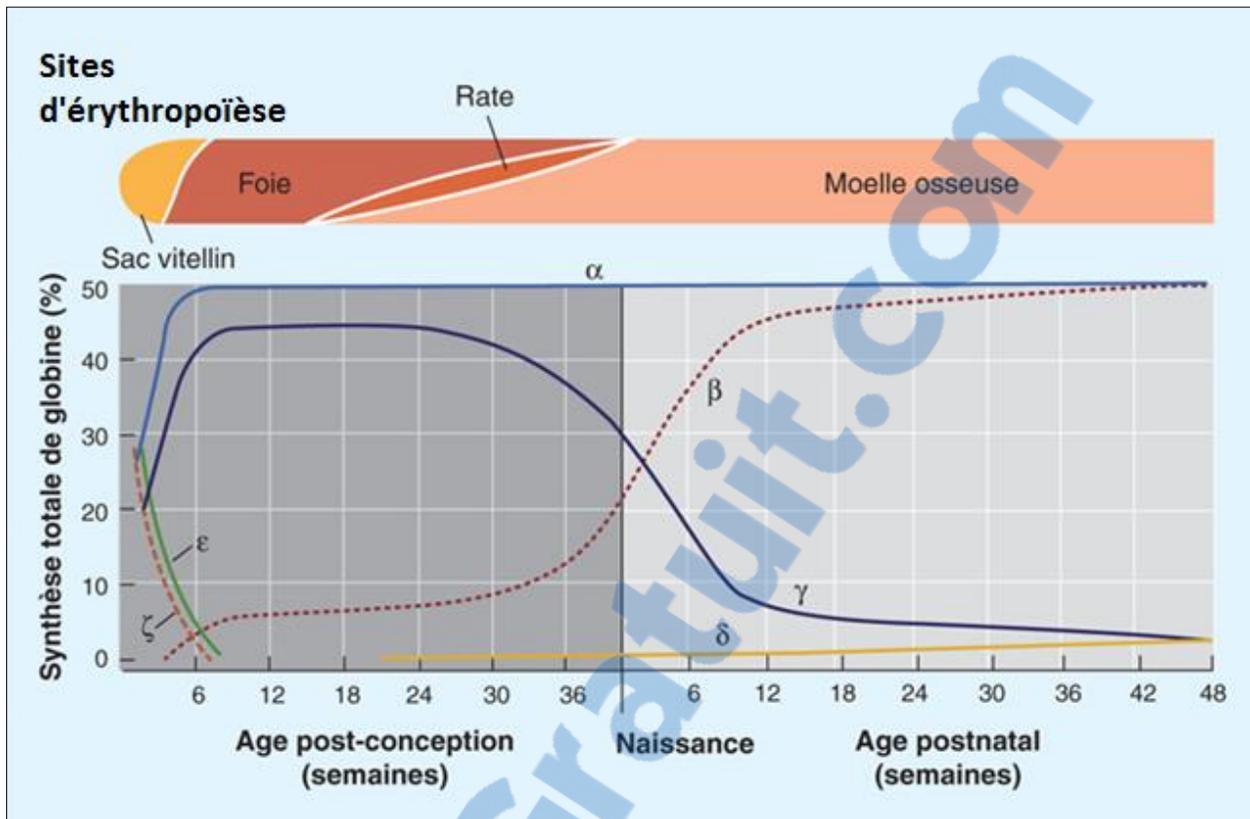


Figure 3: Globines humaines en fonction du stade de développement et leur site de synthèse [13]

### II/1)2)b. Les hémoglobines présentes aux différents stades de développement

Les combinaisons possibles des globines du cluster  $\alpha$  associées aux globines du cluster  $\beta$  à chaque stade de développement vont alors correspondre aux hémoglobines synthétisées à ces stades.

Durant la période embryonnaire correspondant aux 8 premières semaines de développement, trois hémoglobines différentes sont synthétisées : Hb Gower 1 (de combinaison génétique  $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Gower 2 (de combinaison génétique  $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Portland (de combinaison génétique  $\zeta_2\gamma_2$ ).

Chez le fœtus, (de la 9<sup>ème</sup> semaine de développement jusqu'à la naissance), l'hémoglobine F (HbF) est prépondérante; son taux à la fin de la grossesse est de 60 à 80%. L'HbF est composée systématiquement de deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes variables  $\gamma$ , ( $g\gamma$  ou  $a\gamma$ ). Elle est synthétisée au niveau du foie et de la rate.

De la naissance jusqu'au 6<sup>ème</sup> mois de vie, le taux d'HbF diminue par répression (taux inférieur à 0.5% chez l'adulte) : l'hémoglobine A1 (HbA1, de combinaison génétique  $\alpha_2\beta_2$ ) devient donc majoritaire de façon définitive, à un taux de plus de 95% chez l'adulte. L'hémoglobine A2 (HbA2, de combinaison

génétique  $\alpha_2\delta_2$ ) est également synthétisée, avec un taux d'environ 3% chez l'adulte. Elle n'a pas de rôle physiologique.

Les HbA sont synthétisées dans la moelle osseuse.

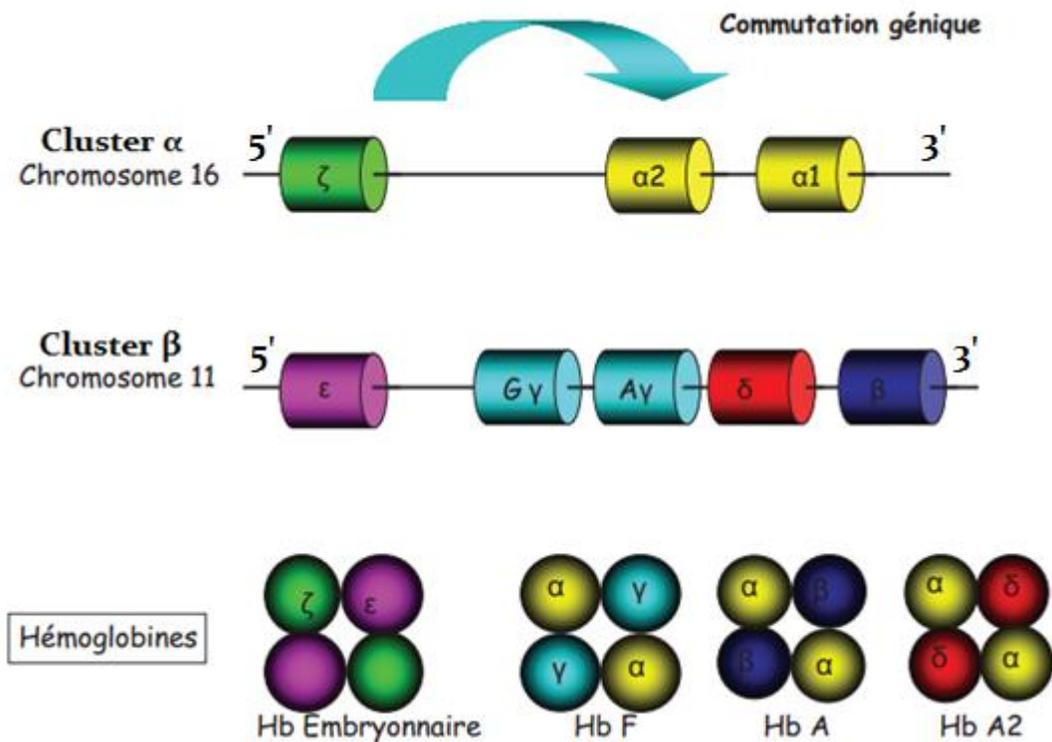


Figure 4 : Les différentes combinaisons hémoglobiniques et leurs gènes correspondants [17]

## II/2) Le fer : un minéral essentiel [18] [19]

### II/2)1) Rôles du fer

Le fer est nécessaire au bon fonctionnement de tous les types de cellules. Il intervient dans la respiration cellulaire et la synthèse d'ADN, d'ARN ou de protéines.

Concernant le globule rouge, le fer est un facteur limitant de l'érythropoïèse puisqu'il est indispensable à la synthèse de l'Hb dans les précurseurs érythropoïétiques de la moelle osseuse. Intégré dans l'hème, il établit des liaisons permettant le transport tissulaire d'oxygène mais aussi de dioxyde de carbone, de protons.

Le fer, libre, est aussi un catalyseur de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sous leur forme radicalaire et possède ainsi un fort pouvoir oxydant. Ces ROS peuvent provoquer une peroxydation lipidique, inactiver des enzymes mais aussi casser des brins d'ADN. Le fer libre peut alors être responsable d'importantes lésions au niveau des tissus.

## *II/2)2) Distribution du fer dans l'organisme [20]*

Dans l'organisme le fer se trouve à l'état ferrique ( $Fe^{3+}$ ) ou ferreux ( $Fe^{2+}$ ), libre ou lié à des protéines. La liaison du fer à ces protéines limite donc la production de radicaux libres due au fer libre.

*Tableau 1 : Distribution du fer et valeur biologique à l'état physiologique normal*

	<b>Valeur Biologique Homme (H) Femme(F)</b>
<b>Compartiment fonctionnel : (total)</b>	80% du fer total
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hémoglobine (<math>Fe^{2+}</math>)</li> <li>• Myoglobine (<math>Fe^{2+}</math>)</li> <li>• Enzyme du métabolisme oxydatif</li> </ul>	H: 3g F: 2.5g H: 0.3g F: 0.2g H: 0.3g F: 0.2g
<b>Transport : (total)</b>	H/F: 4mg
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Transferrine (Tf)</u>            Cette glycoprotéine sérique est synthétisée par le foie en fonction des réserves en fer disponibles. Elle permet le transport plasmatique du fer ferrique (<math>Fe^{3+}</math>) jusqu'à la moelle osseuse et vers les lieux de stockage            La transferrine présente 2 sites de fixation au <math>Fe^{3+}</math>.</li> </ul>	H/F: 2 à 4g/L
- <u>La capacité totale de fixation en fer de la transferrine (CFT)</u> permet d'évaluer de façon fonctionnelle la concentration de la transferrine. (CFT = Taux de transferrine x 25).	H / F : 50-95 $\mu$ mol/L
- <u>Le coefficient de saturation en fer (CS)</u> est le rapport (en pourcentage) entre le fer sérique et la CFT. Il renseigne sur le transport du fer et sa livraison aux cellules.  Un taux de transferrine diminué est observé au cours des états de surcharge en fer. La CFT est alors également diminuée et le CS augmenté.	H/F: 20% - 45%  Si CS>65%: surcharge en fer génétique

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Récepteur soluble de la Tf (RsTf)</u>            Cette glycoprotéine membranaire est située à forte concentration au niveau des cellules utilisatrices du fer. Elle capte plus spécifiquement la transferrine portant du fer, le complexe RsTf-Tf est ensuite endocyté.             En situation de carence martiale ou d'activité érythropoïétique augmentée, le taux de RsTf augmente</li> </ul>	H/F : 0.76-1.76 mg/L
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Fer non lié à la Tf</u>            Quasi absent à l'état physiologique, ce pool augmente dès que le CST dépasse les 45%. Le fer peut alors être lié à l'albumine ou à des ligands de faible poids moléculaires (citrate, acétate).             Le fer libre, non lié à l'albumine, est toxique.</li> </ul>	
<b>Stockage : (total)</b>	H: 0,8 - 1g F: 0,4 - 0,5g
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Ferritine</u>            La ferritine est une glycoprotéine fixant le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) et permettant ainsi son stockage intracellulaire (surtout dans le foie). Cette réserve est rapidement mobilisable.             La concentration de la ferritine sérique est l'image des réserves du fer: 1 µg/L de ferritine sérique équivaut à environ 10 mg de réserve en fer. La ferritine est basse en cas de carence en fer et élevée en cas de surcharge.             La ferritine intra-érythrocytaire est également le reflet des réserves en fer, son dosage n'est cependant pas effectué en routine.</li> <li>• <u>Hémosidérine</u>            C'est une forme dégradée de la ferritine, non soluble, qui contient une proportion plus importante de fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>). Située dans les macrophages, elle forme une réserve difficilement mobilisable.</li> </ul>	H: 20-250µg /L F: 15-150µg /L
<b>Total</b>	H: 50-60mg/kg F: 40-50mg/kg

### *II/2)3) Circuit du fer dans l'organisme [21]*

- **Absorption intestinale**

Une alimentation équilibrée apporte environ 15mg/jour de fer ; seuls 5 à 10% de fer transitant par l'intestin sont absorbés, le reste est éliminé par les selles. L'absorption du fer ferreux se fait au niveau du pôle apical des entérocytes (au niveau du duodénum et de la partie supérieure du jéjunum), via un transporteur spécifique DMT1 présent sur la bordure en brosse. L'absorption du fer est dépendante des besoins de l'organisme et inversement proportionnelle à l'importance des réserves.

Dans l'entérocyte, le fer ferreux peut se lier à l'apoferritine pour former la ferritine. Il peut aussi être pris en charge par la ferroportine au pôle basal de l'entérocyte pour ensuite être oxydé en fer ferrique par l'héphaestine puis passer dans la circulation sanguine (lié à l'apotransferrine). Le fer est ensuite capté par endocytose par les cellules (moelle osseuse, foie, cellules du système réticulo-endothélial) grâce à des récepteurs Tf1 et Tf2, reconnaissant la transferrine.

Une hormone, l'hepcidine, joue un rôle important dans l'absorption intestinale du fer par une modulation négative sur la ferroportine.

- **Stockage**

Les hépatocytes et les cellules mononuclées du système des phagocytes (du foie, de la rate, de la moelle osseuse) sont les principaux lieux de stockage du fer (sous forme de ferritine ou d'hémosidérine).

- **Utilisation par la moelle osseuse**

La plupart du fer lié à la transferrine est utilisé pour l'érythropoïèse : le fer est alors intégré dans les érythroblastes permettant la synthèse de l'hémoglobine.

- **Recyclage par les macrophages**

Lors de leur apoptose, les globules rouges sont dégradés dans les macrophages, en particulier ceux de la rate. Le fer contenu dans leur hémoglobine est relargué, et stocké sous forme de ferritine dans les macrophages. Les macrophages redistribuent ensuite le fer en fonction des besoins, en majorité aux érythroblastes.

- **Élimination**

1 à 2mg de fer sont éliminés par jour, par la desquamation (de cellules intestinales, de peau ou des phanères), par perte sanguine ou par la sueur. Des variations ont lieu durant les menstruations, la grossesse, l'accouchement et l'allaitement chez la femme).

Chez l'adulte normal, les pertes quotidiennes en fer sont compensées par un apport alimentaire équilibré (apport en viande, œufs, légumes verts,..).

Le métabolisme du fer s'effectue donc en circuit fermé, l'équilibre entre les apports et l'élimination est primordiale. Un excès ou un manque de fer ont d'importantes conséquences physiologiques.

## II/3) La production des globules rouges : l'érythropoïèse [22] [23] [24]

### II/3)1) Mécanisme général

L'hématopoïèse est le processus global de production des cellules sanguines.

L'érythropoïèse désigne l'ensemble des mécanismes assurant la production des globules rouges, à raison de 200 milliards par jour, à partir des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH).

Les CSH sont produites à l'âge adulte par la moelle osseuse et sont initialement indifférenciées. Elles possèdent la capacité de s'auto-renouveler dans l'organisme, lorsqu'elles sont au contact des travées osseuses. Par une cascade de mécanismes cellulaires, les CSH se différencient en éléments fonctionnels des lignées sanguines : plaquette, hématie, lymphocyte, monocyte, polynucléaire.

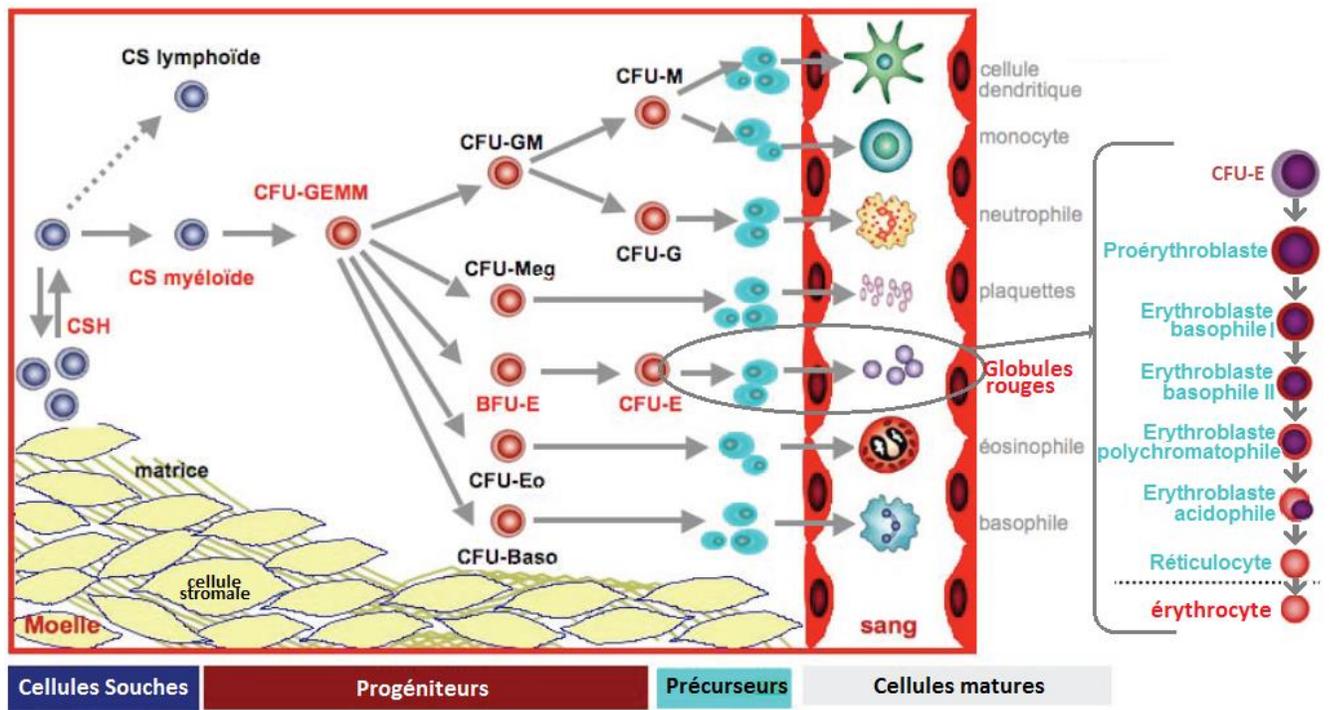


Figure 5 : Schéma de l'érythropoïèse [23]. Les CSH se différencient en 2 lignées : lymphoïde et myéloïde. Les progéniteurs de cette dernière sont les CFU-GEMM pour 'Colony Forming Unit - Granulocyte, Erythrocytes, Monocytes, Megacaryocytes'. Les BFU-E (Burst Forming Unit - Erythroblastic) ont perdu leur potentiel granulocytaire et mégacaryocytaire et sont engagées définitivement dans la lignée érythroïde. Au stade la CFU - E (Cell Forming Unit – Erythroblastic), la formation terminale d'hématies aboutie au bout de 5 à 8 jours.

## *II/3)2) Régulation de l'érythropoïèse*

Différents éléments interviennent dans la régulation de ce processus :

-L'EPO : L'érythropoïétine, élément régulateur majeur de l'érythropoïèse, est un facteur de croissance synthétisé par le rein (taux plasmatiques moyens : 5 à 30UI/L). L'hypoxie rénale stimule la sécrétion d'EPO. Lorsque l'EPO se fixe sur ses récepteurs, une cascade de signalisation est activée et provoque finalement la prolifération des érythroblastes. Les cellules qui possèdent le plus de récepteur à l'EPO sont les progéniteurs de la lignée érythroblastique, les proérythroblastes et les érythroblastes basophiles.

A l'état physiologique normal, Les érythroblastes polychromatophiles et acidophiles exercent un rétrocontrôle sur les proérythroblastes et les érythroblastes basophiles : la prolifération de ces derniers est réprimée et leur apoptose est induite.

Face à un excès d'EPO, tous les types d'érythroblastes possédant des récepteurs à l'EPO prolifèrent et se différencient, et le rétrocontrôle provoquant normalement l'apoptose des érythroblastes immatures est alors inefficace. Un nombre élevé d'érythroblastes immatures est donc produit.

-Au niveau génétique, la différenciation des érythroblastes est régulée par des facteurs de transcription (GATA-1 et EKLF).

-Des cytokines activatrices (IL3, IL9, IL11, SCF) ou inhibitrice (TNF- $\alpha$  ou Interferon-gamma) ciblent la prolifération de certains progéniteurs ou précurseurs.

-Des éléments sont limitant pour l'érythropoïèse : le fer, des vitamines (essentiellement la vitamine B12 (appelée cobalamine) et la vitamine B9 (acide folique)), des protéines, et des hormones (androgènes et thyroïdiennes).

La production des érythrocytes est assurée en continue. En situation physiologique normale, l'érythropoïèse s'adapte aux besoins de l'organisme: lors d'une perte sanguine, la production est accrue, inversement en cas de transfusion, elle doit diminuer.

## III/ Aspect génétique des $\beta$ -Thalassémies

### III/1) Anomalies génétiques liées à la pathologie [17] [25]

Les chaînes  $\alpha$  sont des protéines composées de 141 acides aminés et les chaînes  $\beta$  en contiennent 146. La modification d'un seul acide aminé peut engendrer de lourdes conséquences, notamment sur le plan clinique.

Plus de 200 anomalies génétiques différentes affectant les gènes des globines du cluster  $\beta$  peuvent être responsables de  $\beta$ -Thalassémies. De nouvelles mutations sont régulièrement découvertes, élargissant cette liste.

Selon le nombre d'acide aminés affectés et la localisation de la mutation sur le gène, celle-ci peut aboutir à des conséquences cliniques différentes. Les mutations ponctuelles sont largement les plus fréquentes (on compte 9 mutations ponctuelles, délétions ou insertion courte pour 1 délétion large).

Lorsque les mutations ponctuelles sont situées au niveau du promoteur ou des introns, elles ont généralement moins de conséquences que les mutations touchant les sites d'épissage ou que les mutations affectant une large partie du gène.

On distingue 3 types d'allèles  $\beta$ -Thalassémiques, selon la gravité de la mutation touchant le chromosome 11 :

- **Allèle  $\beta^0$  Thalassémique** : Inhibition totale de la synthèse des chaînes de globines  $\beta$ .

Type de mutations : On observe des mutations non-sens qui mettent fin à la transcription de l'ADN, ou encore des délétions/insertions de nucléotides décalant le cadre de lecture pour le codage des acides aminés. L'expression du gène  $\beta$ -globine est supprimée dans son intégralité ou presque en présence de ce type de mutations, notamment lorsque celles-ci touchent le codon d'initiation ou les sites d'épissages.

- **Allèle  $\beta^+$  Thalassémique** : Synthèse résiduelle de chaîne de  $\beta$ -globines, avec un taux plus ou moins fortement diminué ou synthèse erronée des chaînes de globine  $\beta$ , qui ne peuvent s'associer avec les chaînes  $\alpha$  pour former le tétramère d'Hémoglobine.

- **Allèles  $\beta^{++}$  Thalassémique** : Mutation avec un faible impact quantitatif sur la synthèse de la  $\beta$ -globine, sans ressenti pathologique chez le patient hétérozygote.

Type de mutations : Ces types de mutations diminuent l'expression du gène  $\beta$ -globines, elles concernent les régions régulatrices, régions 3', 5', ou le promoteur. Il est également observé des mutations faux-sens qui entraînent des anomalies sur la chaîne de globine.

A partir de ces différents tableaux génétiques, on distingue également 3 principaux types de  $\beta$ -Thalassémie clinique : majeure, intermédiaire, mineure, avec des conséquences d'intensité variable, en corrélation avec l'impact de la mutation.

Il existe d'autres formes génétiques de  $\beta$ -Thalassémie, complexes et souvent associées à des anomalies génétiques de l'hémoglobine autres que thalassémiques.

Par exemple, l'hémoglobinosose E, une pathologie caractérisée par la synthèse d'une hémoglobine anormale 'HbE' due à une substitution au niveau du 26<sup>ème</sup> codon du gène  $\beta$ -Globine, est fréquemment couplée à une mutation  $\beta$ -Thalassémique. Cette combinaison est portée par une large population d'Asie du Sud Est et représente dans cette région 50% des cas graves de  $\beta$ -Thalassémie. La classification de la pathologie HbE/ $\beta$ -Thalassémie est similaire à la celle de la  $\beta$ -Thalassémie seule et les traitements sont identiques.

Population	$\beta$ -gene Mutation	Severity
Indian	-619 del	$\beta^0$
Mediterranean	-101	$\beta^{++}$
Black	-88	$\beta^{++}$
Mediterranean; African	-87	$\beta^{++}$
Japanese	-31	$\beta^{++}$
African	-29	$\beta^{++}$
Southeast Asian	-28	$\beta^{++}$
Black	-26	$\beta^{++}$
Mediterranean; Asian Indian	IVS1-nt1	$\beta^0$
Mediterranean; Asian Indian	IVS1-nt5	$\beta^0$
Mediterranean	IVS1-nt6	$\beta^{+/++}$
Mediterranean	IVS1-nt110	$\beta^+$
Chinese	IVS2-nt654	$\beta^+$
Mediterranean	IVS2-nt745	$\beta^+$
Mediterranean	codon 39	$\beta^0$
Mediterranean	codon 5	$\beta^0$
Mediterranean; African-American	codon 6	$\beta^0$
Southeast Asian	codons 41/42	$\beta^0$
African-American	AATAAA to AACAAA	$\beta^{++}$
Mediterranean	AATAAA to AATGAA	$\beta^{++}$
Mediterranean	Hb Knossos	$\beta^{++}$
Southeast Asian	HbE	$\beta^{++}$

Figure 6 : Les mutations les plus fréquentes en fonction des populations ( $\beta^{++}$ ,  $\beta^+$ ,  $\beta^0$ : type d'allèle) [3]

Des anomalies peuvent également avoir lieu au niveau des chaînes  $\alpha$ , on parle alors de l'Alpha-Thalassémie, une autre hémoglobinopathie. Les Delta-Thalassémies existent mais ne sont pas pathologiques.

## III/2) Mode de Transmission d'une maladie autosomique récessive [26] [27]

La  $\beta$ -Thalassémie est une maladie génétique à Transmission Autosomique Récessive, comme la drépanocytose, la mucoviscidose, ou la phénylcétonurie.

### •Notions élémentaires

L'Homme possède 46 chromosomes situés dans le noyau des cellules. Ces chromosomes sont répartis en 23 paires, avec pour chaque paire, 1 chromosome hérité du père et 1 chromosome de la mère. Les 22 premiers chromosomes sont des autosomes: ils sont identiques pour les deux sexes. Le chromosome porteur des gènes des globines  $\beta$  étant situé sur le chromosome 16, un autosome, la  $\beta$ -Thalassémie est donc une pathologie autosomique.

Les gènes vont également par paires, et sont localisés précisément sur le chromosome au niveau d'un site appelé locus.

Si les deux copies du gène sont identiques, indemnes ou altérées, la personne est dite homozygote pour ce gène.

Si les deux copies du gène sont différentes, la personne est hétérozygote. Une copie du gène est altérée, mutée, l'autre copie du gène ne présente pas d'anomalie.

La  $\beta$ -Thalassémie est une maladie génétique dite récessive, elle s'exprime donc lorsque les 2 copies du gène sont mutées, lorsque la personne est homozygote pour ce gène. Une personne hétérozygote pour un gène muté au niveau du locus porteur des  $\beta$ -globines du chromosome 11 ne présente pas de tableau clinique  $\beta$ -Thalassémique.

### •Risques de Transmission

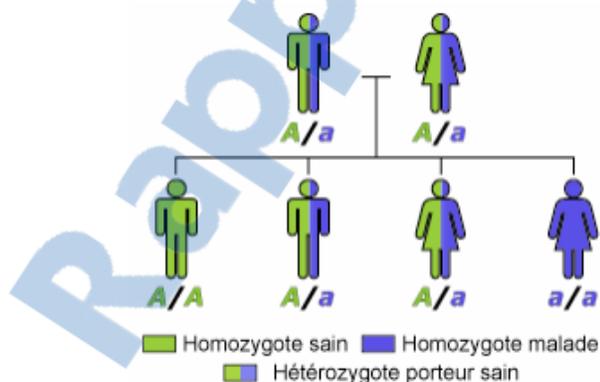


Figure 7 : Arbre généalogique d'une famille dont les deux parents sont porteurs d'une mutation [27]

Lorsque les deux parents sont hétérozygotes, formant un 'couple à risque', porteurs tous les deux d'une mutation au niveau du même gène, il existe 25% de risque d'avoir un enfant homozygote, et donc malade. Dans 50% des cas l'enfant est également hétérozygote, et dans 25% des cas, il hérite des 2 copies des gènes non mutés de ses parents, il n'est donc pas porteur du gène altéré.

L'un des problèmes des maladies autosomiques récessives réside dans le fait que les couples à risque l'ignorent souvent, les hétérozygotes n'étant pas symptomatiques, leur statut de porteur sain n'est pas forcément connu. C'est parfois seulement à la naissance d'un enfant malade que la présence d'une mutation chez les parents est décelée.

## IV/ Corrélation génotype-phénotype [28] [29] [30]

Les  $\beta$ -Thalassémies ont été réparties en trois grands types selon l'importance des signes cliniques exprimés. Il en existe cependant de nombreuses déclinaisons selon la variété et l'impact des mutations observées. La gravité des symptômes cliniques est directement proportionnelle à l'importance des mutations. Une analyse moléculaire de ces mutations peut ainsi donner des indications sur le futur état clinique des jeunes patients.

### IV/1) La $\beta$ -Thalassémie Majeure ( $\beta$ -TM) ou Maladie de Cooley [31] [29] [32]

- **Génotype:** Le plus souvent les patients sont homozygotes :  $\beta^0/\beta^0$  ou parfois porteur de la combinaison allélique suivante :  $\beta^+/\beta^0$ .
- **Critère clinique de classification:** Les patients nécessitant au moins 8 transfusions par an, avant l'âge de quatre ans, appartiennent à cette catégorie.
- **Diagnostic clinique:** Les  $\beta$ -Thalassémies ne sont symptomatiques qu'une fois la 'maturité hémoglobinique' atteinte, c'est-à-dire vers l'âge de 6 mois lorsque l'hémoglobine HbA1 devient majoritaire et que les hémoglobines HbA2 et HbF atteignent leur taux résiduel.

La  $\beta$ -TM se manifeste entre 6 mois et 2 ans par les symptômes d'une anémie sévère (pâleur, essoufflement), un possible ictère (yeux et peau jaunes), puis associés à une hépatosplénomégalie. Des anomalies morphologiques peuvent également alertées, accompagnées d'un retard staturo-pondéral.

Sans traitement, le tableau clinique d'un patient atteint de  $\beta$ -Thalassémie majeure est le suivant:

- Fatigue
- Essoufflement
- Pâleur
- Irritabilité
- Déformation osseuse faciale
- Ictère cutanéomuqueux
- Ralentissement de croissance
- Coloration noire des urines
- Abdomen protubérant

La clinique évolue avec l'âge et de nombreuses complications viennent s'ajouter à ce tableau, notamment dues aux effets secondaires des traitements. Ces complications font l'objet d'un paragraphe ci-après.

Avant la mise en place de traitement efficace, 50% des patients décédaient avant l'âge de 12ans, la longévité moyenne étant de 17ans. La  $\beta$ -Thalassémie a d'ailleurs été longtemps considérée comme une pathologie pédiatrique.

## [IV/2\) La \$\beta\$ -Thalassémie Intermédiaire \[12\]](#)

- **Génotype** : Le patient est hétérozygote ou homozygote, mais il possède deux copies du gène  $\beta$ -globine altérées avec les appariements suivants possibles:  
 $\beta^+/\beta^+$  ou  $\beta^+/\beta^0$
- **Critère clinique de classification**: La  $\beta$ -TI est également nommée forme 'non dépendante des transfusions sanguines', La probabilité de recevoir des transfusions est variable selon les formes génétiques. Appartiennent donc à cette catégorie les patients nécessitant moins de 8 transfusions annuelles à l'âge de 4ans, et gardant une fréquence de transfusion irrégulière en vieillissant.
- **Diagnostic Clinique** : Le diagnostic de cette forme n'est pas aisé. En effet, elle comprend un groupe très hétérogène de génotypes, avec un gradient de sévérité très large selon les mutations exprimées. Les manifestations cliniques varient donc selon les patients. L'anémie est cependant toujours présente, mais s'exprime plus tardivement (à environ l'âge de 4ans)

que pour les  $\beta$ -TM, et devient de plus en plus grave avec les années. Cette anémie chronique est possiblement ponctuée d'épisodes aigus (en général provoqués par des infections).

### IV/3) La $\beta$ -Thalassémie mineure ou 'Trait $\beta$ -Thalassémique'

- **Génotype** : Le patient est hétérozygote. Une seule des deux copies du gène est  $\beta^+$  ou  $\beta^0$ .
- **Critère clinique de classification**: Le plus souvent les patients sont asymptomatiques, dits 'porteur sain'. Seule une légère anémie peut être détectée lors d'un diagnostic biologique.

La corrélation génotype-phénotype est donc confirmée dans une majorité des cas. Cependant, il arrive que certains génotypes homozygotes présentent des phénotypes moins graves que certains génotypes hétérozygotes : tout dépend toujours de l'importance du déséquilibre quantitatif entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . La règle n'est donc pas absolue.

D'autre part, un patient atteint à la fois d'une  $\beta$ -Thalassémie et d'une  $\alpha$ -Thalassémie présente des manifestations cliniques moins sévères. En effet, une diminution concomitante du taux de chaîne  $\alpha$  permet de conserver un équilibre quantitatif entre les 2 chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Une anémie persiste mais les complications liées à l'excès de chaîne  $\alpha$  ne sont pas présentes.

## V/ Physiopathologie des différentes $\beta$ -Thalassémies [33] [34] [13]

Physiologiquement, les globines  $\beta$  et  $\alpha$  sont synthétisées en quantité équivalente, afin qu'une globine en particulier ne soit pas excédentaire après formation du tétramère  $\alpha_2\beta_2$  de l'hémoglobine HbA. Lorsque le taux de chaînes  $\beta$  est nul ou diminué, l'équilibre est rompu, un excès proportionnel de chaîne  $\alpha$  est donc observé.

Ce déséquilibre engendre alors une cascade de conséquences.

### V/1) Conséquences primaires de la $\beta$ -Thalassémie

#### *V/1)1) Conséquences d'un faible taux ou d'une absence de globines $\beta$*

##### **•Une anémie microcytaire hypochrome [1]**

Une diminution de la masse totale d'hémoglobine intraérythrocytaire est donc observée, en réponse au manque de globine  $\beta$ . L'anémie est microcytaire car le volume globulaire moyen est diminué. La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine étant aussi abaissée, l'anémie est qualifiée d'hypochrome. (Les valeurs biologiques seront détaillées dans la 'Partie 1, VI/. Diagnostic').

##### **•Une augmentation de l'HbF [35] [36] [12]**

Pour compenser, les GR des patients  $\beta$ -Thalassémiques contiennent de HbF à un taux supérieur à la normale. Cette hémoglobine a une affinité supérieure à celle de l'HbA1 pour l'O<sub>2</sub> : cela provoque une hypersécrétion d'EPO, qui elle-même stimule l'érythropoïèse (jusqu'à 30 fois la normale chez un sujet homozygote).

L'érythropoïèse excessive s'effectue alors dans des sites ectopiques, tels que le foie, les reins, les glandes surrénales, et para vertébrales, ce qui peut provoquer des compressions médullaires. On observe des déformations squelettiques progressives dues à l'augmentation du volume occupé par l'érythropoïèse au niveau des os.

Cet effet d'hyperplasie érythroïde provoque une forte baisse de la synthèse d'hepcidine, l'hormone régulant l'absorption intestinale du fer, par un phénomène encore méconnu. Des études avancent cependant l'hypothèse que l'augmentation de l'EPO est responsable de l'inhibition de l'hepcidine. Ce faible taux d'hepcidine provoque entre autre une augmentation du relargage du fer par les macrophages du système réticulo-endothélial.

## *V/1)2) Conséquences de l'excès de chaîne de globines $\alpha$ [29] [13]*

### **•L'érythropoïèse inefficace**

Les chaînes  $\alpha$  en excès s'associent entre elles, formant un tétramère  $\alpha_4$ . Instable et dénaturé, il s'oxyde et son hème est alors sous forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ce tétramère précipite au niveau du cytoplasme des érythroblastes, altérant leurs membranes et provoquant leur apoptose de façon prématurée. L'érythropoïèse est alors inefficace, dite dysérythropoïèse : le stade érythrocyte n'est pas atteint, les globules rouges matures ne sont pas produits.

### **•L'hémolyse**

Lorsque les chaînes  $\alpha$  insolubles sont contenues dans des GR circulants, elles forment alors des hémichromes, qui précipitent sous la forme ce corps de Heinz. Ces derniers provoquent l'hémolyse des GR qui sont détruits de manière précoce dans la rate.

Cette hémolyse engendre également une libération de lipides à effet procoagulant et prothrombotique.

La dysérythropoïèse et l'hémolyse sont deux mécanismes qui participent à l'aggravation de l'anémie microcytaire hypochrome.

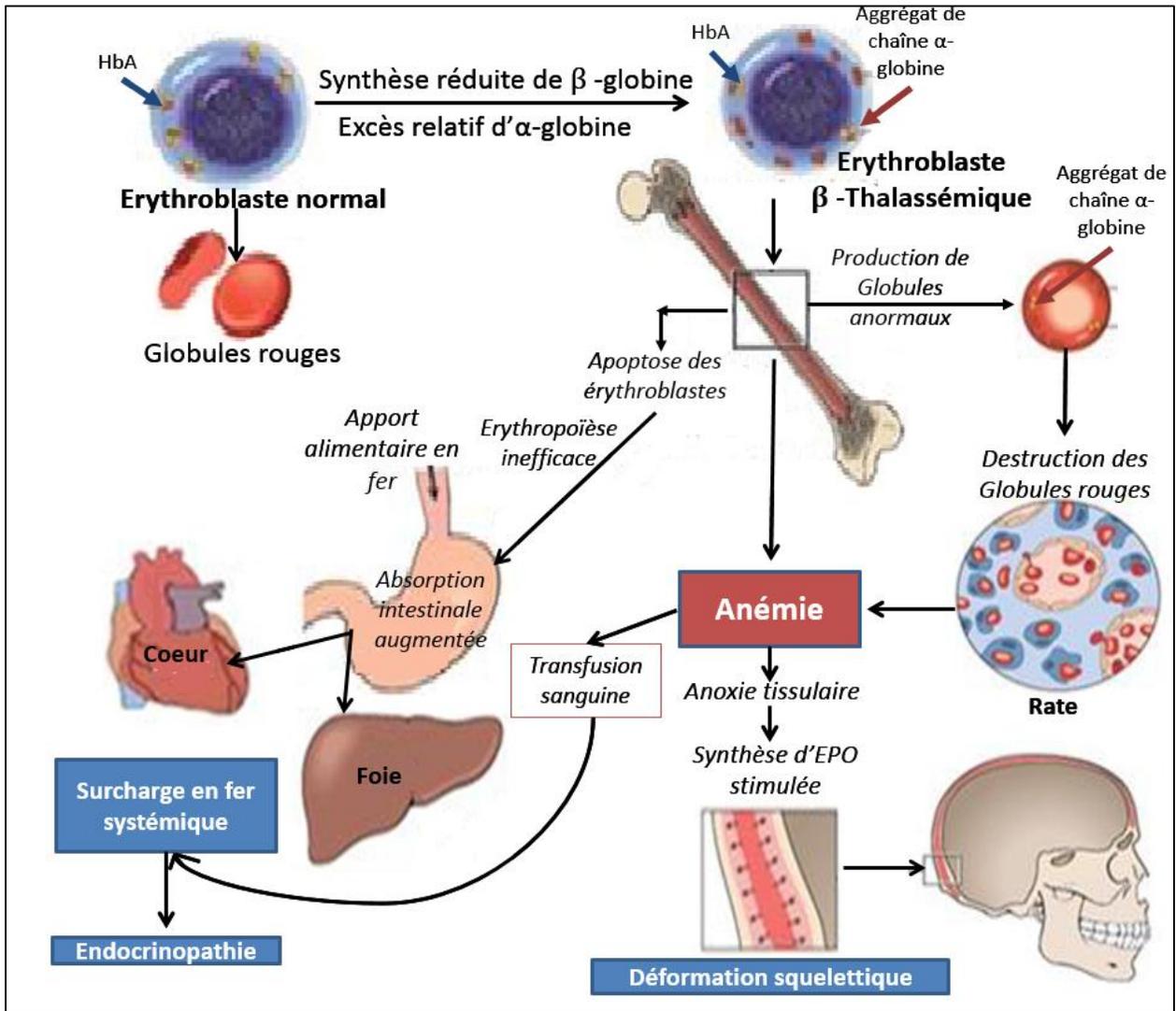


Figure 8 : Physiopathologie générale de la  $\beta$ -Thalassémie [29]

## V/2) Conséquences secondaires de la $\beta$ -Thalassémie [1] [37] [38]

Outre l'anémie précédemment décrite, les complications de la  $\beta$ -Thalassémie sont nombreuses et varient selon divers facteurs. En effet, selon le type de traitement, notamment les éventuelles transfusions sanguines, les patients présentant des  $\beta$ -TM ou des  $\beta$ -TI peuvent montrer des complications sensiblement différentes selon leur génotype. Un facteur principal et commun de la plupart des complications est la surcharge en fer.

Ces complications sont responsables de plus de 50% des décès des patients.

### *V/2)1) La surcharge en fer et ses complications [39] [40] [29]*

Cette surcharge est la conséquence de trois faits : L'érythropoïèse fortement stimulée bien qu'inefficace, couplée à l'hémolyse, ainsi que l'absorption intestinale excessive observée chez les malades.

Cependant, l'origine de la surcharge en fer est aggravée par des facteurs différents entre les patients  $\beta$ -TM et les patients  $\beta$ -TI.

Concernant les patients  $\beta$ -TI non transfusions dépendant (TD), la surcharge en fer est liée à l'augmentation de l'absorption intestinale due à la forte diminution du taux sérique d'hepcidine.

Chez les patients  $\beta$ -TMTD, l'hepcidine ne présente pas de taux particulièrement diminué. Le fer est distribué préférentiellement au système réticulo-endocytaire, stimulant la synthèse de ferritine et sa libération dans la circulation sanguine.

La surcharge en fer apparaît beaucoup plus rapidement chez les patients  $\beta$ -TM polytransfusés que chez les patients  $\beta$ -TI. Les patients  $\beta$ -TM transfusés régulièrement reçoivent un taux de fer vingt fois supérieur à l'apport recommandé (jusqu'à 500 mg de fer apporté par litre de sang transfusé). A l'état physiologique normal pour un homme adulte, l'apport alimentaire journalier recommandé est de 15mg, seulement entre 1.5mg et 3mg sont absorbés. Pour les patients  $\beta$ -TI, l'absorption représente environ 0,1mg de fer par kilo par jour, soit 7mg de fer absorbé par jour pour un homme adulte, deux fois plus que la normale.

Comme préalablement exposé, le fer en tant qu'élément essentiel joue un rôle central dans de nombreux processus physiologiques, une perturbation de son homéostasie entraîne donc de sévères complications.

### **V/2)1)a. Complications cardiaques [41] [42] [43]**

Responsable du décès de 2 patients sur 3 atteints de  $\beta$ -Thalassémie majeure, les complications cardiaques sont dues essentiellement à la surcharge en fer. En effet, une insuffisance cardiaque congestive ou des troubles du rythme sont fréquemment observés, conduisant parfois à la mort subite.

Les dépôts de fer sur les parois cardiaques, en particulier ventriculaires, provoquent leur fragilisation, une dégénérescence et entraîne leur dysfonctionnement, ainsi qu'une perte de ses propriétés élastiques. Le degré d'atteinte cardiaque est directement proportionnel à la quantité de fer déposée dans les cellules myocardiques. Par ailleurs, une hypertrophie du muscle cardiaque est observée, le ventricule gauche étant déformé.

D'autre part, l'hémolyse chronique et l'érythropoïèse inefficace conduisent à une hypoxie tissulaire, la fonction cardiaque s'adapte alors pour compenser. Ainsi, les patients atteints de  $\beta$ -Thalassémie ont un débit cardiaque significativement augmenté, qui est lié aussi à l'hypertrophie précédemment citée.

La plus grosse différence entre la  $\beta$ -TM et la  $\beta$ -TI est la sévérité et la précocité de l'atteinte cardiaque. Les symptômes se manifestent en moyenne 10ans plus tôt pour les patients atteints de  $\beta$ -Thalassémie majeure que pour les patients atteints de  $\beta$ -Thalassémie intermédiaire. Autre différence notable, la déformation cardiaque et l'augmentation volumique sont plus prononcées chez les patients  $\beta$ -TI.

L'incidence des complications cardiaques a largement diminuée depuis la mise en place des traitements chélateurs et des transfusions régulières. En 1964, 63% des patients âgés de 16ans montraient une insuffisance cardiaque, ce taux a chuté de 30% 30 ans plus tard, et actuellement, une incidence de 9% a été reportée chez les patients mal suivis (avec un âge moyen de 12ans). Après l'âge de 11ans, 50% des patients subissaient des épisodes de péricardites, et la survie des patients sans traitement chélateur était estimée à trois mois après l'installation de l'insuffisance cardiaque. Aujourd'hui, avec un traitement adapté, les insuffisances cardiaques n'apparaissent que très rarement avant l'âge de 25ans.

### **V/2)1)b. Hypertension Artériopulmonaire [44]**

Les hémoglobinopathies sont reconnues comme étant une des premières causes d'hypertension pulmonaire à travers le monde. L'hypertension artériopulmonaire est la première cause de crise

cardiaque chez les  $\beta$ -TI. 60% environ des patients  $\beta$ -TI en sont atteints, tandis qu'il a été démontré que les transfusions régulières en diminuent la fréquence chez les patients  $\beta$ -TM.

L'hypertension artériopulmonaire est multifactorielle et surtout présente chez les patients ayant subi une splénectomie. Les autres facteurs de l'augmentation de la pression sont donc le dépôt de fer sur les tissus, l'hypoxie chronique et la membrane anormale des érythrocytes, ainsi et le dysfonctionnement ventriculaire gauche.

### **V)2)1)c. Complications hépatospléniques [1]**

La fibrose hépatique est la conséquence de la surcharge en fer hépatique, son évolution est une hépatite chronique puis une cirrhose, présente chez environ 10% des patients. Les cirrhoses sont des facteurs de risques ensuite pour des encéphalopathies hépatiques et carcinomes hépatocellulaires.

Les autres causes d'hépatites sont les infections par les VHC, et VHB, autrefois très courantes, elles sont beaucoup moins fréquentes avec l'amélioration de la qualité des transfusions.

La destruction des amas de chaîne  $\alpha$  des érythrocytes augmente l'activité de purification de la rate. Il en résulte une augmentation proportionnelle de son volume, une splénomégalie. A ce stade, une splénectomie est à envisager (voir la Partie 2, III/ La splénectomie).

En outre, l'hémoglobine libérée lors de l'hémolyse précipitée des GR accélère la synthèse de bilirubine, responsable de l'ictère.

Cette bilirubine a tendance à s'accumuler dans la vésicule biliaire et à former secondairement des calculs ou lithiases biliaires, provoquant de fortes douleurs au niveau de l'abdomen ou de l'épaule droite. Une cholécystectomie, ablation de la vésicule biliaire, est parfois nécessaire.

### **V)2)1)d. Complications endocriniennes [45] [46]**

Parmi les endocrinopathies secondaires à la surcharge en fer dans la  $\beta$ -Thalassémie, l'hypogonadisme et le diabète sont les deux principales causes de morbidité pour le patient.

Par ailleurs, une surcharge en fer au niveau du myocarde est fortement associée avec l'occurrence de l'hypogonadisme (67%) et du diabète (41%). La fréquence de ces endocrinopathies augmente avec l'âge, mais n'est pas influencée par le genre sexuel.

- **Hypogonadisme [47]**

L'hypogonadisme est la plus commune des endocrinopathies chez les patients thalassémiques. Dans la  $\beta$ -TM, 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 gonadotropiques (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'hypogonadotrope.

- Chez les hommes [45] [48]: Chez les patients  $\beta$ -TM homozygotes, 3 cas sur 4 montrent un hypogonadisme hypogonadotrope. Un retard de croissance est courant, dû à des faibles taux d'hormones IGF 1 et IGFB-3. La puberté est parfois arrêtée de manière précoce. Les taux de LH et FSH sont significativement abaissés, ainsi que le taux de testostérone par rapport aux taux physiologiques normaux.

D'autre part, le sperme de ces patients est produit en quantité moins importante, et les spermatozoïdes ont une mobilité diminuée. Le volume testiculaire est divisé par deux par rapport à la population masculine normale. De nombreux patients présentent donc des problèmes de fertilité.

- Chez les femmes [49] [50]: La surcharge en fer se traduit également par un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire : un retard de puberté se manifeste par un retard de développement mammaire et une aménorrhée à 16ans (27% des filles), avec des problèmes ovariens se traduisant principalement par un manque d'ovulation spontanée. Les taux de LH, FSH et œstradiol sont significativement diminués par rapport à la population normale.

La mise en place d'une chélation efficace dans l'enfance a permis de diminuer l'incidence du retard pubertaire, qui concerne actuellement encore 15% des patients suivis. La chélation ne permet cependant pas d'assurer des fonctions gonadiques normales à long termes, un hypogonadisme secondaire est souvent développé (dans un cas sur deux).

L'infertilité est une des complications complexes et mal cernées encore de la  $\beta$ -Thalassémie. Cependant, depuis l'apparition des traitements chélateurs, son incidence a également diminuée, les

grossesses peuvent être envisagées, et menées à termes sans problème. Pour certains couples, une thérapie hormonale est nécessaire afin d'induire l'ovulation ou la spermatogénèse. L'observance des traitements chélateurs à l'adolescence est un facteur clé pour augmenter les chances de procréation par la suite. Mais une grossesse n'est pas sans risque, trois facteurs principaux sont à prendre en compte devant un désir de grossesse : Des problèmes cardiaques avérés chez la future mère, des problèmes hépatiques, et bien sûr le risque de transmission de la mutation à la descendance. En effet, le cœur ayant une activité augmentée en moyenne de 30% durant une grossesse classique, l'issue peut être dramatique chez les patientes présentant déjà une insuffisance cardiaque. La fréquence des transfusions sanguines doit être adaptée et augmentée durant cette période, afin de maintenir un taux d'hémoglobine à 10g/dL.

Autre perturbation liée à l'hypogonadotrophie, les patients  $\beta$ -TM présentent une taille moyenne inférieure à celle de la population générale dans 25% des cas. Le retard statural concerne un patient sur trois.

Ces complications hypogonadiques sont rencontrées moins fréquemment chez les patients  $\beta$ -TI, et leur fertilité est plus rarement atteinte.

- **Atteinte thyroïdienne [1]**

D'aggravation progressive, l'hypothyroïdie périphérique se manifeste par un taux de Thyroxine sérique diminué et une augmentation de l'hormone thyroïdienne et est provoquée par une dégradation directe du parenchyme thyroïdien par les dépôts de fer. Jusqu'à 10% des patients en sont atteints, un chiffre largement abaissé depuis la mise en place efficace des chélateurs.

- **Hypoparathyroïdie [51] [1]**

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. Elle survient dans la deuxième décennie des patients  $\beta$ -TM, avec une incidence de 13%.

Outre son implication secondaire dans le métabolisme osseux via les variations des concentrations de calcium et phosphore, l'hypoparathyroïdisme peut être responsable de diverses manifestations neurologiques, comme la tétanie, des sensations de paresthésies, des spasmes musculaires. Ces effets neurologiques ont encore été peu étudiés chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques.

- **Ostéoporose [52]**

Les déformations osseuses ont été les premiers symptômes répertoriés lorsque la maladie a été décrite les premières fois par le Docteur Cooley. Ce dernier a décrit des changements osseux particuliers, donnant aux patients une apparence ‘mongoloïde’, dû à un élargissement des os de la face et du crâne et un aplatissement de la racine nasale.

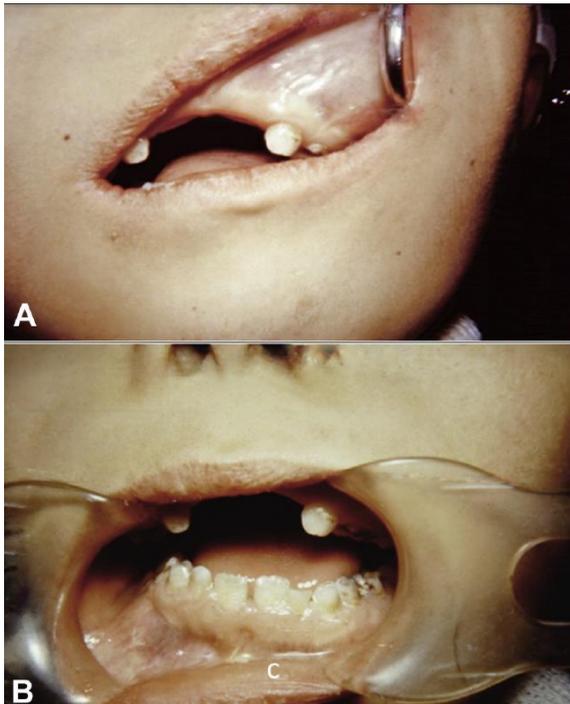


Figure 9 : Déformation mandibulaire chez un patient  $\beta$ -TM de 6ans1/2 [53]

Aujourd’hui, les recherches sont bien avancées sur le déséquilibre du renouvellement osseux chez les  $\beta$ -TM, et de telles malformations ne sont que très rarement observées grâce aux traitements actuels.

Cependant, les anomalies telles que l’ostéoporose, l’ostéopénie, les fractures et les complications spinales continuent à être observées. L’ostéoporose et l’ostéopénie représentent, encore aujourd’hui malgré des traitements adéquate en place, une cause de morbidité chez les enfants comme les adultes et ce chez les deux genres sexuels. Chez les patients  $\beta$ -TM traités, la fréquence d’ostéoporose reportée est de 40 à 50% des cas.

L’ostéoporose chez les patients résulte de nombreux facteurs acquis :

L’expansion de la moelle osseuse successive à l’érythropoïèse inefficace cause une interruption mécanique de la formation osseuse, entraînant une fragilité osseuse et un risque de distorsion élevé.

Les faibles taux d'hormones sexuelles liés à l'hypogonadisme ont également des conséquences osseuses. Les taux abaissés d'œstrogène et de progestérone diminuent l'inhibition des ostéoclastes, tandis que le faible taux de testostérone diminue la stimulation directe de la prolifération et différenciation des ostéoblastes. (Les patients  $\beta$ -TM atteints d'ostéoporose ont un taux élevé de marqueurs de résorption osseuse (N-télopeptides de collagène type 1) dans les urines.

Les déficits en vitamine C et en 25-vitamine-D (le taux est inférieur à 27nmol/L chez un patient présentant un déficit, entre 27 et 75nmol/L lorsqu'il présente une insuffisance, alors que le taux recommandé se situe entre 75 et 175nmol/L) observés chez les patients  $\beta$ -TM sont également délétères pour le métabolisme osseux. Un déficit en vitamine C augmente les risques fracturaires tandis que le déficit en vitamine D affecte son rôle direct sur la régulation des ostéoclastes et des ostéoblastes.

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, au final, 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.

Un diagnostic précoce et une prévention sont nécessaires pour cette complication progressive.

La prévalence des fractures chez les patients  $\beta$ -TM surchargés en fer est entre 38% et 40% selon 2 études réalisées. Le risque est augmenté par la faible densité osseuse minérale ainsi que la déficience en vitamine D. Les fractures des extrémités sont les plus fréquentes.

- **Diabète [40] [1]**

Le mécanisme exacte de l'induction du diabète par la surcharge en fer reste incertain, trois facteurs clés ressortent néanmoins : un déficit en insuline, une insulino-résistance ainsi qu'un dysfonctionnement hépatique. Des études chez l'animal ont montré qu'un stress oxydant ainsi qu'un excès en fer induisent l'apoptose des cellules pancréatiques productrices d'insuline, les îlots de Langerhans, entraînant une diminution de leur capacité sécrétoire.

Chez les patients  $\beta$ -TM, c'est la résistance à l'insuline qui est significativement augmentée, engendrant une intolérance au glucose. Chez les  $\beta$ -TM ayant des transfusions régulières, cette intolérance au glucose apparaît après l'âge de 10ans. Sur une étude de 80 patients  $\beta$ -TM, presque 20% présentaient un diabète et 8.5% une intolérance au glucose. (Alors qu'elle était de 59% en 1975, cette baisse étant due à l'efficacité des traitements chélateurs actuels). L'évolution depuis le stade d'intolérance au glucose au diabète avéré avec une insulino dépendance s'effectue au cours d'une période d'une durée moyenne de 3ans.

Une chélation mise en place tardivement, un traitement mal observé, ou des hépatites chroniques sont les facteurs de risque du développement du diabète chez les patients thalassémiques.

Pour conclure, une majorité des complications présentées par le patient  $\beta$ -Thalassémique est due à la surcharge en fer. Un suivi régulier de chacune de ces manifestations physiopathologiques doit donc être mis en place, permettant de surveiller l'évolution de la maladie (Cf Annexe 1, Fiche de suivi des patients remplie par le corps médical).

### *V/2)2) Complication neuropsychologique [54] [55] [29]*

Les effets neuropsychologiques, complication secondaire de la pathologie sont essentiellement dues à l'hypoxie chronique, la surcharge en fer, l'expansion de moelle osseuse et certains traitements chélateurs (voir la Partie 2, II/2 : Les molécules disponibles).

Les IRM montrent des dépôts de fer notamment dans le putamen, le cortex, le noyau caudé. Cependant, les études menées sont non conclusives concernant l'implication de la pathologie au regard des troubles cognitifs parfois présentés par les patients en vieillissant. (En effet, avec l'allongement de l'espérance de vie des patients thalassémiques, ces troubles ne diffèrent pas significativement par rapport à ceux présentés dans la population générale).

La perturbation du métabolisme du glucose, due à la surcharge en fer au niveau du pancréas, est un facteur additionnel non négligeable ayant des répercussions sur le système nerveux central et périphérique.

### *V/2)3) Hématopoïèse extramédullaire [12] [55] [56]*

Phénomène surtout identifié dans les cas de  $\beta$ -TI, l'hématopoïèse extramédullaire est rencontrée dans près de 1 cas sur 5 entre 20 et 30 ans, et 1 sur 3 après 30ans. L'érythropoïèse étant inefficace, le tissu hématopoïétique s'étend hors de la moelle osseuse sous forme tuméroides. Une déformation osseuse peut alors être observée.

Lorsque ces tumeurs se localisent près de la moelle, elles causent parfois des compressions médullaires. Selon les nerfs comprimés, on peut observer des troubles visuels, ou des troubles moteurs et sensitifs, allant parfois jusqu'à la paraplégie, la perturbation des sphincters et l'impotence. Dans 90% des cas rapportés, la compression se situait au niveau du rachis thoracique, soit au niveau de l'espace épidural, soit dans la vertèbre même, compressant la moelle.

Ces cas de compression médullaire sont plus rares chez les patients atteints de  $\beta$ -TM puisque les transfusions régulières limitent l'hématopoïèse extramédullaire.

### *V/2)4) Complications thromboemboliques [44] [57] [43]*

Un état d'hypercoagulabilité décrit chez les patients thalassémiques augmentent le risque d'accident thromboemboliques veineux (embolie pulmonaire, thrombose veineuse profonde) et artériels (ischémie transitoire ou accidents vasculaire cérébral) par rapport à la population générale. Cette hypercoagulabilité est due à de nombreux facteurs, et les patients  $\beta$ -TI splénectomisés sont particulièrement concernés.

Des études sur l'activité plaquettaire des patients  $\beta$ -Thalassémiques montrent que la durée de vie de leurs plaquettes est diminuée. En parallèle, 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.

D'un autre côté, les inhibiteurs de la coagulation, les protéines C et S sont significativement diminuées chez les patients atteints de  $\beta$ -TM. Ce double phénomène provoque une élévation du risque thrombotique.

Par ailleurs, un déséquilibre des phospholipides constituant la membrane des Globules rouges entraîne une génération anormale de thrombine. Une adhérence plus forte de la membrane des

érythrocytes aux parois vasculaires est également décrite, due à l'altération des cellules endothéliales.

Enfin, le taux de NO (monoxyde d'azote) élevé chez les patients conduit à une vasoconstriction.

### *V/2)5) Complications rénales [58]*

Le dysfonctionnement rénal engendré par la  $\beta$ -Thalassémie n'est pas un phénomène encore bien cerné. Multifactoriel, il dépend de la gravité de l'anémie, de l'hypoxie chronique et également de la surcharge en fer. Les résultats des études montrent une hyperfiltration glomérulaire. Cette hyperfiltration apparaît plus précocement chez les patients  $\beta$ -TM que  $\beta$ -TI, et engendre à long terme une altération des parois capillaires et une diminution des fonctions rénales.

### *V/2)6) Complications infectieuses*

Pour les patients  $\beta$ -Thalassémiques, les infections représentent la deuxième cause de mortalité. Elles sont surtout secondaires aux traitements (notamment la splénectomie, les transfusions).(Voir la Partie 2,1/3) Risques et complications de la transfusion.)

## **VI/ Diagnostic & données biologiques et biochimiques [59] [60]**

### VI/1) Bilans biologiques [61]

Due à l'anémie et aux nombreuses autres conséquences de la maladie, de nombreux facteurs biologiques et biochimiques varient chez les patients atteints de  $\beta$ -Thalassémie.

### *VI/1)1) Bilan de l'anémie [62] [63] [31]*

#### **VI/1)1)a. Définition**

L'anémie est une diminution de la concentration d'hémoglobine dans le sang, donc une diminution de la masse totale d'hémoglobine circulante. Il existe différents types d'anémies, caractérisés selon certains facteurs : taille des érythrocytes, teneur en hémoglobine. Ces deux éléments permettent de guider un diagnostic étiologique de l'anémie.

On dit qu'une personne est anémiée lorsque son taux d'hémoglobine est inférieur à 13g/dL pour un Homme et inférieur à 12g/dL pour une femme. Le taux d'un enfant anémié est inférieur à 11g/dL.

L'anémie des patients  $\beta$ -Thalassémiques est de type microcytaire. Le Volume Globulaire Moyen présente des valeurs inférieures à 80fL (il est compris entre 82 et 98 fL à l'état physiologique normal). Les érythrocytes ont alors une petite taille moyenne.

Cette anémie est également dans la majorité des cas hypochrome : La Teneur Corpusculaire Moyenne d'Hémoglobine (TCMH) est inférieure à la valeur physiologique, soit inférieur à 27 $\mu$ g.

#### **VI/1)1)b. Bilan martial**

Pour les patients  $\beta$ -TM, la sidérémie (définie par la teneur en fer du sérum sanguin) ainsi que les réserves en fer représentée par la ferritinémie sont largement augmentées dus aux mécanismes physiopathologiques vus précédemment.

Pour les patients  $\beta$ -TI, la sidérémie est en général dans les valeurs physiologiques normales, mais les réserves en fer sont augmentées.

#### **VI/1)1)c. Observation du frottis sanguin [1]**

Le frottis sanguin des patients  $\beta$ -thalassémiques peut montrer des globules rouges de taille variable (une anisocytose), et de formes variables (une poïkilocytose).

Le taux d'érythroblastes est augmenté, et de manière encore plus marquée suite à une splénectomie. Au contraire, les réticulocytes affichent un taux bas comparé au degré de l'anémie.

Il est également observé des inclusions dans les érythrocytes, les corps de Heinz, correspondant aux précipités d'hémoglobine. La présence de ses corps est un très bon élément d'orientation pour le diagnostic.

### *VI/1)2) Autres bilans biologiques perturbés*

#### **VI/1)2)a. Bilan Hépatique**

Il a été démontré une variation significative entre un sujet sain et un sujet  $\beta$ -Thalassémique concernant les taux de transaminases. (Aspartate aminotransaminase ASAT et Alanine aminotransaminase ALAT) qui sont augmentés.

### **VI/1)2)b. Bilan Rénale**

Il varie surtout pour les patients  $\beta$ -TM : La créatinémie des patients est abaissée, et le taux d'urée sanguine est modifié.

### **VI/1)2)c. Variations ioniques**

Le Calcium, le Sodium et le Chlore ont des taux abaissés chez les patients  $\beta$ -TM.

### **VI/1)2)d. Vitamines**

Les réserves en Vitamine C et Vitamine D sont considérablement appauvries chez les patients  $\beta$ -TM. L'acide folique (la vitamine B9) est aussi diminué (surtout chez les patients  $\beta$ -TI, étant consommée lors de l'érythropoïèse).

### **VI/1)2)e. Glycémie**

Le taux de glucose dans le sérum peut être augmenté lorsque les patients sont atteints de diabète

## [VI/2\) Analyses des hémoglobines \[64\] \[31\] \[59\] \[13\]](#)

Lors de la suspicion d'une  $\beta$ -Thalassémie, les différents types d'hémoglobine du patient doivent être déterminés et quantifiés. D'après la nomenclature des analyses de biologie médicale (NABM), un bilan standard pour identifier les différentes hémoglobines doit contenir au moins 3 tests phénotypiques parmi lesquels figure obligatoirement une électrophorèse. D'autre part, une des analyses doit permettre un dosage quantitatif de l'HbA2.

La  $\beta$ -Thalassémie est évoquée face à un taux d'HbA2 supérieur à 3.5%.

### *VI/2)1) Techniques courantes [65]*

Les techniques suivantes sont actuellement utilisées:

#### **VI/2)1)a. L'Electrophorèse**

Cette technique engendre une séparation des protéines, ici des hémoglobines, en fonction de leur différence de charge électrique. Ils existent différents types d'électrophorèse utilisés dans le diagnostic de la  $\beta$ -Thalassémie.

L'électrophorèse par isofocalisation électrique permet une séparation précise des Hb en fonction d'un gradient de pH allant de 5 à 8. Présentant une haute sensibilité et une grande résolution, elle permet la séparation fine d'un grand nombre de fraction d'Hb.

L'électrophorèse à pH alcalin : à pH 8,6 les hémoglobines portent des charges négatives et migrent en direction de l'anode chargée positivement.

L'électrophorèse capillaire est la technique la plus récente. Contrairement aux électrophorèses classiques, Elle sépare les Hb selon deux critères, non seulement la charge électrique mais également selon leur rapport charge/masse. Coûteuse, son intérêt réside dans le fait qu'elle est reproductible et quantitative.

### **VI/2)1)b. Les Chromatographies Liquides Haute Performance (HPLC)**

Elles séparent les fractions d'Hb selon leurs affinités avec la colonne échangeuse d'ions et leurs vitesses de migration (Plus l'affinité est grande et plus la migration est lente). L'HPLC en phase inverse est courante, elle effectue la séparation des molécules en fonction de l'hydrophobicité.

### **VI/2)1)c. Spectrophotométrie de masse**

La séparation se fait selon la masse des fragments protéiques, cette technique permet le repérage des Acides aminés. L'association d'une technique par HPLC et d'une électrophorèse est utilisée classiquement.

Si après réalisation de ces trois tests aucune anomalie n'est détectée, le bilan est donc considéré comme normal, le diagnostic de  $\beta$ -Thalassémie n'est pas confirmé.

## VI/2)2) Analyses complémentaires [65]

Des tests supplémentaires sont parfois réalisés afin de confirmer le diagnostic. Notamment, la mesure des chaînes  $\alpha$  libres en excès dans les réticulocytes s'effectue à l'aide d'une protéine qui fixe ces chaînes libres lors de leur élution dans une colonne. Cette étude permet de clarifier le diagnostic lorsque le patient présente un tableau clinique évocateur d'une  $\beta$ -Thalassémie mais avec un taux d'HbA2 normal (tableau présenté dans certaines  $\beta$ -Thalassémies intermédiaires).

Par ailleurs, L'étude du ratio protoporphyrine/hème dans les érythrocytes différencie les microcytoses par carences martiales des microcytoses thalassémiques. Une augmentation de ce ratio est synonyme d'une carence martiale.

Depuis peu, ils existent des tests de stabilité de l'Hb, ou encore des méthodes de mesure de l'affinité de l'Hb pour l'oxygène qui permettent une étude fonctionnelle et une meilleure compréhension du phénotype exprimé.

Tableau 2 : Valeurs biologiques des différents paramètres pris en compte dans le diagnostic des  $\beta$ -Thalassémies [65] [29]

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

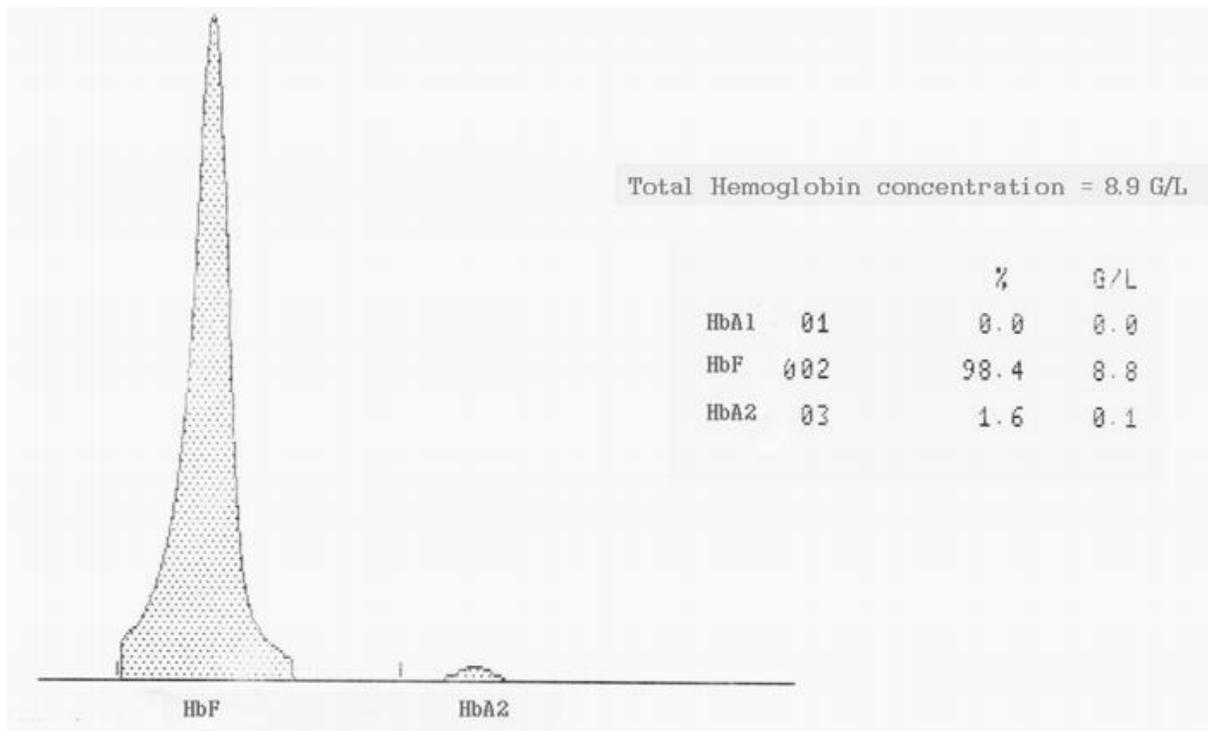


Figure 10 : Electrophorèse d'un patient atteint de  $\beta$ -Thalassémie majeure [53]

### VI/3) Diagnostic différentiel [65] [31]

Devant le tableau de l'anémie hypochrome microcytaire, plusieurs diagnostics peuvent être évoqués. Une carence martiale, une anémie sidéroblastique, ou une anémie inflammatoire se différencient alors des  $\beta$ -Thalassémies par leur bilan hémoglobinique normal.

Elle peut également être confondue avec d'autres hémoglobinopathies proches, telles que la drépanocytose ou l' $\alpha$ -Thalassémie. Par ailleurs, lorsque ces autres hémoglobinopathies sont associées à la  $\beta$ -Thalassémie, le déséquilibre quantitatif des chaînes  $\beta$  et  $\alpha$  peut être compensé. Le tableau clinique et biologique présenté alors n'est plus évocateur d'une  $\beta$ -Thalassémie, compliquant le diagnostic.

L'hyperthyroïdie, certains types d'anémie (mégaloblastique et dysérythropoïétique congénitale), certains traitements (les trithérapies) peuvent notamment évoquer une  $\beta$ -Thalassémie sur les électrophorèses et provoquer ainsi des faux-positifs.

Parvenir au diagnostic des différentes formes de  $\beta$ -Thalassémie est donc souvent complexe.

## [VI/4\) Etude des mutations \[13\] \[66\] \[67\]](#)

Lorsque le diagnostic de  $\beta$ -Thalassémie est confirmé, les types de mutation peuvent être étudiés dans certains cas. En cas de  $\beta$ -TI ou  $\beta$ -TM, il est important d'identifier les mutations, afin de les rechercher chez les parents ou dans la fratrie, et ainsi identifier les hétérozygotes.

L'étude génétique n'est pas indispensable pour les porteurs de trait thalassémique, sauf si deux conjoints avec un projet parental sont hétérozygotes. Afin d'évaluer le risque pour la descendance, cette étude est donc primordiale afin que les futurs parents reçoivent un conseil génétique pointu.

Les tests employés sont des méthodes classiques de biologie moléculaire. Les Polymerase Chain Reaction (PCR) sont les techniques les plus couramment utilisées. La PCR amplifie une région spécifique d'un acide nucléique afin de pouvoir l'analyser, en répétant des cycles de 3 étapes : dénaturation, hybridation, élongation. La PCR est ensuite couplée à une autre technique.

De nombreuses méthodes appliquées spécialement à la  $\beta$ -Thalassémie ont été étudiées, afin de mettre au point des techniques spécifiques. Des kits de diagnostic reposant sur la méthode du reverse dot blot ont déjà été élaborés pour identifier les mutations les plus courantes, pour deux populations ciblées (celles du pourtour méditerranéen et du sud-est de l'Asie).

Les délétions peuvent également être repérées par des méthodes de PCR semi-quantitative.

## [VI/5\) Circonstances du diagnostic \[68\] \[1\]](#)

Les formes majeures et intermédiaires graves sont détectées généralement dans l'enfance suite au tableau anémique présenté précédemment et aux autres complications cliniquement visibles.

Un diagnostic peut parfois être posé à l'âge adulte dans le cas  $\beta$ -Thalassémie intermédiaire, lors d'évolution de l'anémie et d'un besoin naissant de transfusion, ou face à une compression médullaire.

Le dépistage néonatal (à 72h de vie) de la drépanocytose est proposé pour certaine population à risques (lorsque les deux parents viennent de région endémiques des Antilles, Guyane, Afrique Subsaharienne, Afrique du Nord, Moyen-Orient, ou que des antécédents familiaux sont connus). Il peut alors révéler également une  $\beta$ -Thalassémie majeure. En effet, l'électrophorèse du prélèvement sanguin réalisé dans le cadre de ce dépistage peut révéler des anomalies de l'Hb, aboutissant au diagnostic final de  $\beta$ -Thalassémie.

Lorsque qu'une telle pathologie est découverte chez un patient et qu'aucun antécédent familial n'est connu, une consultation génétique est proposée pour diagnostiquer les porteurs sains éventuels au sein des membres de la famille du patient. En effet, les personnes hétérozygotes peuvent ne jamais être décelées.

Une équipe pluridisciplinaire est également mise en place pour organiser le suivi du patient et de sa famille.

Enfin, lorsqu'un couple à risque attend un enfant, un diagnostic prénatal peut lui être conseillé. (Ce type de diagnostic sera abordé dans la Partie3 III/2).

## PARTIE 2 : TRAITEMENTS CONVENTIONNELS

Le traitement des  $\beta$ -Thalassémies majeures et intermédiaires fait l'objet d'un 'Protocole National de Diagnostic et de Soins pour une maladie rare' (PNDS), élaboré par la HAS. Les moyens thérapeutiques exposés ci-après sont ceux recommandés dans ce protocole.

Dans tous les cas, le traitement est à adapter à chaque patient, selon la sévérité du phénotype clinique qu'il présente.

### I/ La transfusion sanguine

#### I/1) Place de la transfusion dans le traitement des $\beta$ -Thalassémies [69]

##### *I/1)1) Patients concernés [70] [12]*

L'initiation des transfusions est décidée après la confirmation du diagnostic de  $\beta$ -Thalassémie Majeure, pour des patients présentant une anémie avec un taux d' Hb inférieur à 7g/dL depuis plus de 2 semaines. Il est préférable qu'elle soit mise en place dès l'âge de 1an, ou au maximum avant les 3ans du patient.

Selon les cas, des patients  $\beta$ -TI (donc avec un taux d'Hb supérieur à 7g/dL) peuvent également être placés sous transfusions de façon irrégulière. Ce sont notamment les patients  $\beta$ -TI avec un retard de croissance, une déformation osseuse faciale, une splénomégalie ou encore des complications cardiaques. La mise en place transitoire de transfusion peut s'effectuer également lors de grossesse (nécessaire pour environ 50% des patientes  $\beta$ -TI enceintes), ou face à une exacerbation aiguë de l'anémie lors d'une infection. La chronicisation des transfusions peut être évoquée face une extension de moelle osseuse symptomatique, une hypertension artériopulmonaire, ou des ulcères chroniques de jambes.

##### *I/1)2) Intérêt de la transfusion*

La correction de l'anémie, la diminution de l'érythropoïèse et le rééquilibrage de l'absorption intestinale du fer sont les principaux buts des transfusions. Les transfusions régulières permettent non

seulement de réduire les effets de l'hémolyse mais préviennent également de l'hypoxie chronique. Les transfusions sont nécessaires tout au long de la vie du patient  $\beta$ -TM.

Dans le cas de  $\beta$ -TI, les transfusions permettent de réduire le risque d'hypertension pulmonaire. De plus, les transfusions régulières diminuent considérablement le problème d'hypercoagulabilité et le taux de splénectomie pour ces patients. Lorsqu'il est instauré, ce traitement n'est pas nécessairement régulier et peut être seulement ponctuel : lors d'aggravation aiguë de l'anémie du patient  $\beta$ -TI par exemple.

### *1/1)3) Régime transfusionnel [29] [71]*

Divers régimes transfusionnels sont possibles mais le plus classique est le passage d'un taux d'Hb prétransfusionnel de 9 à 10g/dL à un taux post-transfusionnel ciblé à 13-14g/dL.

L'intervalle entre chaque transfusion est de 2 à 5 semaines selon les cas. Une fréquence plus élevée serait difficilement compatible avec une qualité de vie acceptable pour les patients.

La quantité de sang transfusée dépend de différents facteurs, le nombre de CGR à transfuser est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Nombre de CGR} = \frac{\left(\frac{VST}{100}\right)(Hbf - Hbi)}{QHbCGR}$$

-VST : Volume Sanguin Total, en ml, calculé par des abaques selon le poids et la taille du patient.

-Hbi : Concentration initiale en Hb (g/dl)      -Hbf : Concentration en Hb finale souhaitée (g/dl)

-QHbCGR : Quantité d'Hb dans chaque CGR (g)

En moyenne, le volume de GR transféré ne doit pas être supérieur à 15-20ml/kg par jour.

Pour mesurer l'efficacité de la transfusion, certains paramètres sont « monitorés ». Ainsi, les taux d'Hb pré et post-transfusionnel, la variation des hématocrites, la chute journalière du taux d'Hb, et l'intervalle des transfusions sont relevés. Ces mesures permettent de réévaluer les besoins en GR et de déduire la quantité de fer apportée.

## I/2) La transfusion en pratique [13] [72] [73]

### *I/2)1) Bilan pré-transfusions*

#### **I/2)1)a. Examens immunohématologiques [74]**

On s'assure du groupe sanguin du patient après deux séries de tests sur deux prélèvements différents. Les principaux systèmes d'antigènes présents au niveau de la membrane des globules rouges sont systématiquement identifiés par deux examens : d'une part, les groupes sanguins types ABO et Rhésus 1 (ABO-RH1), et d'autre part le phénotype Rhésus-Kell ((RH-KEL1) soit 4 antigènes du système Rhésus (RH2, RH3, RH4, RH5) et 1 antigène du système Kell (KEL1)).

Dans le cas de patients  $\beta$ -Thalassémiques, le phénotype érythrocytaire est déterminé plus précisément par l'analyse supplémentaire des antigènes Duffy (FY1 et FY2), Kidd (JK1 et JK2), et MNSs (MNS3 et MNS4). Pour rappel, plus de 320 antigènes de groupe sanguins ont été répertoriés, les 280 principaux sont regroupés en 35 systèmes.

Une recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) s'effectue aussi, 72h avant la transfusion, et évalue la présence d'éventuel anticorps (spécifiquement les anticorps du patient dirigés contre les antigènes érythrocytaires en dehors du système ABO).

Un frottis sanguin avec l'analyse morphologique des érythrocytes et la numération réticulocytaire est effectué.

Enfin, les dosages de l'hémoglobine et de la ferritine complètent ce bilan prétransfusionnel.

#### **I/2)1)b. Examens sérologiques**

Réalisés seulement avec le consentement du patient, les sérologies du virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), des virus des Hépatites C (VHC) et B (VHB) ainsi que du cytomégalovirus (CMV) n'ont plus d'indication systématique en France où le haut niveau de qualité des produits sanguins permet d'écarter les risques infectieux.

### *I/2)2) Déroulement d'une transfusion en France*

#### **I/2)2)a. Type de produits sanguins transfusés [74]**

Pour le traitement des  $\beta$ -Thalassémies, les produits sanguins labiles transfusés sont des Concentrés de Globules Rouges (CGR) déleucocytés. Un concentré de 250ml contient au minimum 40g d'hémoglobine.

La qualification biologique du don regroupe une série de tests permettant d'attribuer le don à un receveur compatible. La détermination des systèmes sanguins, la recherche d'anticorps anti-érythrocytaire, et une détection des anticorps antiA ou antiB immuns sont systématiquement effectués.

Dans le cas de transfusion sanguine chronique, le CGR est, comme pour le sang du patient, également phénotypé pour 5 antigènes en plus par rapport à une détermination classique, afin d'augmenter la compatibilité sanguine donneur-receveur.

La qualification biologique du don compte aussi le dépistage du génome viral du VIH, du VHC et du VHB, remplissant une obligation réglementaire. Par ailleurs, si le patient est séronégatif pour le cytomégalovirus, le don doit être CMV négatif.

### **1/2)2)b. Protocole transfusionnel**

Le protocole transfusionnel est bien précis et les produits sanguins bénéficient d'une traçabilité pointue. Chaque poche de sang est accompagnée d'une fiche nominative de distribution (FDN). Lors de leur réception, les conditions de transport sont vérifiées, notamment la continuité de la chaîne du froid, ainsi que la concordance du produit reçu par rapport au produit commandé.

Un dernier contrôle documentaire avant transfusion est effectué devant le patient. Par la vérification de son identité, de l'ordonnance, de la FDN et des résultats de groupage sanguin du patient et du produit, l'administration est sécurisée.

Enfin, une réaction d'agglutination entre un prélèvement capillaire du patient et la première goutte du produit à transfuser est vérifiée, elle doit être négative. Cet ultime contrôle permet de revérifier la compatibilité ABO.

Les transfusions s'effectuent sous la présence d'un médecin spécialiste. Une séance dure entre 1h et 1h30.

### **1/2)3) Suivi post-transfusionnel**

#### **1/2)3)a. Suivi immédiat**

Les signes d'intolérance du produit transfusé sont nombreux et la survenue d'un ou plusieurs de ces symptômes requière immédiatement l'arrêt de la transfusion. Il faut notamment être vigilant face à une hyperthermie avec ou sans frisson, des douleurs thoraciques ou lombaires, une sensation ou des bouffées de chaleur, une agitation, une hypotension, des nausées ou vomissements, une pâleur, une

dyspnée, un prurit ou urticaire, un saignement au point d'injection, ou encore une tachycardie.

La déclaration de ces signes doit être effectuée auprès du service d'hémovigilance, sous forme d'une fiche d'incident transfusionnel (FIT).

### **1/2)3)b. Suivi à long terme**

L'apparition de nouveaux anticorps irréguliers doit être surveillée deux fois par an selon la réglementation. On vérifie fréquemment que de nouvelles infections ne sont pas contractées. Les recommandations suggèrent une surveillance régulière de l'état des défenses immunitaires contre le VHB, avec une revaccination si nécessaire. Une vaccination contre le virus de l'hépatite A est conseillée.

Une carte transfusionnelle est attribuée au patient, et toutes les informations relatives aux dons (systèmes antigéniques étendus, anticorps anti-érythrocytaires, récapitulatif des transfusions reçues, FIT) sont retranscrites dans le dossier transfusionnel du patient. Une traçabilité parfaite est indispensable dans le suivi des gestes transfusionnels.

## **1/3) Risques et complications [1] [62] [72] [73]**

Les transfusions répétées exposent les patients  $\beta$ -Thalassémiques à de nombreux risques tels que la transmission d'infection, l'allo-immunisation ou encore la surcharge en fer. Des réactions immunologiques variées peuvent survenir, dans n'importe quel contexte de transfusions.

### ***1/3)1) Accidents immunologiques [75]***

Un accident immunologique survient dans près de 1 transfusion sur 12000.

#### **1/3)1)a. Allo immunisation anti-érythrocytaire [76] [70]**

- **Généralités**

Les hématies transfusées présentent des antigènes sur leurs membranes, qui réagissent alors avec les anticorps des systèmes ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, ou MNS du patient. Les antigènes érythrocytaires d'un même système sanguin ont un pouvoir immunogène variant d'un antigène à un autre, et ce pouvoir immunogène varie d'un système à un autre. La majorité des allo-anticorps immuns détectée appartient aux deux systèmes sanguins Rhésus et Kell, l'antigène KEL1 étant le plus immunogène de tous. Lors de ce type de conflit anticorps-antigène, les anticorps sont capables de provoquer la destruction des hématies, leur cible.

- **Conséquences cliniques**

La conséquence clinique la plus grave de l'allo-immunisation anti-érythrocytaire est un choc hypovolémique associé à un collapsus, survenant au maximum dans les heures suivant la transfusion. Une Coagulation IntraVasculaire Disséminée (CIVD), insuffisance rénale ou respiratoire peuvent venir compliquer le tableau clinique. Environ 5 jours après la transfusion, la réactivation d'un anticorps peut également se manifester par un ictère hémolytique.

Ces réactions immunohématologiques peuvent être moins sévères, rendant seulement la transfusion inefficace face à l'anémie, menant à une impasse transfusionnelle. Une enquête immunologique est ouverte pour détecter l'antigène en cause.

- **Fréquence d'apparition**

La fréquence de ces réactions est rare (environ 1 unité de sang transfusée sur 30000). Le protocole transfusionnel expliqué plus haut permet d'éviter ces réactions, elles surviennent donc généralement lors d'un écart à celui-ci (problème d'identification des poches ou encore mauvais contrôle de compatibilité, le protocole étant complexe les erreurs potentielles sont nombreuses).

Le risque d'allo-immunisation augmente avec l'âge, compliquant les recherches de donneurs compatibles, il est donc préférable de débiter la transfusion avant l'âge de 3ans chez les patients  $\beta$ -TM. En effet, débiter les transfusions le plus tôt possible après la première année du patient permet l'installation d'une tolérance immunologique freinant l'apparition d'allo-immunisation. Ce risque d'allo-immunisation est également augmenté chez les femmes enceintes et les patients splénectomisés. Environ 5% de la population  $\beta$ -TM est concernée par cette réaction immunitaire.

Dans la population  $\beta$ -TI, le taux est d'allo-immunisation érythrocytaire est cependant plus élevé, dû à une mise en place des transfusions plus tardives et un taux de splénectomisés plus élevé.

- **Impasse transfusionnelle**

Les transfusions répétées augmentent la probabilité que le patient s'immunise contre les multiples antigènes portés par les globules rouges des donneurs. Trouver des CGR compatibles est alors de plus en plus compliqué. Il faut donc parfois faire face à une impasse transfusionnelle, lorsqu'aucun don compatible n'est disponible dans l'immédiat. La congélation de CGR compatible est une solution pour palier à cette situation.

### **1/3)1)b. Incompatibilité protéique**

Rare, cette complication se présente lorsque le patient a un déficit congénital en IgA. Un tableau de choc anaphylactique grave est alors décrit.

### **1/3)1)c. Œdème pulmonaire lésionnel post-transfusionnel**

Le pronostic vital est engagé lorsque survient cette réaction très rare, due à des anticorps anti-leucocytes du produit transfusé. (Il est également appelé TRALI, Transfusion Related Lung Injury).

### **1/3)1)d. Réaction post-transfusionnelle de greffon contre l'hôte**

Exceptionnelle, elle peut être observée lorsque le receveur est profondément immunodéprimé proportionnellement au statut immunologique actif du donneur. Dans sa forme la plus aigüe, cette réaction peut être mortelle.

### **1/3)1)e. Réaction allergique**

En dehors du choc anaphylactique susmentionné, diverses réactions bénignes de type allergiques peuvent survenir. Ce sont par exemple des érythèmes, urticaires, prurits, frissons, hypothermies, et se traitent aisément par antihistaminique. En revanche, il peut également être observé des crises d'asthme ou des œdèmes de Quincke, plus graves.

## ***1/3)2) Accidents non immunologiques de la transfusion sanguine [73]***

### **1/3)2)a. Accident non immunologique : Infections d'origines multiples**

- **Infections Virales**

Le risque de contamination virale est infime dû aux nombreux tests effectués sur les produits transfusés. Cependant, le risque zéro n'existe pas.

En 2010, les risques en France pour les dons reçus étaient les suivants :

- VIH : 1 transfusion sur 2 900 000 est à risque.
- Virus de l'hépatite B : 1 transfusion sur 3 500 000
- Virus de l'hépatite C : 1 transfusion sur 7 000 00

Les virus de l'hépatite A et E, non recherchés lors de la qualification du don, peuvent également être transmis.

Quatre paramètres principaux concernant les tests biologiques sur le don expliquent la persistance

de ces risques. Une charge virale sous le seuil de détectabilité des tests, un don durant la fenêtre sérologique au cours de laquelle les anticorps ne sont pas encore produits et donc non détectables, des virus mutés non détectés par les tests, ou bien une erreur dans la réalisation du test sont les raisons du maintien d'un risque de contamination virale.

- **Infections bactériennes**

Le risque de choc endotoxinique lorsque la poche de produit sanguin est contaminée par une bactérie est de 1 transfusion sur 135000, ces infections représentent donc le risque le plus élevé en France. Les bactéries les plus classiquement retrouvées sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella oxytoca*. Les diverses infections contractées par le donneur sont investiguées lors de l'entretien médical obligatoire avant tout don de sang. Elles représentent un critère d'exclusion strict au don du sang.

- **Infections parasitaires**

Dans les zones endémiques, le paludisme et la toxoplasmose ou encore les trypanosomiasés et leishmaniosés sont des maladies possiblement transmises par les transfusions.

- **Autres agents infectieux**

Certains prions, comme ceux responsables de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou de l'encéphalopathie spongiforme bovine ont été responsables d'infection chez des patients transfusés (des cas ont notamment été détectés en Grande-Bretagne).

### **1/3/2)b. Accident non immunologique : la Surcharge en fer**

Chaque CGR transfusé apporte 200mg de fer au patient, soit plus de dix fois les apports journaliers classiques. La répétition des transfusions surcharge ainsi progressivement le patient en fer. Les nombreuses conséquences de cette surcharge en fer ont été évoquées en 1<sup>ère</sup> partie.

## II/ Traitement de la surcharge en fer : Les chélateurs

### II/1) Place des chélateurs dans le traitement de la $\beta$ -Thalassémie [12] [13] [77]

Comme présentée précédemment, la surcharge en fer est une conséquence directe des transfusions à répétition, associées à l'hyperabsorption intestinale chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques, et représente un facteur de nombreuses complications.

La mise en place de traitements limitant l'accumulation du fer est donc primordiale. De plus, un excès de fer limité induit d'une part une diminution de la prolifération des précurseurs des globules rouges immatures, et d'autre part l'amélioration de leur maturation. Le corps humain n'ayant pas de solution physiologique pour épurer le fer, le recours aux chélateurs est l'unique moyen d'éliminer ce fer en excès, via les urines ou fèces.

Chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques majeurs, les traitements par chélateurs sont débutés après 10 ou 20 transfusions reçues, quand le taux de ferritine atteint  $1000\mu\text{g/L}$ .

Chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques intermédiaires, l'emploi des chélateurs est préconisé lorsque que la concentration en fer hépatique est supérieure à  $7\text{mg}$  de fer par gramme de foie sec. En France, selon le répertoire officiel des patients  $\beta$ -Thalassémiques, 41% des patients  $\beta$ -TI sont traités par chélateurs, qu'ils reçoivent ou non ponctuellement des transfusions.

Depuis la mise en place des premiers chélateurs et leurs utilisations dans la  $\beta$ -Thalassémie, l'espérance de vie s'est nettement allongée et le pronostic vital amélioré. Une étude a montré que pour la population  $\beta$ -TM née avant 1970, et ne pouvant donc bénéficier de chélation dès son plus jeune âge, seul 30% ne survivait après l'âge 20ans. A contrario, les patients nés après 1975 présentent une survie de 100% à l'âge de 25ans.

### II/2) Les molécules disponibles [29] [78] [79]

Le chélateur idéal doit satisfaire aux critères suivants : Avoir une affinité haute et spécifique avec le fer sous forme  $\text{Fe}^{3+}$ , un haut pouvoir chélateur, un faible taux de métabolisation, une bonne pénétration cellulaire, pas de redistribution du fer, bien sur une toxicité relativement faible, et enfin une bonne biodisponibilité par voie orale. Il doit être efficace sur la diminution effective du taux de fer et ainsi instaurer une balance martiale négative.

Un faible coût, pour être disponible et utilisé dans les pays en voie de développement où la maladie est endémique, pourrait être un autre critère à prendre compte.

### *II/2)1) La Déféroxamine [80] [81] [82]*

Naturellement produite par *Streptomyces pilosus*, La déféroxamine (DFO) de synthèse est le premier chélateur utilisé dans la  $\beta$ -Thalassémie, découvert il y a plus de 30ans. Avec le recul de ces nombreuses années d'utilisation et toutes les données recueillies à son sujet, la DFO est le traitement de référence en matière de chélation dans l'indication de la  $\beta$ -Thalassémie.

- **Données pharmacologiques**

Une molécule de DFO forme un complexe hydrosoluble, la ferrioxamine, avec un ion  $Fe^{3+}$  par la création de 6 liaisons entre les deux entités. La DFO est donc un chélateur hexadente, et un gramme de traitement épure en théorie 85mg de fer. La DFO permet dans un premier temps l'élimination du fer libre du sérum ou des cellules. Mais son action est surtout située au niveau du foie, et il induit une réduction de la ferritinémie au long cours de manière très efficace. Concernant son élimination, le complexe est excrété à 60% dans les fèces, 40% dans les urines.

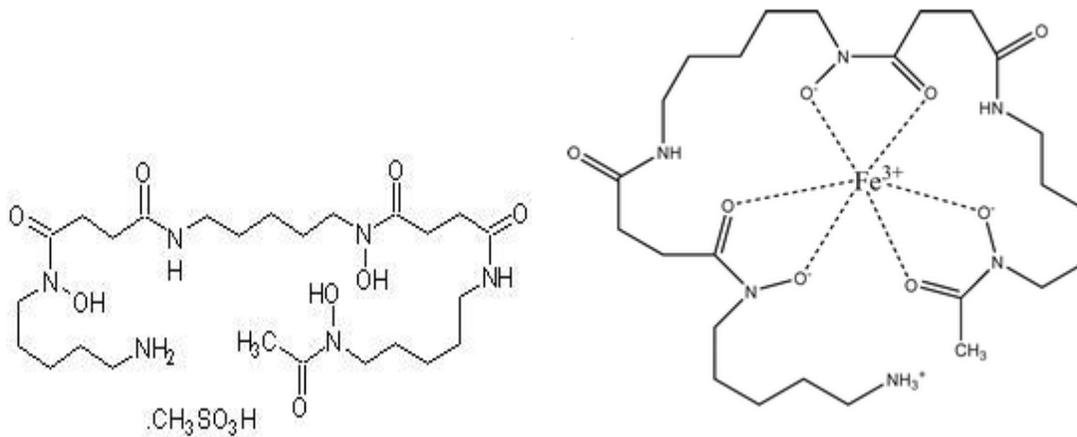


Figure 11 : A gauche la DFO seule, à droite le complexe DFO-fer [83]

- **Posologie et mode d'administration**

L'administration se fait par voie sous-cutanée, en perfusion grâce à une pompe. Elle dure entre 5 et 8 heures par nuit, 5 à 7 jours par semaine, à une posologie de 40 à 50mg/kg/jour. Ce mode d'administration contraignant ne favorise pas une observance totale de la part des patients, les exposant aux nombreuses complications de la surcharge en fer et notamment aux cardiopathies.

La supplémentation du patient en vitamine C (à une posologie de 150 à 200mg/jour par voie orale, chez l'adulte) permet d'augmenter l'excrétion du complexe.

L'administration chez les enfants de moins de 3ans est possible mais nécessite une surveillance accrue.

- **Effets secondaires [84] [85]**

Les plus courants effets secondaires sont neurosensoriels, de types troubles auditifs ou visuels (une rétinopathie). Ces complications sont réversibles à l'arrêt des perfusions de DFO.

Des problèmes de croissance chez le jeune enfant ont été observés, avec une atteinte des cartilages vertébraux et de l'épiphyse.

Des mycoses causées par certains champignons de la famille des *mucoraceae* sont favorisées par la déféroxamine. Par ses propriétés de sidérophore, elle fournit le fer directement au champignon qui peut ainsi aisément se multiplier. Ces mucormycoses, développées le plus souvent par des patients diabétiques, sont angio-invasives : dans les cas les plus graves, parfois mortels, des nécroses tissulaires ont été rapportées suite à la thrombose des vaisseaux adjacents.

La pompe de perfusion est par ailleurs un vecteur d'infections bactériennes multiples. Des réactions allergiques peuvent également survenir au niveau de cet accès veineux central, de type brûlure, érythème, prurit.

- **Surveillance du traitement**

Le traitement peut être ajusté suite au résultat du contrôle de l'excrétion du fer sur 24heures. Une quantité de fer excrétée quotidiennement à hauteur de 0.5mg/kg suffit généralement pour que l'équilibre martial soit négatif.

## II/2)2) La Défériprone [86]

La Défériprone (DFP) a obtenu une AMM dans le traitement de la surcharge en fer des patients  $\beta$ -Thalassémiques en 1999.

- **Données pharmacologiques**

Trois molécules sont nécessaires pour complexer un ion  $\text{Fe}^{3+}$ . Chaque molécule crée 2 liaisons avec le fer : ce ligand est bidente. La DFP cible principalement le fer contenu dans les cellules cardiaques, induisant une forte cardioprotection. Son élimination est à 90% rénale.

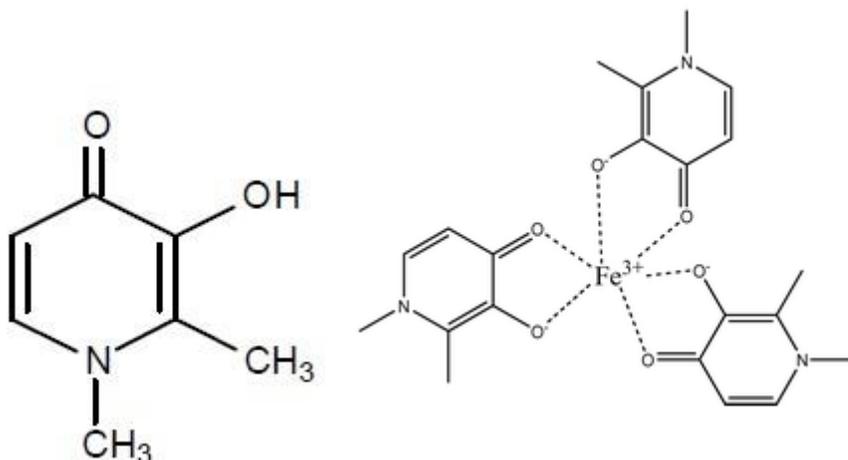


Figure 12 : A gauche le DFP, à droite le complexe DFP-fer [83]

- **Posologie et mode d'administration**

Une forme orale a pu être formulée pour cette molécule lipophile de petit poids moléculaire. Elle s'administre 3 fois par jour, à un dosage de 75mg/kg par jour.

Le traitement est administré chez les enfants à partir de 6ans, cependant avec une surveillance renforcée pour les patients âgés de 6 à 10 ans. La molécule étant tératogène, la DFP doit être arrêté pendant une grossesse.

- **Effets secondaires**

Les effets les plus classiques et bénins sont de types nausée, vomissement, douleur abdominale, ainsi qu'une coloration brune des urines.

1 patient sur 100 est atteint d'agranulocytose, et environ 5% des patients présentent une baisse plus modérée des neutrophiles. Ces graves effets secondaires nécessitent l'arrêt immédiat et définitif du traitement, requérant une substitution.

- **Surveillance du traitement**

Un dosage des globules blancs doit être effectué une fois par semaine afin de détecter l'apparition d'une éventuelle agranulocytose.

La surveillance régulière de la concentration plasmatique du  $Zn^{2+}$  est recommandée, un apport doit être fourni au patient en cas de déficit avéré.

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement, la ferritine sérique doit être dosée tous les trimestres. Des ajustements de doses peuvent alors être nécessaires en fonction des objectifs thérapeutiques déterminés initialement. Un dosage de la ferritinémie inférieur à  $500\mu\text{g/L}$  est sujet à une interruption des prises de DFP.

### *II/2)3) Le Déférasirox [87]*

Le Déférasirox (DFX) a obtenu son AMM en 2006 dans le traitement des  $\beta$ -Thalassémies. Sa spécialité Exjade© est la seule des 3 molécules à être classée parmi les médicaments orphelins en Europe.

- **Données pharmacologiques**

La molécule présente une affinité forte et spécifique pour le fer, ce ligand est de type tridenté, il forme 3 liaisons avec le fer. Pour permettre l'excrétion d'une molécule de fer, les liaisons avec deux molécules de DFX sont nécessaires. Cette molécule lie le fer à la fois des cellules hépatiques et cardiaques, avec un effet hépatique plus prononcé. L'élimination est majoritairement biliaire.

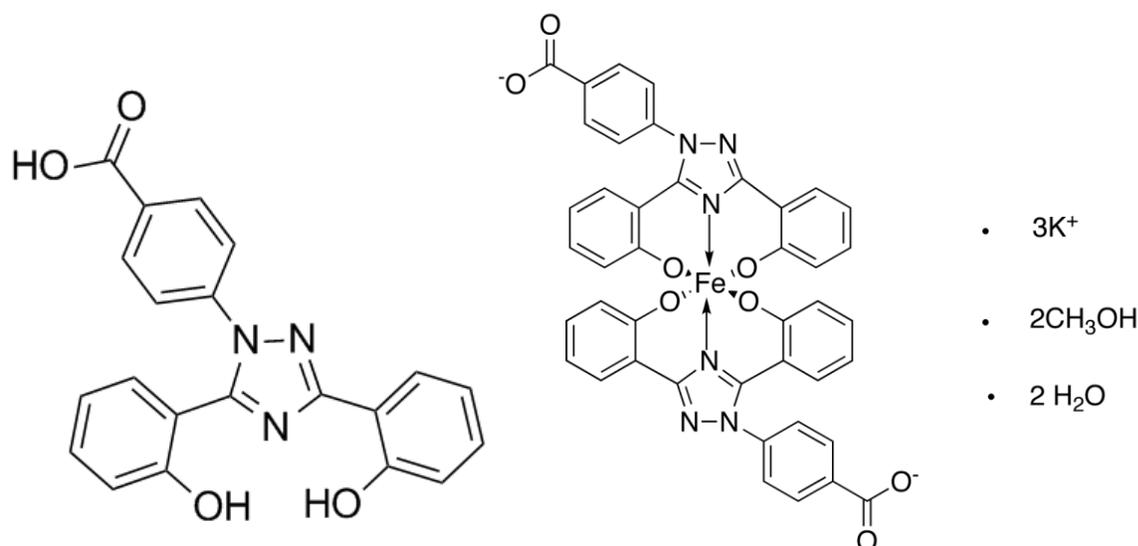


Figure 13 : La molécule de DFX à gauche et le complexe DFX-fer à droite [88]

- **Posologie et mode d'administration**

L'administration en une seule prise par jour, possible grâce à la longue demi-vie de la molécule, représente l'avancée considérable qu'apporte ce traitement vis-à-vis des deux autres molécules.

La dose efficace pour établir un équilibre négatif du fer est de 20 à 30mg/kg/jour.

- **Effets secondaires**

Les effets secondaires les moins graves sont des troubles gastro-intestinaux. Les patients présentent aussi parfois des rashes cutanés qui disparaissent à l'interruption du traitement.

Des réactions d'hypersensibilités ont été rapportées, ainsi que des affections hématologiques de type neutropénie, thrombopénie, une aggravation de l'anémie, ou encore une pancytopénie.

Une augmentation de plus de 30% de la créatininémie a été observée pour un tiers des patients, un autre tiers a montré une augmentation inférieure à 30%. Le mécanisme de cette augmentation n'a pas été clairement élucidé mais semble être dose-dépendant.

Les transaminases hépatiques peuvent également montrer une élévation progressive pour 2% des patients.

Une audition diminuée et un cristallin opacifié sont également deux effets indésirables rapportés.

- **Surveillance du traitement**

Deux dosages successifs de la créatininémie sont réalisés avant la mise en route du traitement, puis la créatininémie et la clairance de la créatinine sont dosées une fois par semaine pendant le premier mois, et ensuite une fois par mois. Une augmentation de la créatininémie supérieure à 33% nécessite un arrêt temporaire du traitement.

La protéinurie doit également être surveillée tous les mois, l'arrêt du traitement est discutable si les marqueurs de la fonction rénale tubulaire montrent des taux anormaux de façon prolongée.

La surveillance mensuelle du taux des transaminases est recommandée. Si l'origine de ces taux anormaux n'est pas attribuable à une cause tierce, le traitement doit être interrompu.

Un examen ophtalmologique et un test auditif doivent être réalisés tous les ans.

Enfin, l'efficacité du traitement est jugée par un contrôle de la ferritinémie une fois par mois.

Les résultats de tous ces tests peuvent donc conduire à un ajustement (possible tous les 3 à 6 mois) ou à un arrêt du traitement.

## *II/2)4) La Bithérapie : Une possibilité ?*

### **II/2)4)a. Bithérapie par Déféroxamine associée à la Défériprone**

- **Comparaison des effets DFO/DFP [77]**

Plusieurs études comparatives ont été menées. Ils en résultent qu'en monothérapie, à dose considérée identique, la DFO est plus efficace que la DFP dans la mesure où un plus grand nombre de patients montrent un équilibre en fer négatif avec la DFO.

D'un point de vue physiologique, la pénétration intracellulaire est meilleure pour la DFP, permettant d'atteindre des stocks de fer sur lesquels la DFO n'agit pas. Ainsi, à posologie équivalente, la probabilité de développer une pathologie cardiaque est dix fois plus élevée avec la DFO qu'avec la DFP.

Mais les complications nécessitant l'arrêt du traitement sont plus nombreuses et plus probables avec la DFP qu'avec la DFO. (cf. comparaison des trois chélateurs en Annexe 3).

- **L'association Déféroxamine/ Défériprone (DFO/DFP) [29]**

La combinaison de la DFO avec la DFP présentent des avantages certains. Ayant chacune des cibles différentes, combiner les deux molécules permet d'épurer un plus grand nombre de pools de fer et ainsi en excréter une plus grande quantité. En somme, on observe une augmentation de la chélation par addition des effets de chaque chélateur. La qualité de vie est améliorée notamment par la possibilité d'espacer les transfusions.

Cependant, l'exposition aux effets secondaires des traitements lors de bithérapie est trois fois supérieure à celle présentée par la DFO seule.

Ainsi, devant ces risques élevés, seule l'aggravation des dépôts de fer au niveau du myocarde suggérerait la mise en place de ce type de bithérapie.

#### **II/2)4)b. Bithérapie par Déféroxamine associée au Déférasirox [89]**

- **Comparaison des effets de la Déféroxamine et du Déférasirox**

Les deux traitements induisent un équilibre martial négatif pour un pourcentage similaire de patients. Mais en comparaison à la DFO, le DFX est efficace à une dose deux fois plus faible pour obtenir des effets chélateurs similaires.

- **L'association Déféroxamine / Déférasirox (DFO/DFX) [90]**

L'addition des effets des deux molécules permet la chélation d'une plus grande quantité de fer. Des études ont montré une diminution de 40% de la ferritinémie et une diminution marquée de la CHF après un an de chélation par cette bithérapie, chez des patients pour qui ce taux ne diminuait pas significativement avec une monothérapie. Par ailleurs, la combinaison améliore les effets sur les cellules cardiaques par rapport à une thérapie par DFO seule.

Le risque d'apparition d'effets secondaires n'est pas augmenté lors d'une bithérapie comparé au risque de ces traitements en monothérapie.

#### **II/2)4)c. Conclusion sur les Bithérapies [91]**

Les thérapies combinées offrent une alternative pour les patients dont la surcharge en fer n'est pas suffisamment maîtrisée avec une monothérapie, en leur induisant un équilibre martial négatif. Il a été montré que la bithérapie DFO/DFX a un effet plus important sur les espèces ferriques libres plasmatiques, et nécessite une surveillance moins stricte comparée à la combinaison DFO/DFP qui

s'avère plus toxique. Les bithérapies permettent également de diminuer la fréquence des perfusions de DFO en compensant par la médication orale, ce qui améliore la qualité de vie des patients.

Enfin, les effets de la bithérapie DFX/DFP sont en cours d'étude.

### *[II/2\)5\) Recommandations officielles \[86\] \[92\] \[93\] \[94\] \[95\]](#)*

La Déféroxamine, la Défériprone, le Déférasirox sont donc les trois seules molécules ayant obtenues une AMM dans le traitement de la surcharge en fer chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques.

La posologie du chélateur est à adapter en fonction des apports transfusionnels, et des objectifs du traitement : on recherche soit la réduction, soit la stabilisation de la surcharge en fer.

Malgré les études prouvant l'efficacité de la DFP dans les complications cardiaques, et les avantages représentés par la prise unique du DFX, la HAS en 2011 a maintenu la position de la DFO en tant que traitement de référence à prescrire en première intention chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques transfuso-dépendants.

La DFP est à prescrire chez les patients  $\beta$ -TM lorsque la DFO est 'contre-indiquée ou inadaptée'.

Le DFX est indiqué pour les patients  $\beta$ -TM de plus de 6ans, pour les patients  $\beta$ -TM de plus de 2ans si la DFO n'est pas supportée, ou chez les patient TI non transfuso-dépendant de plus de 10ans si la DFO n'est pas supportée. En pratique, le DFX était employé chez plus de 70% des patients  $\beta$ -Thalassémiques suivant un traitement chélateur en 2011.

Enfin, même lorsqu'elles sont adaptées au patient, les bithérapies font l'objet de prescriptions Hors AMM.

### [II/3\) Suivi de la surcharge en fer \[96\] \[97\] \[98\]](#)

La surcharge en fer des patients  $\beta$ -Thalassémiques est évaluée par trois paramètres, le taux de ferritine, la quantité de fer par gramme de foie, et l'hyposignal obtenu à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). D'autres éléments peuvent compléter cette évaluation, comme le dosage de la saturation de la transferrine, le dosage du fer non lié à la transferrine ou encore le dosage du fer plasmatique labile.

### *II/3)1) Dosage de la ferritine*

Une surcharge en fer est définie lorsque le taux dépasse 200µg/L pour la femme et 300µg/L pour l'homme.

La valeur cible pour les patients β-Thalassémiques est de 1000µg/L. Un dosage supérieur à 2500µg/L à répétition augmente fortement le risque de complications cardiaques. En revanche, un taux inférieur à 500µg/L augmente le risque de toxicité des traitements chélateurs et nécessite l'adaptation de leurs posologies.

Le taux de cette protéine sérique est l'image des stocks de fer contenus dans l'organisme, cependant il varie également selon des facteurs physiologiques (comme les inflammations, les infections, le stress oxydatif ou une carence en vitamine). L'évaluation de la surcharge en fer peut alors être faussée.

### *II/3)2) Biopsie hépatique*

La concentration hépatique en fer (CHF) reflète également l'excès de fer. Une CHF normale est inférieure à 2mg de fer par gramme de poids sec.

Une chélation adaptée permet de maintenir la CHF de 3.2 à 7mg/g de foie sec. Au-delà de 15mg/g de foie sec, le patient est exposé à la fibrose hépatique et aux cardiopathies secondaires.

La ponction biopsie hépatique permet de mesurer cette CHF sur le tissu prélevé. Le geste étant invasif et avec de nombreuses contre-indications, ce dosage n'est pas une surveillance de routine mais est réservé lorsque la fibrose hépatique est suspectée, ou lors de la recherche de gravité associée comme une cirrhose ou un cancer hépatocellulaire. (Elle est également effectuée lorsqu'une greffe de cellules souches est envisagée).

### *II/3)3) Méthode SQUID (Biomagnétométrie) [3]*

Le dispositif supraconducteur à interférences quantiques (SQUID) permet de mesurer indirectement la CHF, de façon non invasive. C'est une technique d'imagerie qui utilise des détecteurs de champs magnétiques très sensibles. Ils peuvent ainsi repérer le faible champ magnétique que génère le fer stocké au niveau du foie, dans la ferritine et l'hémosidérine et le quantifier. Cette méthode est coûteuse et les hôpitaux disposent rarement des équipements nécessaires.

### II/3)4) IRM [99]

S'il ne crée pas lui-même un signal d'imagerie par résonance magnétique, le fer possède des propriétés 'supermagnétiques' qui influent sur le signal des protons avoisinants. En effet, le temps de relaxation de ces protons est raccourci, et de façon plus prononcée pour le temps de relaxation transversal (également nommé 'T2'). Ce raccourcissement est proportionnel à l'excès de fer. Au niveau de l'image obtenue, cela se traduit par une intensité diminuée du signal.

Ce type d'IRM permet d'évaluer et de quantifier la surcharge au niveau hépatique et cardiaque. C'est une méthode standardisée et simple, qui ne requière pas de geste invasif pour le patient. Elle repère précocement l'installation d'une insuffisance cardiaque et permet ainsi l'adaptation préventive des traitements chélateurs, elle représente donc un important progrès dans la gestion de la surcharge ferrique chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques.

Cet examen doit être réalisé au minimum tous les ans lorsque le traitement est stabilisé. L'IRM cardiaque peut être réalisée à partir de 6ans, si l'on suspecte une chélation non appropriée dans la petite enfance.

## III/ La splénectomie

### III/1) Place de la splénectomie dans le traitement de la $\beta$ -Thalassémie [12]

La physiopathologie de la  $\beta$ -Thalassémie entraîne une augmentation de la fonction de filtre macrophagique de la rate, provoquant son augmentation volumique.

Chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques, une ablation de la rate permet de réduire l'importance de l'anémie, en limitant la destruction massive et anticipée des globules rouges. Cette opération est également effectuée en vue de la réduction ou de l'arrêt des transfusions lorsqu'elles sont occasionnelles. La splénectomie était donc très couramment indiquée chez les patients  $\beta$ -TI il y a encore 10ans, lorsqu'un hypersplénisme était avéré (donc face à l'association d'une thrombopénie, d'une neutropénie et d'une splénomégalie).

Aujourd'hui, avec les alternatives possibles et le risque non négligeable de complications, les splénectomies ne sont plus proposées de façon aussi systématique au patient  $\beta$ -TI. Son indication est

plus stricte, elle est destinée essentiellement aux patients âgés de plus de 5 ans, avec un important hypersplénisme et une splénomégalie palpable, pour qui les traitements par chélation et transfusion ne sont pas adaptés.

Chez les patients  $\beta$ -TM, la splénectomie est rarement indiquée. Elle est principalement suggérée afin de réduire les besoins transfusionnels pour un patient nécessitant plus de 200mL/kg/an de concentrés globulaires, ou également lors d'un hypersplénisme flagrant.

### III/2) Conséquence de la splénectomie [100]

Avec une fonction de purification représentée principalement par un rôle immunitaire, la rate est considérée comme un organe secondaire du système immunitaire. D'une part, elle produit les lymphocytes B, responsables de l'immunité spécifique et persistante. D'autre part, elle permet l'immunité dite 'innée' en étant le siège de la phagocytose des bactéries, et en produisant les activateurs du complément.

La splénectomie induit donc une immunodépression, en modifiant notamment la réponse inflammatoire face à l'agression de bactéries ou de parasites.

Le risque de contracter certaines infections bactériennes est donc augmenté. Les bactéries encapsulées (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* de type b, ou encore *Neisseria meningitidis*) sont responsables d'une infection fulminante, de type bactériémie à foyer pharyngé provoquant un tableau de choc septique, et une mortalité de 50 à 70% dans les 2 jours. Nommées 'OPSI' (Overwhelming Post Splenectomy Infection), ces infections ne sont pas prévisibles et peuvent survenir de nombreuses années après la splénectomie.

D'autres infections bactériennes sont aussi favorisées après une splénectomie ; par les bactéries *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, sans être aussi graves que les OPSI.

Enfin, le paludisme et les babésioses sont les parasitoses pour lesquelles les patients splénectomisés sont plus sensibles.

### III/3) Suivi des patients splénectomisés [100]

La prophylaxie des infections bactériennes est assurée par des recommandations vaccinales strictes ainsi qu'une antibiothérapie préventive.

#### *III/3)1. Les vaccinations*

Les vaccins suivants sont à effectuer minimum 15 jours avant l'ablation programmée de la rate (ou dans les 30 jours suivants une opération en urgence): vaccins anti-pneumocoque, anti-*haemophilus*, anti-méningocoque, anti-typhoïde, et antigrippe. Les rappels doivent être scrupuleusement surveillés.

#### *III/3)2. L'Antibiothérapie préventive*

Ce traitement permet de réduire de 84% les infections pneumococciques dans les années suivant l'opération, et d'atténuer le portage sain des bactéries.

Les patients splénectomisés pendant l'enfance vont avoir au minimum 5 ans d'antibioprophylaxie à base de pénicilline ou d'érythromycine, contre 2ans pour les patients opérés à l'âge adulte. Limiter l'apparition de résistance par l'usage d'antibiotiques à spectres étroits est donc essentiel.

## **IV/ Hydroxycarbamide [13] [101] [102]**

En complément du trio transfusion-chélation-splénectomie, des molécules permettant l'induction de l'HbF sont parfois employées, leur place n'étant toutefois pas totalement précisée dans la stratégie thérapeutique du PNDS. Trois classes d'inducteurs ont été identifiées (des agents cytotoxiques, des dérivés d'acide gras à chaîne courte avec un effet inhibiteur des histones déacétylases, et l'EPO recombinante). Seule l'hydroxycarbamide, de la famille des cytotoxiques, est finalement la molécule la plus largement employée.

### IV/1) Place des inducteurs de l'HbF dans le traitement de la $\beta$ -Thalassémie [103] [104]

L'augmentation du taux d'HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) permet une diminution proportionnelle de l'HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) qui ne possède pas de rôle physiologique. L'augmentation proportionnelle des chaînes  $\gamma$  permet de compenser dans une certaine mesure le faible taux des chaînes  $\beta$ , et ainsi d'atténuer le déséquilibre

entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  que présente les patients  $\beta$ -Thalassémiques. L'amélioration de l'anémie est donc le but premier de ce traitement.

L'hydroxyurée, par ses propriétés inhibitrices de l'érythropoïèse, est indiquée en cas de manifestations hématopoïétiques extramédullaires ou d'anémie sévère. Ce traitement est donc surtout utilisé chez les patients atteints de  $\beta$ -Thalassémie intermédiaire, qui présentent plus fréquemment ce type de tumeurs. Par ailleurs, le taux d'HbF étant déjà élevé chez les patients  $\beta$ -TM, l'intérêt de cette molécule est plus réduit pour ces derniers.

A l'heure actuelle, la durée idéale du traitement est encore inconnue. C'est pourquoi la spécialité Siklos® fait encore l'objet d'une étude de cohorte post commercialisation qui doit durer au moins 10ans, période pendant laquelle plus de 2000 patients doivent être suivis.

Les prescriptions des spécialités se font Hors AMM, leurs indications dans la  $\beta$ -Thalassémie n'ont pas encore été reconnues officiellement. (Siklos® est indiqué officiellement pour les drépanocytaires tandis que la spécialité Hydrea® est réservée à l'oncologie, traitant des pathologies comme la Leucémie Myéloïde Chronique).

## IV/2) Données pharmacologiques

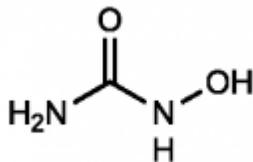


Figure 14 : La molécule d'Hydroxycarbamide [105]

Les propriétés antinéoplasiques de l'hydroxyurée, autre nom de l'hydroxycarbamide, ont été découvertes il y a plus de 45ans.

Cette molécule provoque l'inhibition de la ribonucléotide diphosphate réductase : cette enzyme a un rôle primordial dans la synthèse de l'ADN puisqu'elle permet la réduction des ribonucléotides en déoxyribonucléotides. En empêchant cette étape, l'hydroxyurée inhibe non seulement la synthèse de l'ADN mais également sa réparation.

Son action rapide se concentre surtout au niveau de la moelle osseuse, où elle stoppe en premier la granulopoïèse, suivi de la thrombocytopoïèse et enfin l'érythropoïèse. Cependant le mécanisme d'action spécifique de la molécule n'est pas encore parfaitement maîtrisé.

La diminution des neutrophiles, l'augmentation de la teneur en eau des hématies engendrant une macrocytose, et l'altération de l'adhésion des hématies à l'endothélium vasculaires sont d'autres propriétés pharmacologiques de la molécule.

Enfin, l'hydroxycarbamide est capable d'augmenter en moyenne le taux d'HbF de 1 à 5 g/L par rapport au taux d'origine, après 3 à 6 mois d'administration.

La molécule permet une résorption digestive satisfaisante, autorisant une voie d'administration orale. Son élimination est en majorité urinaire.

### IV/3) Posologie et mode d'administration

La dose journalière moyenne est de 16mg/kg/jour, par voie orale (soit deux fois moins que pour les patients drépanocytaires).

Si le patient ne répond pas positivement au traitement après avoir reçu pendant 6mois la dose maximale, l'arrêt total du traitement est à considérer. Environ 1 patient sur 2 ne répond pas favorablement au traitement à l'issue de cette période.

Enfin, ce traitement n'est pas recommandé pour les enfants de moins de 2ans.

### IV/4) Effets secondaires de l'Hydroxycarbamide

Les affections de type myélosuppression sont les plus fréquents effets secondaires de la molécule. Cela comprend une neutropénie (Neutrophiles < 1700/mm<sup>3</sup>), une thrombopénie (Plaquettes < 150 000/mm<sup>3</sup>) et un taux de réticulocytes inférieur à 20 000/mm<sup>3</sup>.

Fréquemment, des affections du système nerveux central sont observées, se manifestant par des vertiges, céphalées, nausées, vomissements.

Les patients présentent aussi des réactions cutanées ; des changements de pigmentation sont observés.

Les ulcères de jambes sont fréquents, d'autant plus à surveiller qu'ils sont également des complications habituelles présentées par les patients  $\beta$ -TI.

Enfin, L'hydroxycarbamide, en traversant la barrière placentaire, exerce un effet tératogène et embryotoxique.

Du fait de la toxicité flagrante de la molécule, même la manipulation du comprimé lors de son administration doit faire l'objet de précautions, en évitant le contact prolongé du médicament avec la peau.

#### IV/5) Surveillance du traitement [106]

Avant la mise en place du traitement, un bilan hématologique complet doit être effectué, ainsi que l'évaluation des fonctions rénales et hépatiques. Un patient en insuffisance rénale doit recevoir une dose adaptée.

Les bilans hématologiques sont ensuite effectués toutes les semaines à l'instauration du traitement, puis espacés jusqu'à une fois tous les deux mois, selon la réponse au traitement et la tolérance du patient à celui-ci.

La croissance des enfants traités faire également l'objet d'un suivi accentué.

La co-prescription d'acide folique est recommandée afin de prévenir un déficit dû à l'hyperactivité de la moelle osseuse. Cette supplémentation est nécessaire de façon générale pour les patients  $\beta$ -TI.

## **V/ La Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) [107] [24]**

Le tissu sanguin d'une personne non malade se renouvelle et est constamment régulé grâce aux cellules souches hématopoïétiques, cellules indifférenciées et capables d'auto-renouvellement.

Par conséquent, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques saines à des patients affectés d'hémoglobinopathies, également appelée 'greffe de moelle osseuse', permet de leur restaurer une hématopoïèse normale.

La réussite d'une greffe dépend donc de sa capacité à rétablir des fonctions médullaires normales.

#### V/1) Place de la greffe de CSH dans le traitement de la $\beta$ -Thalassémie [108]

Les CSH du patient  $\beta$ -Thalassémique à l'origine de l'érythropoïèse inefficace, elle-même responsable de la cascade de complications, sont remplacées par les CSH du donneur, permettant ainsi

l'érythropoïèse normale chez le patient et donc la synthèse de globules rouges sains. Cette production d'érythrocytes normaux offre une solution curative pour l'anémie hémolytique dont souffre le patient, et permet de se libérer de la dépendance aux transfusions, tout en s'affranchissant non seulement de la surcharge en fer mais aussi de ces nombreux effets secondaires.

Actuellement le seul traitement curatif dans les recommandations officielles, la greffe de CSH est donc une alternative non négligeable face aux traitements conventionnels. En effet, 85% des enfants  $\beta$ -Thalassémiques transplantés survivent sans la maladie après avoir été greffés. La greffe est maintenant systématiquement conseillée lorsqu'un membre de la famille du jeune patient est un potentiel donneur, face à une  $\beta$ -Thalassémie majeure. Pour les  $\beta$ -TI, la greffe est envisageable lorsque l'anémie s'est aggravée et que le patient se dirige vers une dépendance certaine aux transfusions. La greffe peut également s'imposer lorsque les transfusions ne sont pas régulières mais que le patient  $\beta$ -TI fait face à une impasse transfusionnelle, ou encore suite à un échec de la splénectomie, du traitement par hydroxycarbamide.

L'âge adéquat pour une tel greffe dans la  $\beta$ -Thalassémie n'a pas encore été déterminé, ce paramètre est toujours en cours d'étude. Il est cependant conseillé d'attendre 2ans, âge où le diagnostic de  $\beta$ -TM devient définitif.

D'un autre point de vue, on peut dire que ce type de greffe représente déjà une forme de thérapie génique. En effet, des CSH possédant des anomalies génétiques sont substituées par des cellules génétiquement saines.

## [V/2\) Modalités de la greffe de cellules souches hématopoïétiques](#) [\[109\]](#) [\[110\]](#)

### *V/2)1) Avant la Greffe : la préparation du receveur*

#### **V/2)1)a. Bilan général**

D'une part, une évaluation de l'impact de l'anémie et de la surcharge en fer sur l'état général du candidat à la greffe est effectuée. D'autre part, la toxicité des traitements en cours est analysée afin d'identifier les potentielles atteintes hépatiques, cardiaques, rénales, ou pulmonaires, d'en déduire les risques de la greffe, et finalement de statuer sur son indication.

Suite à ce bilan complet, si la greffe est décidée, des modifications des traitements usuels peuvent être soumises. La chélation et les transfusions peuvent être augmentées pour favoriser la suppression

de l'érythropoïèse  $\beta$ -Thalassémique et de la surcharge en fer cardiaque, et atteindre une ferritinémie inférieure à 1000 $\mu$ g/L. Une splénectomie partielle peut être également recommandée en cas de splénomégalie persistante.

Les examens à effectuer spécifiques à la  $\beta$ -Thalassémie sont donc nombreux, chaque fonction organique possiblement atteinte par la pathologie ou par les effets secondaires des traitements doit être explorée.

On dénombre trois facteurs de risque vouant la greffe à l'échec : une chélation insuffisante du fer, mise en place tardivement, à posologie non adaptée, une hépatomégalie palpable, et la présence histologiquement prouvée d'une fibrose hépatique concourent à la non réussite de la greffe.

### **V/2)1)b. Le Conditionnement**

Autrement appelé 'chimiothérapie myéloablative', ce programme de traitement a pour but de détruire les cellules de la moelle osseuse du receveur, afin de permettre l'implantation sans rejet des cellules normales du donneur. Dans le cadre des  $\beta$ -Thalassémies, le conditionnement est couplé à des molécules freinant totalement l'érythropoïèse pathologique.

Selon le nombre de facteurs de risque d'échec de la greffe présenté par le patient  $\beta$ -Thalassémique, le conditionnement est adapté, des associations sont alors effectuées. 4 molécules sont principalement utilisées pour ce conditionnement :

- **Le Busulfan [111]**

Cet agent alkylant de l'ADN fait partie de la classe thérapeutique des antinéoplasiques. Il cible spécialement la granulopoïèse par un mécanisme encore méconnu.

- **Le Cyclophosphamide [112]**

Autre agent alkylant, le cyclophosphamide est une prodrogue de la famille des moutardes azotées. Par son action antiméiotique, il inhibe la transcription et la réplication de l'ADN pendant les cycles de divisions cellulaires.

- **Le SAL : Sérum Anti-Lymphocytaire [113]**

Produit à partir de globulines anti-thymocytes de lapin, le SAL permet la déplétion des lymphocytes T du sang périphérique et des organes lymphoïdes, et agit en parallèle sur les molécules d'adhésion et sur les cellules dendritiques. Il a donc une action immunomodulatrice.

- **L'hydroxyurée**

L'Hydroxyurée est associée notamment en cas d'expansion médullaire due à la  $\beta$ -Thalassémie. (Cf. Partie 2, IV)1).

L'association la plus classique pour le conditionnement est l'administration concomitante de Busulfan et de Cyclophosphamide.

Outre les effets myélosuppresseurs et immunosuppresseurs recherchés de ce conditionnement, les effets secondaires qu'il engendre sont également nombreux. D'une part, sa cytotoxicité peut toucher tous les systèmes dont la régénération cellulaire dépend des cellules souches. Des ulcères buccaux et digestifs, nausées, vomissements, des éruptions cutanées, une alopecie, des brûlures vésicales, une forme de pneumonie, des œdèmes, et enfin une occlusion des veines portales peuvent être observés.

D'autre part, l'immunosuppression engendre une multiplication du risque infectieux, notamment face aux candidoses, aspergilloses, toxoplasmoses et pneumocystoses.

La cryopréservation ovarienne, de sperme ou de fragments testiculaires est proposée avant le conditionnement. En effet, la toxicité sur la fertilité du busulfan est largement reconnue et une information systématique sur cette possibilité de cryopréservation est effectuée auprès des parents des patients, ou auprès des patients eux-mêmes selon leur âge.

### *V/2)2) Quel donneur ?*

La greffe indiquée pour les patients  $\beta$ -Thalassémiques est de type allogénique : les CSH injectées proviennent d'un donneur autre que le patient lui-même, par opposition aux greffes autologues. Il faut donc rechercher le donneur génétiquement le plus compatible avec le patient. Dans le cadre des  $\beta$ -Thalassémies, un don intra-familial est recommandé, la compatibilité la plus élevée étant avec une personne de la fratrie du patient, à condition qu'elle ne soit pas porteuse du gène pathologique. Mais avec 1 chance sur 4 d'être compatibles, un frère et une sœur ne représentent pas systématiquement

une possibilité de greffe. Cependant la probabilité d'une compatibilité étroite est toutefois beaucoup plus élevée dans une fratrie qu'avec un individu non parent.

Le recours à un donneur volontaire non apparenté est donc possible mais comporte de plus grands risques de non réussite de la greffe. Elle n'est conseillée que pour deux catégories de patients  $\beta$ -Thalassémiques ne possédant pas de parents compatibles : lorsque les transfusions ne sont plus possibles suite à la déclaration d'une allo-immunisation, ou que la chélation n'est plus supportée.

La compatibilité donneur/receveur ainsi que le choix final du donneur sont déterminés par les médecins transplantologues. La détermination du système HLA de chacun est effectuée via de nombreux tests de dépistages moléculaires, notamment par la comparaison des gènes exprimant les antigènes HLA situés sur les surfaces cellulaires.

En revanche, les groupes sanguins du donneur et du receveur n'ont pas besoin d'être identiques.

*Système HLA [114]: Ce système génétique fait partie du complexe majeur d'histocompatibilité, il code pour les éléments assurant la présentation de l'antigène et l'histocompatibilité. Il est extrêmement polymorphe et des milliards de combinaisons sont possibles ; en effet, l'expression de ses gènes est concomitante : les allèles du père et de la mère sont tous les deux exprimés.*

### V/2)3) Quelles cellules pour le greffon?

Outre sa compatibilité génétique avec le receveur, le greffon doit également être en quantité suffisante pour que la transplantation soit une réussite, et ne pas être sujette au rejet. Les besoins en moelle osseuse dépendent de la taille du receveur, ainsi que de son poids et de son âge. Injecter trop peu de CSH mène à un échec thérapeutique. Dans le traitement des  $\beta$ -Thalassémies, les greffons doivent être particulièrement riches en CSH pour compenser l'érythropoïèse inefficace de base.

Les cellules pour les greffes de CSH peuvent provenir de trois sources différentes, le sang périphérique, la moelle osseuse et le sang placentaire. La moelle osseuse relargue une quantité trop restreinte de CSH dans la circulation sanguine périphérique, cette source n'est donc que rarement utilisée dans le cadre des  $\beta$ -Thalassémies.

#### V/2)3)a. Cellules de la moelle osseuse

Elles représentent la source la plus classiquement utilisée, mais pour environ 12% des patients  $\beta$ -Thalassémiques greffés, le greffon 'ne prend pas' : les cellules injectées ne s'auto-renouvellent pas et la greffe échoue.

La greffe de moelle osseuse est contraignante également pour le donneur. Tout d'abord, il doit se prêter à un bilan médical complet. Puis le prélèvement, à l'aiguille au niveau des os supérieurs du bassin, représente une vraie intervention chirurgicale. Des douleurs post prélèvements peuvent être ressenties pendant plusieurs jours suivant cet acte chirurgical. Enfin, il faut 4 à 6 semaines pour que la moelle osseuse du donneur soit entièrement régénérée.

### **V/3)3)b. Cellules du sang placentaire**

Ce type de greffon est destiné à des enfants, son utilisation permet de diminuer les risques de réactions des greffons contre le receveur par rapport à une greffe de moelle osseuse classique. Cependant, le nombre de CSH qu'il contient est faible, ce qui expose le receveur à un risque plus élevé de rejet ou de non prise, le conditionnement doit donc être optimisé pour palier ce risque. Comme pour les greffes de moelle osseuse, un donneur de la fratrie augmente les chances de survie sans  $\beta$ -Thalassémie pour le patient comparé à un donneur non apparenté. Lorsque la maladie est découverte dans une famille, la cryopréservation du sang placentaire lors des naissances suivantes est recommandée.

### *V/2)4) La transplantation*

Injecter des CSH sous forme de suspension cellulaire est un geste similaire aux transfusions sanguines. L'administration dure plusieurs heures et doit s'effectuer via un cathéter central.

Durant cette perfusion, l'absence de signe de fièvre, d'urticaire, de chute de tension artérielle ou d'essoufflement est fréquemment vérifiée. Ils pourraient indiquer une réaction immunitaire aigüe du patient contre le greffon.

Physiologiquement, les CSH saines injectées traversent la moelle osseuse du receveur et s'y implantent. Elles débutent la production de nouvelles cellules sanguines dans les 2 à 4 semaines suivantes.

## [V/3\) Suivi post-greffe \[109\] \[115\]](#)

### *V/3)1) Suivi immédiat*

Dans les jours suivant la greffe, suite aux traitements d'immunosuppression du conditionnement, le patient doit être isolé en secteur stérile afin de limiter tout risque d'infection, jusqu'à ce qu'il retrouve des fonctions immunitaires, un taux de globules blancs suffisant. La période d'hospitalisation est

d'une durée variable : prend fin lorsque le bilan sanguin est favorable, que l'appétit remonte alors que les troubles digestifs ont diminués, et enfin que le patient ne présente pas d'hyperthermie.

### *V/3)2) Prévention de la Maladie du Greffon Versus Hôte (MGVH) [116]*

La réaction du Greffons Versus Hôte survient lorsque les cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T, du greffons s'attaquent aux cellules du patient receveur alors reconnues comme antigènes. Elle est fréquente chez les patients allogreffés, de forme aigue ou chronique, et de gravité variable, mais augmentant avec l'âge. La gravité dépend également de l'importance des différences entre les groupes tissulaires du donneur et du receveur.

La MGVH provoque en premier des manifestations cutanées (des éruptions, des brulures, ou encore des rougeurs), des troubles de l'appareil digestif (de type nausée, vomissement, diarrhée), des lésions hépatiques déclarées par un ictère, et enfin des défaillances atteignant de nombreux organes. La qualité de vie du patient peut être largement atteinte par la MGVH chronique. Dans les formes aigues graves, la MGVH provoque jusqu'à 30% de mortalité.

Le traitement préventif immunosuppresseur est à base de ciclosporine, préservant l'hématopoïèse mais inhibant les lymphocytes quiescents. La ciclosporine est parfois associée au méthotrexate, molécule antinéoplasique à action cytostatique. Débuté 2 jours avant la greffe, ce traitement doit ensuite être poursuivi plusieurs mois (au minimum 6 mois, puis continué 3 mois à doses dégressives avant l'arrêt total). Les effets secondaires fréquents de la ciclosporine sont une augmentation de la tension artérielle, une paresthésie, une hypertrichose, des gencives gonflées, ou encore l'apparition d'œdèmes.

Le traitement curatif de la MGVH est à base d'anti-inflammatoires stéroïdiens, de SAL et d'anticorps monoclonaux (anti-CD25 et anti-TNF $\alpha$ ). Une MGVH aigue résistante aux corticoïdes expose à un risque de mortalité de plus de 75%.

### *V/3)3) Rejet du greffon*

Dans de rare cas (5%), la prophylaxie du rejet par le conditionnement n'est pas toujours suffisante pour l'éviter. Lors de greffe allogénique, Le rejet est le résultat de la réaction du système immunitaire du patient contre les cellules du greffon, repérées comme antigènes. Face à une telle situation, une seconde greffe peut être envisagée après un conditionnement adapté.

#### *V/3)4) Réduction de la surcharge martiale*

Après la transplantation, la surcharge en fer doit être également suivie et traitée jusqu'à ce que la greffe soit efficace et que les symptômes thalassémiques disparaissent.

Avec la toxicité avérée des chélateurs oraux, et l'association déconseillée avec la ciclosporine décuplant les effets secondaires, il est recommandé durant la première année post-greffe d'employer les phlébotomies, ou 'saignées', en vue de diminuer la surcharge en fer hépatique. Tout d'abord tous les 15 jours, puis tous les mois, 5mL/kg de sang sont prélevés, dès lors que le taux d'Hb du patient est supérieur à 10g/dL.

Le relai peut être pris par le déférasirox lorsque le traitement par la ciclosporine est achevé. Enfin, le traitement est arrêté lorsque les stocks en fer ont atteint les taux satisfaisants ciblés suivants : une ferritine inférieure à 500 µg/L, et une IRM hépatique montrant une CHF inférieure à 125 µmol/g.

La ferritine n'est pas toujours un bon indicateur du suivi de la surcharge en fer la première année post-greffe, en effet, des inflammations concomitantes telle que la MGvH peuvent provoquer une élévation parallèle du taux de ferritine. Il faut donc se fier aux résultats d'IRM pour mieux évaluer la surcharge en fer résiduelle.

#### *V/4)5) Maladie veino-occlusive [117]*

Le busulfan utilisé pour le conditionnement ainsi que la  $\beta$ -Thalassémie en elle-même sont 2 facteurs de risques distincts de maladie veino-occlusive. Cette affection est liée à l'obstruction des veines hépatiques, dégradant alors les fonctions du foie. Un traitement préventif est donc recommandé pour certains patients identifiés à risque, et dans cette indication seul le Defitelio® (défibrotide), médicament orphelin, a été démontré comme efficace. Cet antithrombotique atypique agit en augmentant le potentiel fibrinolytique au niveau des endothéliums et en offrant une protection cellulaire à ces derniers.

Plus de 15% des patients  $\beta$ -Thalassémiques présentent une maladie veino-occlusive après une greffe.

## VI/ Conclusion sur les recommandations officielles

### VI/1) Les limites des traitements symptomatiques

Le protocole de traitement le plus répandu pour la  $\beta$ -Thalassémie à travers le monde est donc celui par transfusion associée à la chélation.

En France, un haut degré de sécurité transfusionnelle est assuré par une maîtrise de chaque étape de la chaîne transfusionnelle. Depuis la sélection des donneurs selon des critères stricts, jusqu'aux derniers tests réalisés au pied du lit du receveur assurant sa compatibilité avec le don, tout est mis en œuvre pour minimiser les risques transfusionnels. Mais ce protocole lourd est également source de nombreuses erreurs potentielles. Par ailleurs, la sécurité des dons et des transfusions est loin d'être égale dans tous les pays de monde, les risques infectieux peuvent notamment être beaucoup plus élevés dans certaines régions du globe.

Les chélateurs, entre l'administration par perfusions et leurs nombreux effets secondaires, présentent de nombreux facteurs poussant le patient à ne pas toujours être observant.

Toutes les complications secondaires à la surcharge en fer ; cardiaques, hépatiques, osseuses, endocriniennes engendrent également des traitements spécifiques qui alourdissent l'ordonnance.

Par conséquent, l'éducation thérapeutique du patient est primordiale, notamment pour assurer l'observance des traitements même lorsque de nombreux effets indésirables sont ressentis par le patient. Sa connaissance de la maladie, de l'utilité de chaque médicament, de leurs toxicités et leurs signes d'alerte permet de limiter les échappements thérapeutiques. Une hygiène de vie en adéquation avec les besoins de la maladie est nécessaire : de l'exercice physique, une exposition adaptée au soleil, une absence de tabagisme et enfin, une alimentation équilibrée, limitant le fer mais permettant des apports suffisants en vitamine E, vitamine C, et en calcium. Un patient qui comprend bien sa maladie et l'accepte adhérera donc plus facilement au traitement s'il en connaît les enjeux. Une fiche informative peut être un bon outil pour expliquer les grandes lignes de la maladie, du traitement, et ainsi faire prendre conscience de la nécessité de suivre les traitements, en particulier les chélateurs. Une telle fiche est proposée en Annexe 2, pense-bête des traitements et des suivis à réaliser et leurs intérêts, elle peut également représenter un support pratique pour aborder des sujets parfois difficiles avec l'équipe thérapeutique et faciliter ainsi les échanges.

En conclusion, même si la prise en charge du patient  $\beta$ -Thalassémique s'est améliorée notamment avec l'arrivée des chélateurs oraux, le protocole Transfusion-Chélateur reste contraignant pour le patient. Vecteur de nombreux risques, il influe indéniablement sur la qualité de vie.

## VI/2) Les limites du traitement curatif par la greffe de CSH

Malgré le criblage HLA de plus en plus performant pour sélectionner le donneur montrant une compatibilité la plus élevée avec le receveur, le rejet et la MGvH sont encore récurrents. En effet, certaines protéines de surface cellulaire ne sont pas analysées lors du typage et peuvent présenter des variabilités. Ou encore, des typages HLA présentant une compatibilité autorisant la greffe, mais avec une infime différence provoquent *in fine* une réaction anticorps-antigène. Un certain taux d'incompatibilité est donc toujours présent lors d'une allogreffe.

Les greffes intrafamiliales sont ainsi recommandées, tandis que la réalisation de greffe non apparentées nécessite une grande réflexion quant à sa balance bénéfice/risque pour le patient. En effet, il faut tenir compte d'une part des hauts risques représentés par la MGvH, des autres complications lors d'une allogreffe non apparentée, et des lourds traitements en phase de greffe. D'autre part, l'amélioration de l'espérance et de la qualité de vie des patients avec les traitements conventionnels d'aujourd'hui est un fait non négligeable. En conséquence, le recours à un donneur non apparenté n'est à discuter que lorsqu'il existe une impasse de ce traitement conventionnel.

Dans certains cas, le patient  $\beta$ -Thalassémique fait face à une réelle impasse thérapeutique. (cf Annexe 4). De nombreuses pistes thérapeutiques sont actuellement explorées, en passant par l'amélioration de la prise en charge de la surcharge martiale, jusqu'à la découverte d'alternatives à la greffe de CSH non apparentée en vue de libérer définitivement le patient de sa pathologie.

## PARTIE 3 : NOUVELLES PISTES THERAPEUTIQUES

### I/ Amélioration de la prise en charge de la surcharge en fer

De nombreuses pistes sont explorées afin de limiter la surcharge en fer, en agissant sur son absorption, ou en optimisant son élimination. La découverte de nouveaux régulateurs du métabolisme du fer permettent d'identifier de nouveaux sites d'actions thérapeutiques potentiels et de multiplier les opportunités de traitements.

#### I/1) Prévenir la surcharge en fer : induire l'hepcidine [118]

##### *I/1)1) Présentation de l'hepcidine*

###### **I/1)1)a. Nature, Synthèse [119]**

L'hepcidine est un petit peptide composé de 25 acides aminés, codé par un seul gène situé sur le chromosome 19. La synthèse de cette hormone s'effectue dans le foie, elle est ensuite libérée dans la circulation sanguine. L'intestin et les macrophages sont ses deux principales cibles d'actions.

L'hepcidine est également exprimée dans d'autres tissus, tels que les adipocytes, le myocarde, et l'estomac, y exerçant des rôles secondaires encore méconnus.

###### **I/1)1)b. Rôles et mécanismes d'action [120]**

Le récepteur de l'hepcidine est la ferroportine, située à la surface des entérocytes et des macrophages. La ferroportine est une protéine transmembranaire responsable de l'export du fer depuis les cellules vers le plasma. L'interaction ferroportine-hepcidine provoque l'internalisation puis la dégradation lysosomale de la ferroportine. Le fer intracellulaire est alors séquestré, sans moyen de transport et lié à la ferritine, ce qui limite l'augmentation de la concentration en fer dans le sang et la saturation de la transferrine.

Au niveau des entérocytes, cela se traduit par l'inhibition de l'absorption intestinale du fer alimentaire. Au niveau des macrophages, le fer provenant de la dégradation de l'hémoglobine n'est pas recyclé.

Par ces deux rôles, cette hormone hyposidérémiante se place donc comme un régulateur primordial dans l'homéostasie du fer.

Par conséquent, si ce régulateur négatif est absent, il est observé une augmentation de l'absorption intestinale du fer ainsi qu'une augmentation de son recyclage au sein des macrophages (cf figure 15). Ces phénomènes conjugués aboutissent à l'accumulation du fer dans les tissus, notamment hépatiques, responsable en partie de la surcharge martiale dont sont atteints les patients  $\beta$ -Thalassémiques.

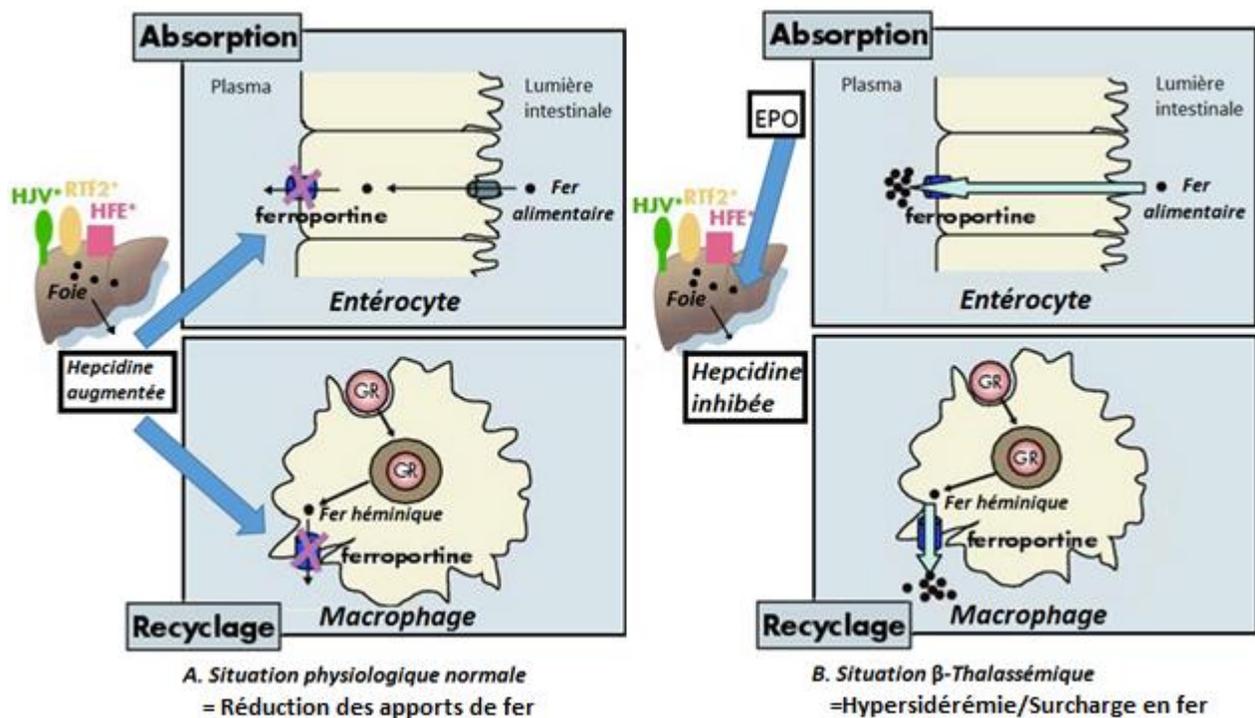


Figure 15 : Interaction ferroportine-hepcidine et son impact sur la régulation du fer [121]

### I/1)1)c. Place de l'hepcidine dans le traitement de la $\beta$ -Thalassémie [122] [118]

		Taux d'hepcidine	Absorption du fer	Quantité de fer dans les tissus	Erythropoïèse	Etat Clinique
Souris Témoin normal		Normal	Normale	Normale	Normale	Normal
Souris $\beta$ -Thalassémique	Hepcidine transgénique	Diminué ++	Augmentée ++	En excès	Inefficace	→ Anémie
		Corrigé = Normal	Normale	Normale	Améliorée	→ Amélioration de l'Anémie
		Augmenté ++	Diminuée	Fer retenu dans les macrophages	Inefficace	→ Aggravation de l'Anémie

Figure 16 : Expérience montrant l'effet de l'hepcidine sur l'état clinique de souris  $\beta$ -Thalassémiques. [122] [118]

Des souris saines ont été modifiées sur le plan génétique pour qu'elles expriment l'hepcidine de façon constitutive; ces souris ont été ensuite croisées avec des souris  $\beta$ -Thalassémiques. Chez les souris  $\beta$ -Thalassémiques ainsi obtenues, qui expriment le transgène de l'hepcidine, l'anémie est améliorée et la teneur en fer des tissus est diminuée par rapport à une souris  $\beta$ -Thalassémique non transgénique.

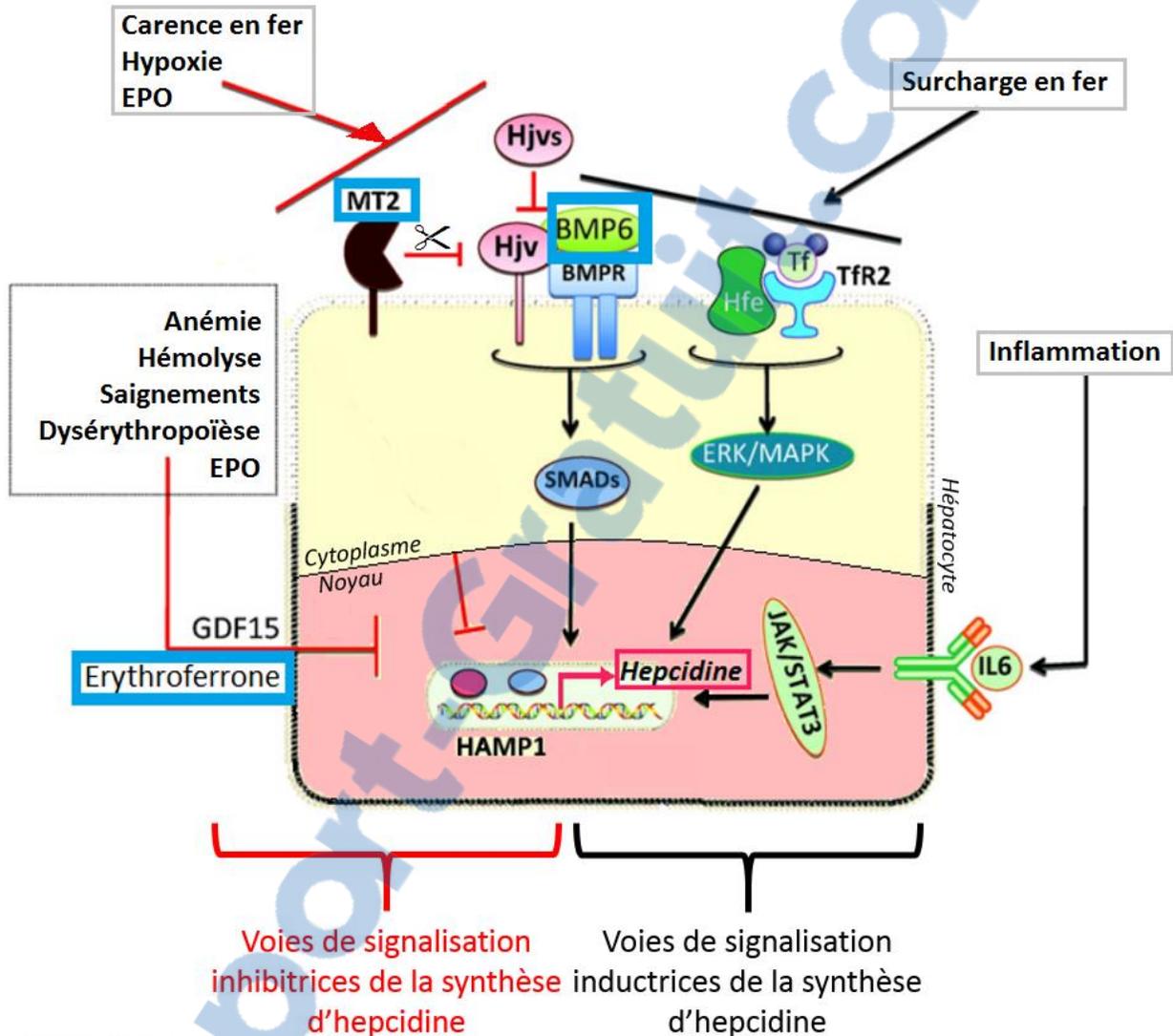
L'hypothèse suivante est avancée : en limitant le fer disponible pour les précurseurs érythroïdes, le taux de chaînes d' $\alpha$ -globine libres est diminué, les hémichromes et les ROS également. La survie des globules rouges est ainsi allongée; l'efficacité de l'érythropoïèse est améliorée. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'un nombre réduit de précurseurs érythroïdes, avec une proportion également diminuée de précurseurs immatures, a été détecté au niveau de la rate des souris  $\beta$ -Thalassémiques exprimant le transgène de l'hepcidine.

Par contre, si l'hepcidine est synthétisée de façon trop importante, son activité est réprimée : l'anémie n'est pas corrigée mais aggravée.

Ce dernier constat indique que la concentration d'hepcidine doit se situer entre deux valeurs seuils, et que les thérapies ciblant cette hormone ont donc une fenêtre étroite pour agir.

### I/1)1)d. Régulation moléculaire de l'hepcidine [21] [120] [121]

L'hepcidine est synthétisée quantitativement en fonction de trois principaux stimuli : l'état des stocks de fer, l'état inflammatoire, et l'EPO.



 Cibles thérapeutiques

Figure 17 : Voies de régulation de la synthèse hépatique d'hepcidine chez des sujets sains et localisation des cibles potentielles pour traiter la  $\beta$ -Thalassémie [21] [120]

Ces stimuli déclenchent des cascades de facteurs qui au final inhibent ou activent la transcription du gène HAMP1 (*Hepcidin AntiMicrobial Peptide*), régulant l'expression de l'hepcidine.

- **Les voies de l'activation de la transcription du gène HAMP1**

**-BMP6/SMADs:** L'expression du ligand BMP6 (*Bone Morphogenic Protein*) est proportionnelle à la concentration intrahépatique du fer: plus la concentration en fer est élevée, plus BMP6 est activé. BMP6 se fixe sur son récepteur BMPR, leur interaction active alors les SMADs. Les SMADs sont des protéines qui vont pénétrer dans le noyau et se lier au gène pour initier sa transcription. Le corécepteur à BMP6, HJV (*Haemojuvelin*, une protéine extracellulaire fixée à la membrane hépatocytaire), est indispensable pour activer les SMADs.

**-TfR2/MAP-kinase:** La transferrine (Tf) se fixe sur son récepteur (TfR2), ils interagissent alors avec la protéine membranaire HFE (*High Fer*). Les protéines ERK 1-2 (*Extracellular signal-regulated kinases*) de la famille des MAP-kinase (kinases ayant des rôles dans la division des cellules, leurs croissances et proliférations) sont ainsi stimulées et déclenchent la synthèse de l'hepcidine.

**-IL6/JAK2/STAT3:** Après fixation sur son récepteur hépatocytaire, la cytokine IL6 (Interleukine 6, active lors d'une phase inflammatoire aigue), provoque l'activation de la protéine JAK2 (*Janus kinase*). JAK2 stimule ensuite la voie des protéines STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*), ces dernières pénètrent dans le noyau cellulaire où elles exercent alors leur fonction de facteur de transcription du gène HAMP.

*\*Cytokine : ces substances solubles de signalisation cellulaire sont synthétisées par plusieurs types de cellules, et agissent à distance sur d'autres cellules par l'intermédiaire de récepteur pour en réguler l'activité et la fonction.*

- **Les voies inhibitrices de la transcription du gène HAMP1 [123]**

**-MT2:** La Matriptase 2, une sérine protéase membranaire, clive la protéine coréceptrice HJV et empêche le déclenchement de la voie de signalisation BMP6/SMADs.

**-HJVs:** Les protéines HJV solubles inhibent également la voie BMP6/SMADs, en interférant avec HJV.

**-L'érythroferrone:** Découverte depuis peu, elle est également une hormone régulatrice négative de l'expression de l'hepcidine, qui agit via l'EPO (voir le paragraphe I/1)2 ).

L'EPO est une hormone au rôle prépondérant dans ce schéma régulateur. Elle permet d'expliquer le paradoxe de l'inhibition chronique de l'hepcidine chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques intermédiaires alors que les patients sont surchargés en fer. En effet, la répression de la synthèse d'hepcidine par l'EPO est un signal régulateur fort, qui s'impose même en cas d'inflammation ou de surcharge martiale. Chez les patient  $\beta$ -Thalassémiques majeurs, les transfusions limitent l'érythropoïèse

inefficace, le taux d'hepcidine est donc plus élevé (la synthèse est stimulée d'une part par le pool de fer directement apporté des transfusions, et d'autre part l'EPO, non stimulée, n'agit pas comme régulateur négatif). Cependant, entre les transfusions, la concentration en hepcidine chute progressivement, et le taux régulièrement bas d'hepcidine contribue également à la surcharge en fer chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques majeurs.

Pour conclure, la régulation de la synthèse d'hepcidine est complexe, de nombreux facteurs entrent en jeu dans la stimulation de la transcription du gène HAMP1. Mais ces nombreux facteurs multiplient également les possibilités pour agir sur le plan thérapeutique, et des cibles pour activer la synthèse d'hepcidine ont été identifiées.

### */1)2) Les agonistes de l'hepcidine, outils thérapeutiques [120] [124]*

Les agonistes de l'hepcidine sont des composés qui miment directement ses effets ou qui provoquent indirectement sa synthèse.

Leur but est de permettre l'augmentation de la concentration en hepcidine dans la circulation sanguine des patients  $\beta$ -Thalassémiques afin de limiter leur surcharge en fer et de corriger leur anémie.

#### **/1)2)a. Les agonistes directes : les 'mini-hepcidines' [125] [123]**

Afin de mettre au point un analogue permettant d'être absorbé oralement, leur poids moléculaire a été réduit par rapport à celui de l'hepcidine originale, qui ne possède pas elle-même des propriétés pharmacologiques adéquates. Les acides aminés porteurs de l'activité de l'hepcidine ont été sélectionnés: les agonistes comportent donc seulement 9 acides aminés essentiels, contre 25 pour l'hepcidine physiologique.

- **PR65** [126]

Cet agoniste, testé chez les souris, s'est montré plus efficace en prévention de la surcharge en fer, plutôt que pour diminuer le taux de fer une fois la surcharge constituée. Il serait donc à mettre en place dès que le diagnostic de la maladie est posé, ou alors en accompagnement des chélateurs pour parvenir à diminuer une surcharge lorsque ces derniers ne suffisent pas. A forte dose, PR65 a induit une importante hyposidérémie aggravant l'anémie, ce qui suggère que ce composé devrait avoir des méthodes de dosages adaptés, permettant la surveillance du traitement.

- **Hepcidine cyclique**

Des recherches pour cycliser l'analogue ont été menées. Les composés ainsi obtenus sont des peptides très stables, mais qui cependant ne permettent pas l'internalisation de la ferroportine; l'activité de l'hepcidine n'est donc pas reproduite.

Les futures générations de mini-hepcidine sont en cours de formulation. La réussite du développement d'un analogue oral de l'hepcidine représenterait non seulement une amélioration pour les thérapies de la surcharge en fer mais également une avancée majeure pour la pharmacologie des peptides en général, relevant le défi complexe de l'administration orale.

### **I/1)2)b. Les agonistes indirectes : Action sur la voie de régulation BMP6-SMAD**

- **Action sur la Matriptase 2 [21] [127]**

Le gène codant pour la MT2 est nommé Tmprss6. Il est prouvé que des mutations de ce gène chez les hommes mènent à des taux élevés d'hepcidine et un défaut d'absorption du fer, conduisant à une anémie ferriprive.

Afin d'utiliser le potentiel thérapeutique du gène Tmprss6 dans la  $\beta$ -Thalassémie, il faut créer une solution antagoniste à ce gène. Deux moyens ont été employés, les ARNsi et les oligonucléotides antisens. Ils forment des 'thérapies antisens':

-**L'ARNsi [128] [129]:** 'Small interfering' ARN, inhibe la traduction du gène Tmprss6 en le rendant silencieux, la protéine MT2 n'est alors pas synthétisée et n'interfère donc pas avec la voie de signalisation BMP6/SMADs : la production d'hepcidine est effective. Des nanoparticules lipidiques ont été mises au point afin de vectoriser l'ARNsi de Tmprss6.

Ces nanoparticules lipidiques ont été testées chez des souris  $\beta$ -TI, l'expression de l'hepcidine a bien été induite, la surcharge en fer réduite et la dysérythropoïèse limitée.

L'effet d'une thérapie combinée par l'ARNsi et le chélateur défériprone a été étudié sur des souris  $\beta$ -TI: La diminution du fer hépatique est plus importante lors du traitement combiné qu'avec ces 2 traitements seuls. Le complément des deux traitements pourrait être intéressant lorsque la surcharge en fer est déjà constituée, la séquestration du fer dans les macrophages qu'induit l'hepcidine permettrait notamment de limiter sa toxicité entre deux doses de chélateurs.

**-Les oligonucléotides antisens [127]:** Un fragment d'ARN correspondant à un 'oligonucléotide anti-sens' a une séquence nucléotidique qui complète celle de l'ARN messager (ARNm) ciblé (ici l'ARNm de TMPRSS6). Cet ARNm est ainsi modifié et la synthèse de la protéine MT2 ne peut aboutir.

Les oligonucléotides de synthèse obtenus ont été dissous dans un tampon phosphate salin classique pour être administrés par voie injectable.

Chez les souris  $\beta$ -Thalassémiques traitées par oligonucléotides antisens, l'expression du gène codant pour l'hepcidine a augmentée de manière dose-dépendante avec les administrations du traitement expérimental. L'anémie a été améliorée: le taux d'Hb totale a augmenté, les ROS et les agrégats insolubles de l' $\alpha$ -globine ont diminués et la splénomégalie s'est largement améliorée. Par ailleurs, l'érythropoïèse inefficace a été limitée, les souris montraient de taux faibles d'EPO.

- **Analogue de la BMP6 [125]**

Un des challenges techniques est de générer un agoniste du facteur BMP6, sans interférer avec les autres types de BMP. En effet, la famille des BMP agit sur de nombreux phénomènes physiologiques, la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose, ou encore l'angiogenèse et les cancers. 'BMP6-like' représente donc un autre concept récent dans cette stratégie thérapeutique autour de la voie de signalisation BMP6-SMAD, qui nécessite encore de nombreuses études.

- **Autres activateurs de BMP6 identifiés [130] [131]**

Lors d'un criblage comprenant 10169 molécules, 30 ont démontrées avoir des effets agonistes de l'hepcidine, et 16 se sont montrées stables au sein des hépatocytes humaines. Des études précliniques sont envisagées sur chacune afin d'analyser leur action sur la transcription du gène codant pour la BMP6 et de déterminer leur potentiel dans le traitement de la surcharge en fer.

A partir de ce même criblage, les deux candidats analysés comme étant les plus puissants activateurs sont déjà bien connus: l'ipriflavone (un isoflavone avec des propriétés oestrogéniques) et le vorinostat (déjà utilisé pour le traitement des lymphomes cutanés). Ils pourraient donc se prêter à des études cliniques pour des patients surchargés en fer et dont la production d'hepcidine est inappropriée, comme les patients  $\beta$ -Thalassémiques.

En renforçant les voies de signalisations annexes, on diminue la puissance des effets régulateurs négatifs de l'EPO sur l'hepcidine, ce qui permet la production de cette dernière. Les agonistes indirects de l'hepcidine qui agissent sur la voie de signalisation BMP6/SMAD seraient donc capables de prévenir l'accumulation systématique du fer dans les tissus chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques.

### *I/1)3) Une potentielle cible thérapeutique: l'érythroferrone [12] [132]*

#### **I/1)3)a. Présentation de l'érythroferrone [133]**

La découverte de cette hormone peptidique en 2014 est la clé d'une meilleure compréhension du lien entre l'érythropoïèse et la régulation métabolique du fer.

En condition physiologique normale, l'expression de l'érythroferrone dans la moelle osseuse hématopoïétique est stimulée par la différenciation des érythroblastes (dans la moelle osseuse et la rate) induite par l'EPO, cette dernière étant sollicitée par un besoin accru de régénération sanguine (lors d'une importante hémorragie par exemple). D'après des analyses expérimentales, l'expression de l'érythroferrone est multipliée par dix seulement quatre heures après une injection d'EPO. Secrétée dans la circulation sanguine, l'érythroferrone est à l'origine d'une inhibition rapide de l'hepcidine, permettant la mise à disposition du fer nécessaire à la production de nouveaux globules rouges. Les récepteurs de l'érythroferrone intervenant dans la régulation de l'expression de l'hepcidine nécessitent des études supplémentaires pour être clairement identifiés. Cependant l'hypothèse avancée indique que cette régulation s'effectue par des voies de signalisation autres que BMP/SMAD, HJV.

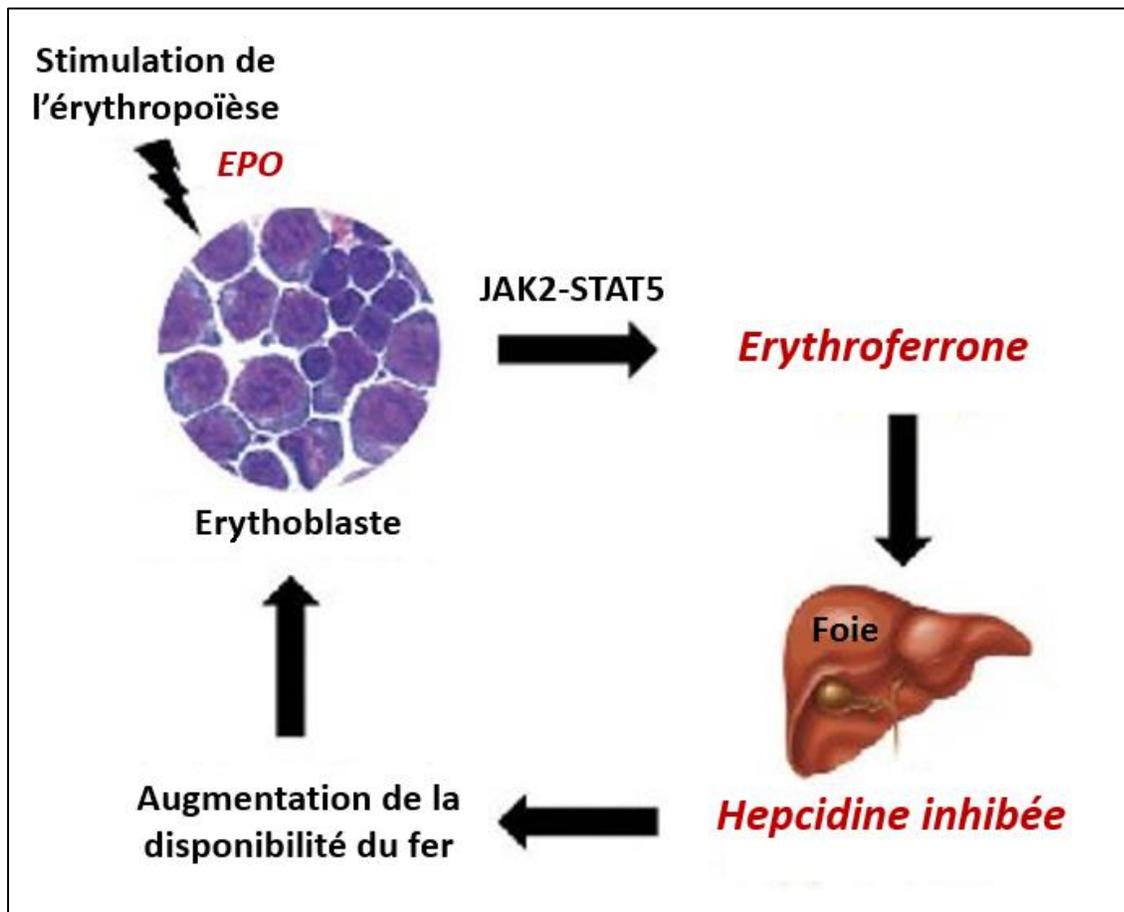


Figure 18 : Régulation indirecte du relargage du fer par l'érythroferrone [132]. Il est supposé que la voie de signalisation activée par l'EPO entre en jeu dans la stimulation de la synthèse de l'érythroferrone.

### I/1)3)b. Rôle de l'érythroferrone dans la $\beta$ -Thalassémie [134]

Des études sur des souris  $\beta$ -TI ont prouvées que l'érythroferrone a une expression fortement augmentée dans ces conditions physiopathologiques, stimulée par l'érythropoïèse inefficace. Cette hormone est responsable de la surcharge en fer secondaire à l'hyperabsorption intestinale, via l'inhibition de l'hepcidine qu'elle induit.

La régulation négative de l'expression de l'érythroferrone permettrait une absorption intestinale du fer normale, activement régulée par l'hepcidine. Cela représenterait donc un moyen de prévention primaire de la surcharge en fer dans la  $\beta$ -Thalassémie, avec un intérêt d'autant plus important dans la forme intermédiaire. Des recherches sont actuellement entreprises par un laboratoire pour développer un moyen thérapeutique ciblant précisément l'érythroferrone.

En conclusion, de nombreuses recherches sont en cours afin de mettre au point des thérapeutiques agissant comme régulateur direct ou indirect de l'hepcidine. Une instauration précoce de ces traitements dans la vie d'un patient  $\beta$ -Thalassémique, en particulier de type intermédiaire, permettrait de prévenir l'accumulation du fer dans l'organisme et des complications qui lui sont liées. D'un autre côté, il a aussi été mis en évidence qu'un excès d'hepcidine et une privation de fer sont également délétères pour les patients  $\beta$ -Thalassémiques. Avant d'effectuer les essais cliniques, il sera prudent d'évaluer la surcharge en fer de chacun afin d'adapter les doses nécessaires d'hepcidine à induire.

## 1/2) Améliorer la chélation : développer de nouvelles molécules [89] [135] [136]

Afin d'apporter une réelle amélioration par rapport aux traitements chélateurs existants, les nouveaux chélateurs se doivent de posséder une toxicité plus faible, d'améliorer les capacités excrétoires du fer et bien sûr de faciliter la compliance au traitement par une administration orale. La toxicité rénale, effet secondaire présentée par l'actuel déférasirox, est un grand axe d'amélioration de ces recherches.

La desferrithiocine est un chélateur isolé de la bactérie *Streptomyces antibioticus*. Les premiers essais avec la molécule avaient démontrés une forte capacité à extraire le fer, mais également une forte toxicité à faible dose. De nombreux analogues de synthèse ont été mis au point et testés à différentes échelles, en vue de conserver les mêmes capacités chélatrices, et de limiter la toxicité.

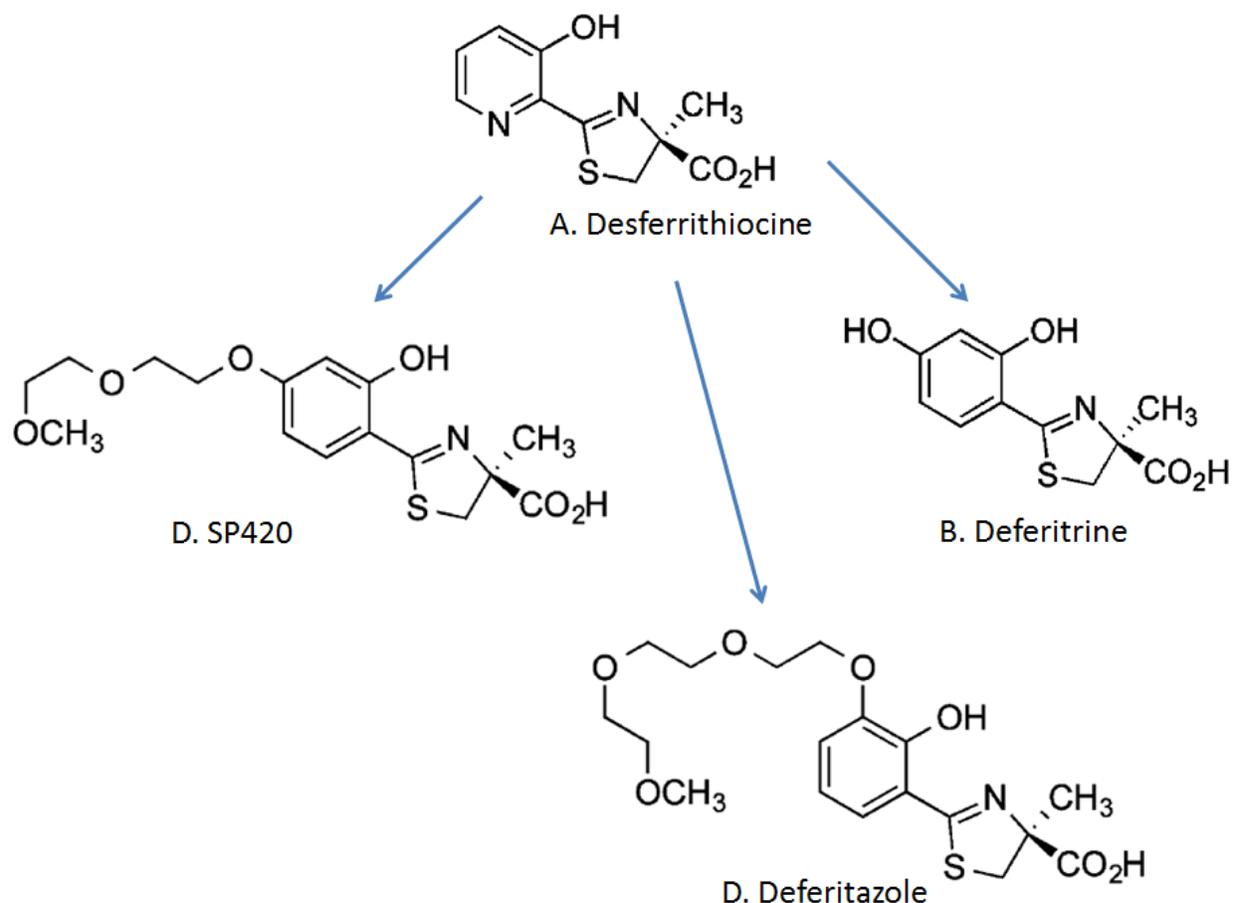


Figure 19 : La molécule de desferrithiocine et ses analogues de synthèse [135] [136]

### *1/3)1) La Deferitrine : un premier échec [135] [137]*

La deferitrine est le premier agoniste de la desferrithiocine à avoir été testé chez l'Homme. Les résultats de l'étude devaient permettre de comparer l'effet de ce nouveau chélateur sur l'équilibre martial des patients  $\beta$ -Thalassémiques transfusés et en surcharge, par rapport aux effets de la molécule de référence, la DFO.

La phase I de l'essai clinique, avec une administration orale journalière unique de 15mg/kg, avait montré des résultats très prometteurs, autant sur les plans de l'efficacité, supérieure à celle de la DFO à ce stade, que de la sécurité. Mais l'essai a été stoppé en phase I/II, lorsque la dose journalière a été doublée. Après 4 à 5 semaines de traitement à une dose de 25mg/kg/jour, certains patients présentaient des taux élevés d'azote uréique et de créatinine dans le sang, ainsi qu'une altération importante des tubules rénaux proximaux démontrant une néphrotoxicité non acceptable de la molécule. Cette toxicité rénale avait été retrouvée à moindre mesure chez les rats, mais cependant de façon beaucoup moins importante que la toxicité reportée avec la desferrithiocine.

Ce premier grand échec a occasionné de nouvelles recherches pour diminuer la toxicité des molécules issues de la desferrithiocine. Il a cependant permis de reconfirmer un paramètre pharmacologique : plus le chélateur est lipophile et plus la toxicité rénale est grande. Mais la lipophilie joue également un rôle important dans le pouvoir chélateur. Le challenge est donc de trouver une molécule avec des propriétés lipophiles permettant la réduction de la toxicité tout en maintenant un taux d'épuration du fer élevé.

### *1/3)2) Le Deferitazole (FBS0701 ou SPD602) [138]*

Actuellement en phase II de recherche clinique, aucune toxicité rénale n'a été encore détectée pour cette molécule (la toxicité rénale du déférasirox était déjà connue à ce même stade de recherche), ni de neutropénie ou de rash. Une bonne tolérance et des propriétés pharmacocinétiques favorables ont été déterminées lors de la première phase.

Les effets de différents sels de la molécule sont testés afin d'optimiser la formulation finale.

Le deferitazole mobilise le fer avec une efficacité similaire au déférasirox, molécule la plus employée actuellement. Par ailleurs, le complexe qu'il forme avec le fer est suffisamment stable pour qu'il n'y ait pas de relargage de fer dans la circulation sanguine, et le complexe est éliminé ensuite par les fèces et l'urine.

### *1/3)3) SP-420 [136] [139]*

Dernière molécule mise au point, ses études précliniques sur les animaux ont démontrées une toxicité rénale indétectable chez les rats comparée à la toxicité de la deferitrine. De plus, elle permet une forte excrétion du fer non seulement au niveau du foie mais également du cœur et du pancréas.

Comparé au déféritazole, le SP420 montre un meilleur profil de l'efficacité en fonction de la dose, et une meilleure pénétration dans les organes cibles. Une étude de phase I est en cours de recrutement : elle aura pour but d'étudier d'une part l'efficacité du produit par l'administration de dose ascendante, et d'autre part de confirmer sa sécurité chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques adultes.

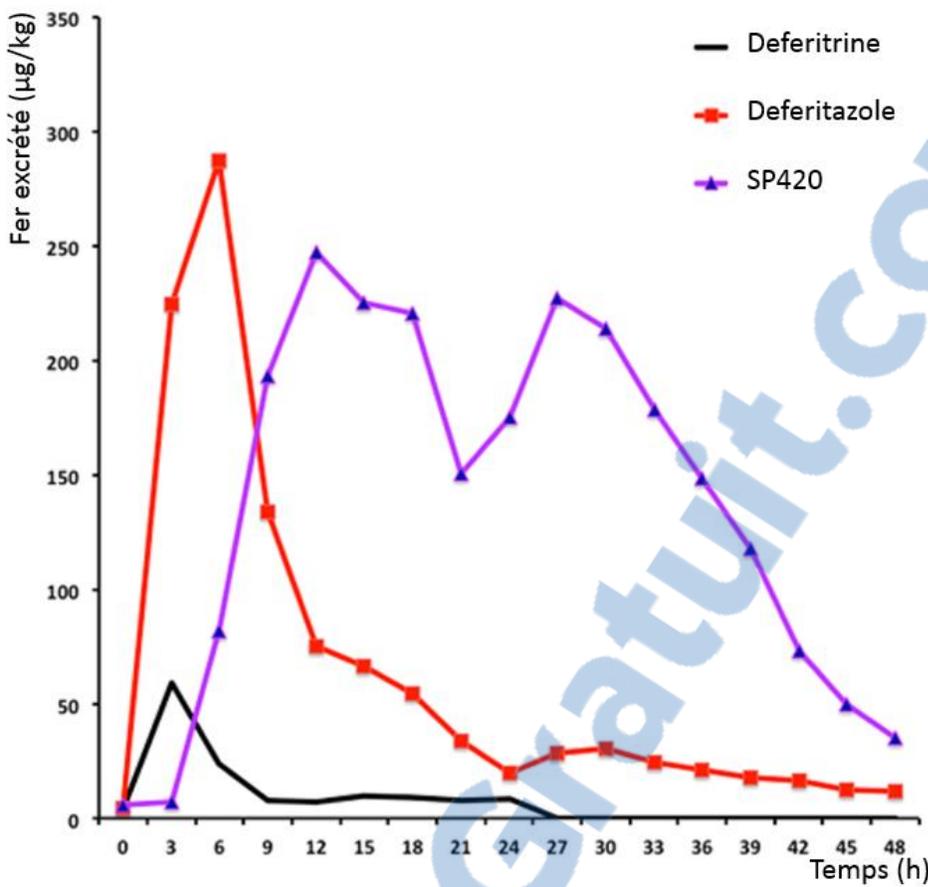


Figure 20 : Comparaison des Cinétiques d'excrétion biliaire du fer chez des rats non surchargés en fer en fonction du chélateur administré (dose du chélateur de 300µmol/kg). [136]

En conclusion, de nouvelles générations de chélateurs ont fait leurs preuves chez le modèle murin et sont en cours d'étude chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques. Une réduction des effets secondaires et des modalités d'administration facilitées par rapport à la molécule de référence de la 1<sup>ère</sup> génération (la déféroxamine) sont les axes d'amélioration primordiaux pour ces nouvelles molécules, de nombreux patients supportant difficilement les 1<sup>ères</sup> molécules.

## 1/3) Autres stratégies de régulation de la surcharge en fer [140]

### *1/3)1) L'apotransferrine [12] [141]*

Basé sur le fait que la diminution de la saturation de la transferrine peut être bénéfique pour les patients  $\beta$ -Thalassémiques, il a été montré que l'administration d'apotransferrine peut largement améliorer le phénotype de ces patients. En effet, l'administration d'apotransferrine permet de diminuer et normaliser la concentration en fer plasmatique non lié à la transferrine, augmente la durée de vie des globules rouges, et d'augmenter la concentration en hémoglobine totale tout en diminuant la réticulocytose, la synthèse d'EPO et la splénomégalie. La réduction de la précipitation des hémichromes est une hypothèse probable pour expliquer l'amélioration de ces paramètres hématologiques.

Ces résultats suggèrent donc que des apports d'apotransferrine peuvent former une thérapie bénéfique pour les patients  $\beta$ -Thalassémiques.

### *1/3)2) Les inhibiteurs de HIF2 $\alpha$ [142] [143]*

Les *Hypoxia Inducible Factors (HIF)* ou facteur induit par l'hypoxie sont des facteurs de transcription protéiques dont la synthèse est stimulée par l'EPO. HIF2 $\alpha$  provoque l'expression des gènes impliqués dans le transport du fer lié à la ferroportine, au niveau des cellules épithéliales du duodénum.

Chez les souris  $\beta$ -Thalassémiques, la suppression du gène codant pour HIF2 $\alpha$  limite le taux de fer dans les tissus et améliore l'anémie.

La mise au point d'inhibiteur d'HIF2 $\alpha$  duodéal représente une autre piste pour améliorer l'anémie et la surcharge en fer des patients  $\beta$ -Thalassémiques.

## II/Correction de l'anémie [144]

L'érythropoïèse inefficace et l'anémie secondaire entraînent de sévères comorbidités et aggravent l'état clinique du patient. Développer des traitements visant les voies de signalisation dépendantes de l'EPO peut être bénéfique pour les patients  $\beta$ -Thalassémiques, en corrigeant ainsi la cause primaire de l'anémie.

### II/1) Les inhibiteurs de Jak2 : INC424 [12]

#### *II/1)1) Jak2, son rôle dans la $\beta$ -Thalassémie*

Janus Kinase 2 (JAK 2) est une protéine de la famille des tyrosines kinases : grâce à l'ATP (*Adénosine TriPhosphate*), elle transfère un groupe phosphate au niveau du domaine de la tyrosine des molécules ciblées. JAK2 est une protéine de signalisation intracellulaire permettant au final la transcription de gènes en activant les STAT (*signal transducers and activators of transcription*) ; JAK2 répond à l'EPO en exerçant un rôle dans les processus de prolifération, différenciation et survie des précurseurs des globules rouges.

Chez les modèles murins  $\beta$ -Thalassémiques majeurs, il a été démontré qu'un taux élevé d'EPO est associé à une forte activité de phosphorylation de JAK2. Cela conduit à l'augmentation du nombre de progéniteurs érythroïdes et finalement à l'hématopoïèse extramédullaire.

#### *II/1)2) INC424 (ruxolitinib) [145] [146]*

Le ruxolitinib est un inhibiteur spécifique de la Janus Kinase de type II (il existe 4 types de Janus kinase). Il est déjà employé comme agent antinéoplasique, pris par voie orale, dans des maladies myéloprolifératives.

Les inhibiteurs de JAK 2 se sont montrés efficaces chez les souris  $\beta$ -TM, pour qui les splénomégalies ont été inversées rapidement. Après moins de deux semaines de traitements, leur rate avait retrouvé une taille normale.

Ce traitement est donc actuellement en phase II d'essai clinique chez les patients  $\beta$ -TM ayant une splénomégalie. Cet essai a pour but d'analyser les effets du ruxolitinib sur la réduction du volume de la rate, et également sur la réduction des besoins en transfusion sanguine. Contrairement aux protocoles employant le ruxolitinib en oncologie, le traitement dans la  $\beta$ -Thalassémie est de courte

durée, les administrations de ruxolitinib sont arrêtées lorsque le volume de la rate est revenu à la normale, ce qui limite les effets secondaires de cet antinéoplasique (son principal effet indésirable est la thrombopénie et l'aggravation possible de l'anémie).

En conclusion, les inhibiteurs de JAK2 tel que le ruxolitinib pourraient diminuer le taux de splénectomie chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques (autant majeures que mineures), et également limiter les besoins en transfusions sanguines, et par conséquent la surcharge en fer.

## II)2) Les pièges à ligands

### *II)2)1) GDF-11, son rôle dans la $\beta$ -Thalassémie [147]*

Le facteur de croissance GDF-11 (*Growth Differentiation Factor 11*) appartient à la sous-division des BMP, dans la grande famille des facteurs de croissance transformants (TGF- $\beta$ , pour *Transforming Growth Factor*). GDF-11 est notamment impliqué dans le développement et la régénération des cellules souches. Cette protéine est synthétisée en quantité plus importante dans le sang avant l'âge adulte.

En se fixant sur un type de récepteurs transmembranaires spécifiques, ceux de l'activine II (IIA et IIB), le GDF11 déclenche une cascade de signalisation qui *in fine* accroît la production des érythroblastes non matures et non capables de se différencier.

Une étude a démontré que l'expression du facteur de croissance GDF-11 est augmentée par les ROS qu'induisent les agrégats d' $\alpha$ -globine chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques.

L'inhibition de l'interaction entre le GDF-11 et le récepteur à l'activine II représente donc une cible thérapeutique dans la  $\beta$ -Thalassémie, celle de molécules surnommées 'pièges à ligand', permettant de réduire la surproduction d'érythroblastes immatures à l'origine de la dysérythropoïèse.

### *II)2)2) Les molécules [148] [149]*

Les pièges à ligands sont des 'protéines de fusion' : elles sont formées par la liaison entre le domaine extracellulaire du récepteur à l'activine II modifié et un fragment Fc d'un IgG1 humain\*. Cette protéine de fusion va se lier à GDF-11, au niveau du locus où le facteur de croissance devrait se fixer sur le récepteur membranaire physiologique. Ce piège à ligand empêche donc GDF-11 de se fixer sur son récepteur et de déclencher la production d'érythroblastes immatures.

Deux molécules 'pièges à GDF-11' ont été mises au point et interviennent dans la régulation des dernières étapes de la maturation et différenciation des précurseurs érythroïdes.

\*Fragment Fc d'un IgG1 : Les immunoglobulines G (IgG) sont les anticorps les plus nombreux dans le sang, ils permettent la neutralisation des antigènes (type toxines, bactéries, virus). Le fragment fc ('fragment constant') portent les fonctions effectrices de l'anticorps.

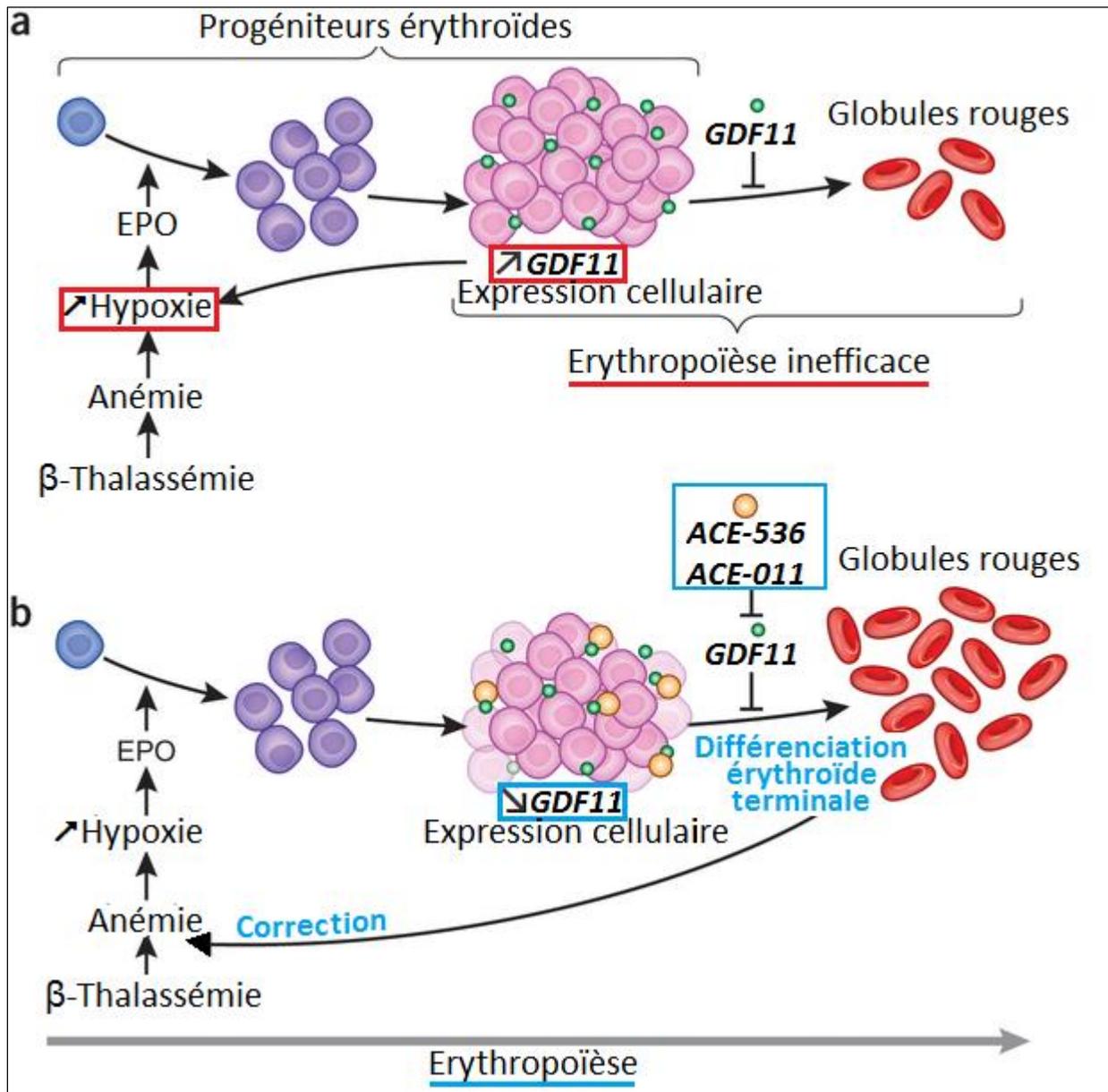


Figure 21 : L'action des pièges à GDF-11 sur la physiopathologie de la  $\beta$ -Thalassémie [150]

### **II/2)2a. Sotatercept (ACE-011) [151] [152]**

Le sotatercept est la première protéine de fusion du récepteur de l'activine de type IIA testée. Chez la souris  $\beta$ -TM, la molécule a diminué les agrégats d' $\alpha$ -globine et a corrigée l'anémie.

Suite à ces résultats positifs, ce médicament fait l'objet actuellement d'essai clinique chez des patients  $\beta$ -TM et  $\beta$ -TI, traités par injection sous cutanée 1 fois toutes les 3 semaines. Les résultats de la phase I ont montrés que le taux d'hémoglobine a été augmenté de façon dose-dépendante (à une dose de 75mg/kg, une augmentation de 2g /dL d'hémoglobine pour la moitié des patients traités a été notée, et une augmentation d'au moins 1g/dL pour l'autre moitié). La charge transfusionnelle nécessaire pour les patient  $\beta$ -TM a diminuée également de façon dose dépendante (jusqu'à une réduction des besoins de plus de 50% pour un tiers des patients traités à 0,75mg/kg, un autre tiers a montré une réduction d'entre 20 et 50% de ses besoins en CGR).

Une bonne tolérance a été montrée dans ce premier essai. Les effets indésirables ressentis ont été de type douleur osseuse, trouble du rythme cardiaque et thrombophlébite superficielle. La phase IIa en cours étudie la sécurité et la tolérance du traitement à long terme, pour des doses augmentées progressivement de 0,1mg/kg jusqu'à 1,5mg/kg.

### **II/2)2b. Luspatercept (ACE-536) [153] [154]**

Cette molécule agit spécifiquement sur les ligands du récepteur de l'activine de type IIB.

Les résultats intermédiaires ont également prouvés son efficacité via l'augmentation du taux d'hémoglobine et la baisse des besoins transfusionnels.

La molécule est actuellement en étude étendue de phase II, pour analyser la sécurité et la tolérance de la molécule à long terme, à une dose de 0,8mg/kg en sous-cutanée toutes les 3 semaines.

Tableau 3 : Résultats préliminaires des essais cliniques de Phase II dans la  $\beta$ -Thalassémie pour le Sotatercept et le Luspatercept [148] : Effet de la dose sur le taux d'hémoglobine et sur les besoins transfusionnels.

	Degré d'augmentation du taux d'Hb	Pourcentage de Patients présentant une augmentation d'Hb			
<b>Effet des protéines de fusion sur l'augmentation du taux d'hémoglobine</b>	<b>Dose de Sotatercept(mg/kg)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,75</b>
	>1,0g/dl	0%	67%	83%	100%
	>2,0g/dl	0%	0%	33%	50%
	<b>Dose de Luspatercept(mg/kg)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>
	>1,0g/dl	33%	67%	100%	67%
	>2,0g/dl	0%	0%	20%	33%

<b>Effet des protéines de fusion sur la réduction des besoins transfusionnels</b>	<b>Dose de Sotatercept(mg/kg)</b>	0,1	0,3	0,5	0,75
	Taux de réduction des besoins transfusionnels	Pourcentage de Patients présentant une réduction des besoins en CGR			
	>20%	0%	33%	50%	67%
	>50%	0%	0%	0%	33%
	<b>Dose de Luspatercept(mg/kg)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>
	Taux de réduction des besoins transfusionnels	*	*	1 patient: 78,5%	3patients: 66,7% 66,7% 69,8%

\*Aucun patient transfuso-dépendant n'a reçu cette dose de Luspatercept

En conclusion, le mécanisme de tels inhibiteurs de GDF-11 se révèle bénéfique pour les patients atteints de  $\beta$ -Thalassémie, majeure ou mineure, et pourrait révolutionner leur protocole thérapeutique. En effet, avec seulement 1 injection toutes les 3 semaines, ce traitement permettrait de réduire l'anémie, de limiter et d'espacer les actes transfusionnels, et donc de réduire les complications de la surcharge en fer.

Cependant l'utilisation de cette cible nécessite encore de nombreuses études, dues au manque de recul en cas de séquestration des ligands physiologiques aux récepteurs de l'activine II A et IIB. De nouveaux résultats sont attendus début 2016 pour le sotatercept et en 2017 pour le luspatercept. La FDA a déjà approuvé les deux molécules comme médicaments orphelins dans le traitement de la  $\beta$ -Thalassémie.

### [II/3\) HSP70 \(Heat Shock Protein70\) \[155\] \[156\]](#)

#### *II/3)1) HSP70, son rôle dans la $\beta$ -Thalassémie [157]*

HSP70 (Heat Shock Protein 70) est nommée ainsi car elle est le chaperon des protéines endommagées par les chocs thermiques, des protéines anormales, ou encore des protéines excédentaires. C'est une protéine cytoplasmique qui migre dans le noyau afin de protéger le facteur de transcription GATA-1. Ce facteur est indispensable dans le phénomène de différenciation terminale des érythroblastes.

Une étude par immunocytochimie a prouvé que les chaînes excédentaires et libres d' $\alpha$ -globine dans le cytoplasme des érythroblastes, retrouvées chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques, séquestrent la protéine HSP70. HSP70 ne peut plus migrer vers le noyau, elle ne peut donc plus y protéger le facteur de transcription GATA-1 ; ce dernier est alors dégradé et la différenciation des érythroblastes est stoppée.

### *II/3)2) HSP70, son utilisation thérapeutique*

In vitro, HSP70 a été rétablie dans le noyau des érythroblastes provenant de patients  $\beta$ -TM. Un vecteur, à base de lentivirus modifié exprimant le gène d'HSP70 (cf partie III/1)2) concernant La vectorisation), a été injecté dans le noyau des progéniteurs érythroïdes immatures  $\beta$ -TM. La différenciation terminale a alors été restaurée.

Bien qu'un modèle in vitro de cellules humaines  $\beta$ -TM ne puisse pas reconstituer tous les paramètres physiopathologiques de la  $\beta$ -Thalassémie, les résultats de l'étude ouvrent la voie d'une nouvelle possibilité thérapeutique : Diminuer l'érythroïèse inefficace et ainsi limiter les nombreuses complications de la  $\beta$ -Thalassémie en créant un médicament permettant soit de limiter l'effet de la complexation HSP70/ $\alpha$ -globine, ou d'intégrer directement HSP70 dans le noyau.

Par ailleurs, l'analyse des interactions physiques entre HSP70 et GATA-1 a permis de déterminer les domaines impliqués, offrant la possibilité de cribler les molécules qui rompraient le complexe HSP70/GATA-1.

Pour conclure, les traitements permettant l'augmentation du taux d'hémoglobine total et la diminution des besoins en transfusion de globules rouges présentent un important potentiel car les options actuellement disponibles dans l'arsenal thérapeutique de la  $\beta$ -Thalassémie sont très limitées.

Par ailleurs, le type de stratégie utilisée pour exprimer le gène d'HSP70, via un vecteur viral, est une technique dite de thérapie génique. Ce type de méthode est au cœur de nombreuses recherches cliniques actuelles, ayant pour but de modifier directement la mutation à l'origine de la  $\beta$ -Thalassémie.

## III/ Correction et prévention de l'anomalie génétique

### III/1) La thérapie génique

#### *III/1)1) Principe et challenge de la thérapie génique ex vivo [158]*

Aujourd'hui, la seule possibilité reconnue de traiter définitivement la  $\beta$ -Thalassémie est de recourir à la greffe allogénique de moelle osseuse. Mais cette approche est limitée par la disponibilité de donneur compatible pour seulement 25% des patients et le risque significatif de réaction de GVH.

La thérapie génique pourrait alors représenter une alternative pour traiter définitivement l'hémoglobinopathie en cas d'impossibilité de recourir à un donneur pour une greffe allogénique, en offrant la possibilité d'une greffe autologue : les propres cellules souches hématopoïétiques du patient sont génétiquement modifiées avant de lui être réinjectées.

Ainsi, l'addition du gène  $\beta$ -Globine par un vecteur et son intégration chromosomique dans les cellules souches hématopoïétiques du patient est une approche de choix, grâce à des éléments de régulation génétiques appropriés contenus dans le vecteur.

Des conditions fondamentales doivent être respectées dans la mise en œuvre du transfert de gène de  $\beta$ -Globine afin d'en assurer la sécurité et l'efficacité. Ainsi, le vecteur doit:

- Permettre une transduction stable,
- Pouvoir intégrer le gène de grande taille qu'est celui de la  $\beta$ -Globine,
- Etre intégré dans les cellules souches hématopoïétiques et exprimé de manière forte et spécifique dans les globules rouges,
- Avoir une expression contrôlée du transgène,
- Démontrer une toxicité absente ou très faible,
- Corriger le phénotype.

Les virus ont la capacité d'intégrer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines, ils représentent donc de potentiels vecteurs\* pour ce type de thérapie. Le principe général est d'ôter au virus les séquences génétiques responsables de son caractère pathologique, le rendant inoffensif, et de lui supprimer la capacité de se reproduire. Enfin, Le gène à visée thérapeutique vient remplacer ces séquences.

*\*Vecteur: Support qui apporte le gène sain dans les cellules ciblée et qui va permettre de le fixer sur l'ADN.*

### **III/1)2) Vectorisation [159] [160]**

#### **III/1)2)a. Choix du Lentivirus [161]**

Appartenant à la famille des rétrovirus, le lentivirus possède un génome à ARN simple brin, en deux copies dans les particules virales. Lorsque le virus infecte une cellule cible, l'ARN est convertit en ADN double brin grâce à une enzyme virale, une reverse-transcriptase. Cet ADN double brin s'intègre ensuite dans le génome de la cellule cible infectée. Cet ADN rétroviral est ensuite maintenu de façon stable et est transmis aux cellules filles lors des divisions cellulaires, le taux d'expression ne diminue pas avec le nombre de divisions. Les gènes apportés par le virus sont exprimés après leur transcription dans le noyau de la cellule hôte.

Le lentivirus est le seul rétrovirus qui infeste les cellules en cours de division mais également les cellules quiescentes (non en division cellulaire). Par ailleurs, il provoque une réponse immunitaire limitée et permet la survie des cellules infectées. Le VIH, qui appartient à ce genre de virus, permet d'intégrer de grands fragments d'ADN, faisant de lui un bon candidat pour vectoriser le gène de la  $\beta$ -Globine.

En revanche, la production de rétrovirus à hauts titres infectieux est difficile. Le titre infectieux témoigne de l'efficacité thérapeutique du virus obtenu ; il reflète le nombre de virus ayant inséré leur matériel génétique dans celui des cellules cibles par rapport au nombre total de virus mis au contact de ces cellules.

#### **III/1)2)b. Du virus au vecteur**

Le virus employé doit être déficient : au moins un de ses gènes indispensables à sa réplication est délété, rendant le virus incapable de se répliquer dans l'hôte. Le virus obtenu est qualifié de 'non-répliquatif'.

Une lignée cellulaire 'packaging cell line' est produite afin qu'elle exprime ces gènes de réplication délétés, permettant la production des vecteurs viraux.

Certaines séquences sont essentielles à la composition du vecteur :

- Séquence  $\Psi$  : Provoque l'encapsidation du vecteur recombinant.
- Séquence poly A : Permet de stabiliser les ARNm.

-Séquences promotrices : Promoteur adapté en amont du Transgène.

### III/1)2)c. Structure du vecteur du gène $\beta$ -Globine : LentiGlobin™ [162] [163]

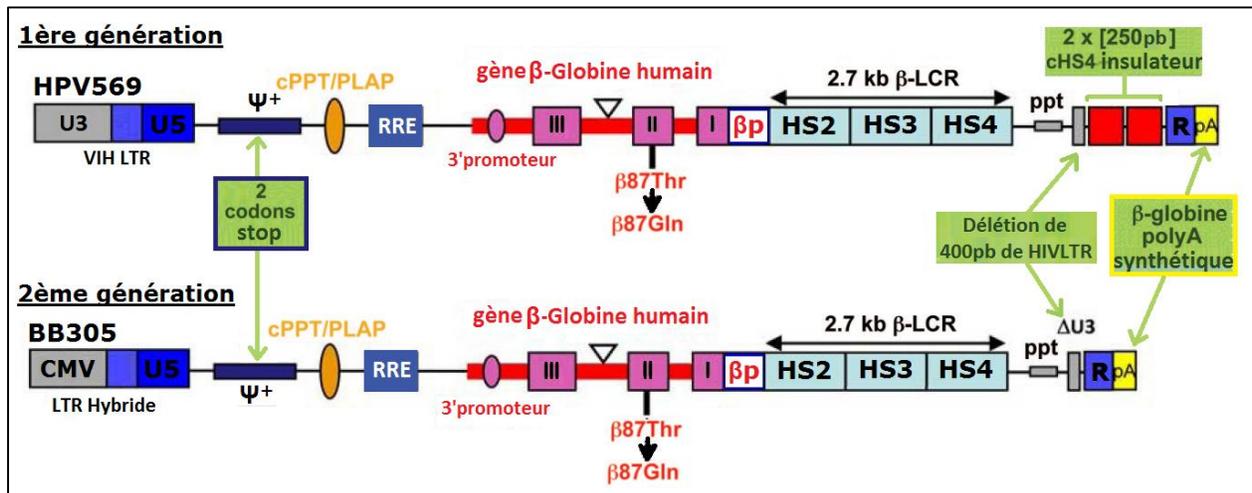


Figure 22 : Organisation des deux générations du gène du vecteur LentiGlobin™ [162] [163]

-LTR (Long terminal repeat) : Caractéristiques aux extrémités des rétrovirus, cette séquence nucléotidique participe à 'intégration des éléments viraux dans le matériel génétique de l'hôte.

-U3 : Cette séquence contient des promoteurs et amplificateurs

-cPPT/PLAP : Voie polypurine centrale

-RRE : Rev-responsive element : Elément de la réplication virale

-HS2,3,4 : Site Hypersensible à l'ADNase

- $\beta$ p : Promoteur  $\beta$ -Globine

-ppt : Voie polypurine terminale : Site initiant la synthèse du brin positif d'ADN.

-R : 'repeat' : Courte séquence répétée

Le vecteur est auto-inactivant (SIN, Self Inactivating) : il ne contient que des séquences non-virales avec des promoteurs et amplificateurs physiologiques.

Le gène  $\beta$ -Globine inséré est muté au niveau du codon 87. Cette mutation permet de le détecter lors des contrôles et de le différencier des gènes  $\beta$ -Globine persistant des transfusions qui ont précédées la greffe. Ce gène muté, nommé  $\beta^{A6t87Q}$ , peut ainsi être dosé facilement par HPLC. Cette mutation lui confère également des propriétés anti-falciformes.

Certaines modifications du gène sont effectuées afin d'assurer la sécurité du vecteur viral; empêcher sa réplication, enlever ses propriétés pathogènes et limiter le risque génotoxique dû à des potentielles mutations d'insertion ou par l'activation de transcription d'oncogènes adjacents :

- L'inclusion des deux codons 'STOP' au niveau de la séquence d'encapsidation  $\Psi^+$ ,
- La délétion de 400 paires de bases (pb) dans l'unité U3, dans la partie droite de la séquence VIH LTR, supprime les éléments virulents du virus,
- L'ajout de la séquence Poly A de  $\beta$ -Globine de lapin.

- **Spécificités de la 1ère génération: Transgène HPV569 [164]**

Deux séquences de 250 paires de bases cHS4 ont été insérées, issues de gènes de poulet et correspondantes aux insulateurs chromatinien: ces séquences favorisent l'expression du gène et apportent une protection partielle contre l'activation d'oncogènes et des propriétés supplémentaires pour sécuriser sa configuration SIN.

Mais après les résultats du premier essai clinique (cf partie III/1)4) sur les essais cliniques), il a été montré que la protection apportée par ces séquences est variable. De plus, leur insertion en 3' réduit le titre en charge virale en engendrant des transcriptions inverses erronées et/ou des intégrations de séquence virale incomplète. Il en a donc été déduit que la suppression de ces deux séquences du vecteur permettrait des meilleures capacités de transduction avec un degré équivalent de sécurité.

- **Spécificités de la 2<sup>ème</sup> génération: Transgène BB305 [163]**

Le LentiGlobin™ HPV569 utilisé dans les études cliniques pour les patients  $\beta$ -Thalassémiques montre de faibles titres et une efficacité de transduction discutable. Ce LentiGlobin™ HPV569 a donc été modifié afin d'augmenter le titre sans en compromettre la sécurité. La région U3 du VIH a été remplacée par le promoteur constitutif des CMV (*Cytomégalovirus*), pour augmenter l'expression du gène. Ce changement permet également de réduire le nombre de plasmides (4 au lieu de 5 pour la génération précédente de vecteur) nécessaire à la production du lentivirus recombiné, et permet aussi d'augmenter le rendement du vecteur.

Les deux séquences de 250 paires de bases cHS4 ont été supprimées. De tous ces changements résulte le vecteur LentiGlobin™BB305.

Les données issues des études in vitro et in vivo précliniques montrent que cette seconde génération a bien une efficacité supérieure à la première génération, avec une sécurité équivalente. (cf partie III/1)4) sur les essais cliniques).

#### **III/1)2)d. Mode de Production du vecteur final [146] [165] [166] [167]**

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires, bicaténaires, cytoplasmiques, et de petite taille. Ils se répliquent de façon autonome et sont non-indispensables au fonctionnement normal de la cellule hôte. Les plasmides sont d'origine bactérienne et se transmettent d'une bactérie à une autre. Pour la synthèse du vecteur lentiviral recombinant, cinq plasmides sont produits séparément :

- **LentiGlobin BB305™/ LentiGlobin HPV569™**: Le vecteur portant le gène thérapeutique,
- **HPV275** : Contenant des séquences encodant les enzymes et protéines structurales du VIH (séquence GAG-POL), nécessaires à l'export du génome viral vers le noyau,
- **ΨN15** : Apportant le matériel génétique pour l'enveloppe du rétrovirus (La protéine G du *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV-G) permet au lentivirus d'entrer dans la cellule cible),
- **p633** : Les séquences de la Reverse Transcriptase (Enzyme permettant la transcription de l'ARN en ADN),
- **HPV601** : Les séquences du gène TAT. (plasmide non nécessaire pour LentiGlobin BB305™).

Le vecteur final est produit par co-transfection de ces 5 plasmides dans une cellule de rein embryonnaire humain en culture (HEK293T pour *Human Embryonic Kidney*, cellules facilement cultivées et adaptées pour la transfection, elles sont couramment utilisées en biotechnologie).

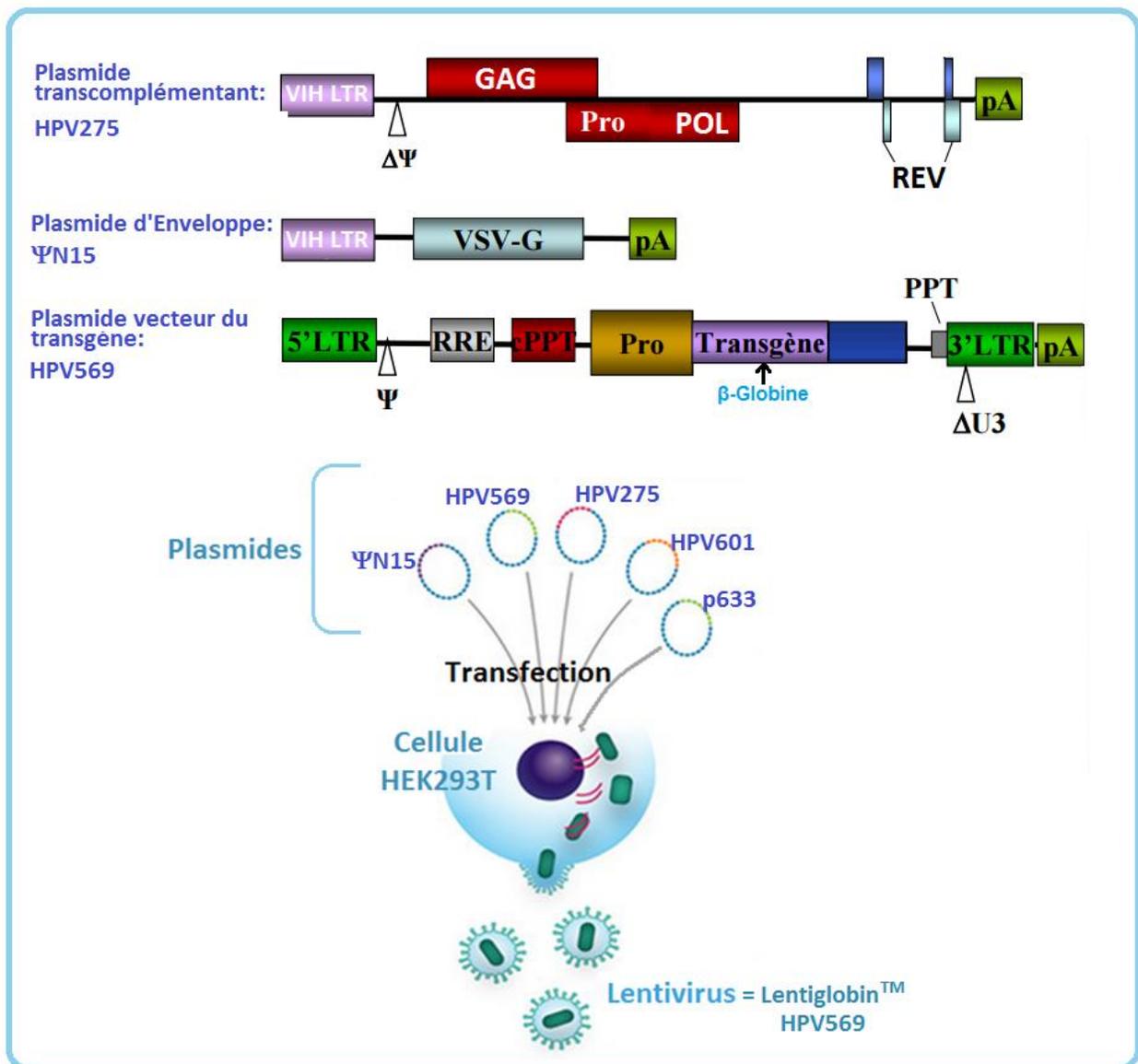
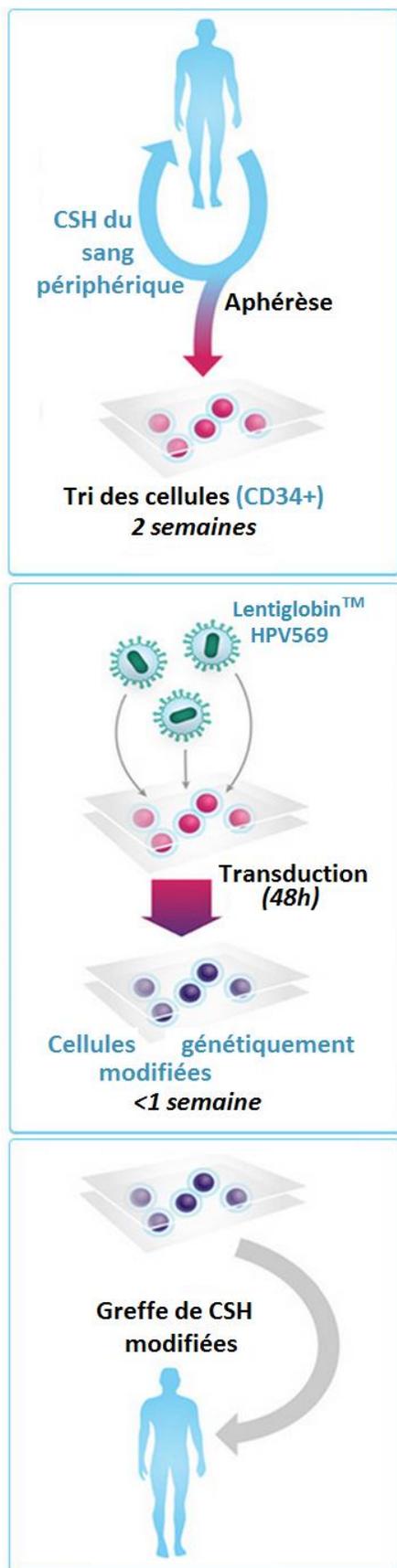


Figure 23 : Configuration schématique des 3 principaux plasmides et principe de la production du lentivirus LentiGlobin™ HPV569 par transfection de ces plasmides [168] [169]

La transfection (action qui consiste à introduire de l'ADN dans une cellule eucaryote) est facilitée par l'ajout de phosphate de calcium dans le milieu de culture. Cela favorise l'endocytose de l'ADN dans la cellule cible : l'ADN plasmidique co-précipite avec les cristaux tricalciques, augmentant ainsi sa surface de contact avec les cellules cibles et protégeant l'ADN face aux nucléases.

Après 7 jours de culture, le matériel génétique lentiviral obtenu est purifié par chromatographie échangeuse d'ions, ultrafiltré et quantifié. Il est cryoconservé jusqu'à son utilisation.

Afin de libérer pharmaceutiquement les lots de vecteurs produits pour qu'ils soient utilisés, de nombreux tests sont effectués : les cellules obtenues doivent être conformes aux spécifications préétablies. Ces tests vérifient la sécurité du produit (la stérilité, l'absence d'endotoxine, l'absence d'autres formes de lentivirus ou de mycoplasme, l'incapacité de réplication du vecteur), sa pureté (l'absence de résidu des cellules HEK293T ou de plasmides), son apparence et le pH.



### III/1)3) Etapes cliniques de la thérapie génique

#### III/1)3)a. Le prélèvement des cellules souches du patient

Après une période d'hypertransfusion, les cellules souches du sang périphérique du patient sont récoltées. Parmi elles, les cellules portant l'antigène CD34<sup>+</sup> sont détectées et sélectionnées. Une partie de ces CD34<sup>+</sup> est cryoconservée pour constituer un stock de sécurité.

*\*CD34<sup>+</sup> : 0.5% des cellules sanguines portent cet antigène, ce sont les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs hématopoïétiques.*

#### III/1)3)b. La transduction des CD34+

Les cellules sélectionnées du patient sont préstimulées pendant 24h à 48h dans un milieu de culture contenant des cytokines (SCF, IL-3, Flt-3L et TPO) et du sulfate de protamine.

Le vecteur est ajouté dans le milieu de culture : Le gène β-Globine contenu dans le vecteur est intégré au génome des cellules souches hématopoïétiques du patient.

Les cellules modifiées obtenues sont comptées, lavées et cryopréservées.

Les tests de contrôle précités sont réeffectués sur les cellules obtenues, les cellules ne sont transférées au patient seulement lorsque tous les résultats sont obtenus et conformes.

#### III/1)3)c. Le conditionnement du patient

Le patient reçoit un traitement de busulfan pendant 4 jours avant la greffe afin de provoquer une myélosuppression totale. Le patient est isolé en chambre stérile si son taux de neutrophiles est inférieur à 500/μL.

#### III/1)3)d. La greffe

Les CD34<sup>+</sup> transduites du patient lui sont retransfusées par un cathéter central, durant 20minutes, pendant que les signes vitaux du patient sont monitorés.

Figure 24 : Protocole clinique de thérapie génique [169]

### **III/1)3)e. Suivi spécifique des patients [162]**

Après la perfusion de ses cellules souches modifiées, lorsque le patient s'est stabilisé et que la greffe a pris, le patient sort de l'hôpital et est ensuite suivi tous les mois pendant 6 mois, puis tous les 3 mois pendant 3 ans, et enfin une fois par an. L'évaluation de suivi inclus des tests de routines hématologiques et biochimiques, mais également des tests plus spécifiques concernant la greffe :

- La détermination du nombre de copie du vecteur (VCN) dans les cellules du sang périphérique est effectuée par PCR.
- La détermination de la proportion de progéniteurs hématopoïétiques transduits. (sur 14 jours)
- Le dosage LTC-IC (Long-Term Culture Initiating Cell), mesure la capacité de la moelle osseuse à produire des progéniteurs myéloïdes après 5 semaines de culture.
- La production des chaînes de globines est étudiée, les chaînes sont séparées par HPLC en phase inverse.
- Un caryotype de la moelle osseuse est effectué et la technique de puce à ADN est appliquée.
- Les sites d'intégration du transgène au niveau du génome sont répertoriés.

### **III/1)4) Les essais cliniques [170]**

#### **III/1)4)a. Essai du LentiGlobin™ HPV569 [171]**

Des résultats précliniques satisfaisants sur des modèles  $\beta$ -Thalassémiques murins ont validés la correction génique et le devenir à long terme de l'expression du transgène vectorisé par le LentiGlobin™ HPV569.

L'efficacité et la sécurité du vecteur ont été testées sur 3 patients au cours du premier essai clinique de thérapie génique concernant la  $\beta$ -Thalassémie. Cet essai mené en France a été approuvé par l'AFSSAPS (ex ANSM) en 2005. (cf. Critères d'inclusion en Annexes 5).

#### **Patient X [172]**

Ce patient, âgé de 18 ans lors de la greffe en 2007 subissait des transfusions sanguines mensuellement depuis l'âge de 3 ans, avec un taux d'hémoglobine moyen à 6.7g/dL, et des chutes jusqu'à 4g/dL. Il a été splénectomisé à l'âge de 6 ans, et à ses 8 ans le traitement chélateur par déféroxamine a été instauré, à raison de 5 perfusions nocturnes par semaine. Le traitement par hydroxyurée n'agissait pas sur lui et il n'avait pas de donneur de moelle osseuse HLA compatible dans sa fratrie.

Après la greffe, la reconstitution hématopoïétique a été totale et sans effet indésirable, la neutropénie s'est achevée en 26 jours, et en 41 jours pour la thrombocytopénie.

1an après la greffe, le patient est devenu transfuso-indépendant, son taux d'hémoglobine étant stabilisé à 9g/dL, le taux d'érythroblastes circulant a été divisé par 3, et la survie moyenne des globules rouges a augmenté. Le TCMH montre un taux à 28.4pg.

Le patient ne supportant pas les chélateurs, des phlébotomies prélevant 200ml de sang ont pu être initiées afin d'accélérer l'excrétion du fer et diminuer rapidement la surcharge du patient due aux nombreuses années de transfusion. Le taux de ferritine a alors été divisé par deux.

72mois après la greffe, il demeurait transfuso-indépendant.

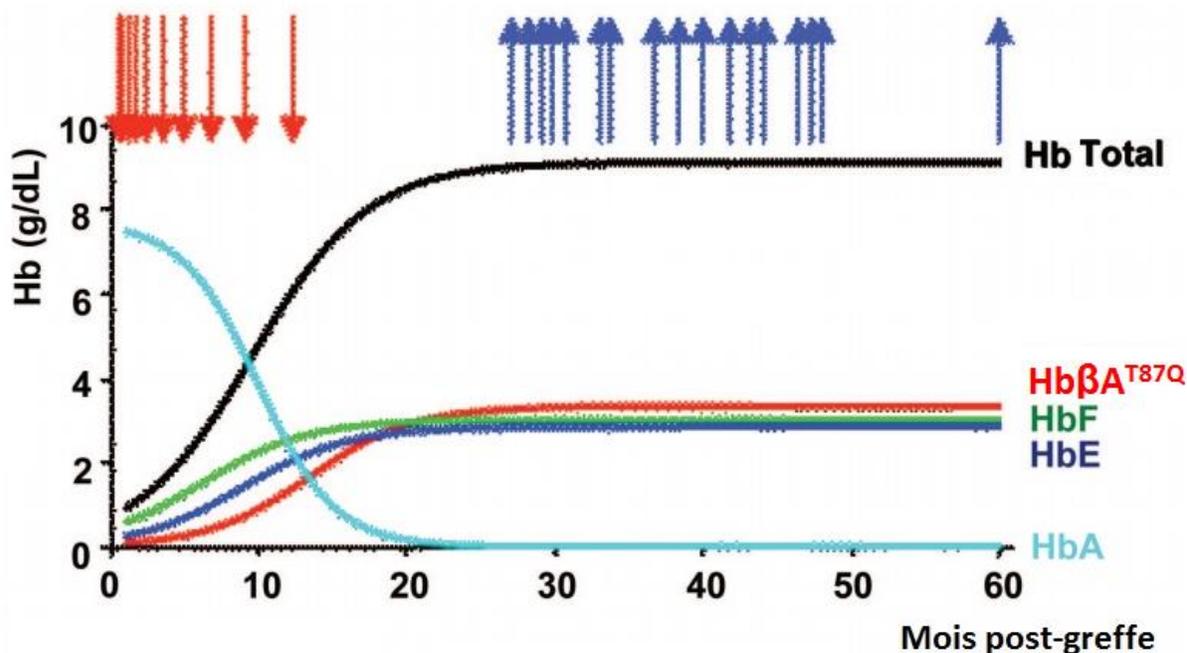


Figure 25 : Concentration de l'hémoglobine dans le sang du patient X (les flèches rouges représentent les transfusions et les bleues les phlébotomies). [159] (en Bleu ciel, l'HbA apportée par les transfusions). Seulement un tiers de l'hémoglobine total est issu du gène vectorisé.

#### Patient Y [170]

Un second patient a été greffé en 2011 suite aux résultats encourageants obtenus chez le Patient X. La greffe de ce patient a réussie, mais il est toujours transfuso-dépendant, ses tests montrent un faible taux de VCN, et seulement 5% de l'hémoglobine totale provient de l'Hb $\beta$ A<sup>T87Q</sup> vectorisée.

#### Patient Z [172]

Ce patient a été le premier à recevoir la greffe de LentiGlobin<sup>TM</sup> en 2007. Après la greffe, le patient a subi une longue phase d'aplasie, de pancytopénie durant 5 semaines. La réinjection de ses cellules souches se montrant inefficace, le patient a reçu les CD34+ conservés du stock de secours. L'état clinique du patient est revenu à son stade pré-greffe, toujours dépendant aux transfusions, avec un taux résiduel extrêmement faible de copies du vecteur.

Cet échec a été expliqué a posteriori par la détection d'un problème de manipulation pendant la transduction *in vitro* du vecteur injecté au Patient Z.

- **Le risque de mutagenèse des lentivirus [172] [173]**

L'activation de proto-oncogènes due à une intégration chromosomique vectorisée par un  $\gamma$ -retrovirus a été impliquée dans des syndromes myélodysplasiques et lymphoprolifératifs, observés chez un patient participant à un essai de thérapie génique pour une pathologie de déficience immunitaire. Ce risque de mutagenèse et d'activation d'oncogènes est le principal risque de la thérapie génique.

Il a été démontré que l'activation d'oncogènes est le plus souvent causée par les promoteurs viraux contenus dans les vecteurs. Ce risque de mutation insertionnelle est plus faible pour les lentivirus que pour les  $\gamma$ -retrovirus car contrairement à ces derniers, les lentivirus n'ont pas de préférence de site d'insertion près des promoteurs oncogènes. Cependant, les lentivirus, comme le LentiGlobin<sup>TM</sup>, ont tendance à s'insérer dans les gènes au niveau des introns, et peut entraîner des épissages erronés ou encore une transcription terminée prématurément.

L'analyse génomique des sites d'intégrations du LentiGlobin<sup>TM</sup> chez le Patient X de cette étude a démontrée environ 300 sites d'insertion différents, dont 24 dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes.

Un site d'insertion relativement dominant a été détecté au niveau du 3<sup>ème</sup> intron du gène HMGA2 (High Mobility AT-Hook 2), gène spécifique aux granulocytes et aux érythroblastes. Par ailleurs, une délétion concomitante d'une copie de l'insulateur CHS4 a été détectée pour les clones\* issus de cette insertion.

Ce clone cellulaire a été détecté chez le patient X à 4mois post-greffe, le taux s’est stabilisé à 5mois post-greffe représentant environ 6.8% des cellules circulantes nucléées (un pic a été observé à 4ans post-greffe à 22%). Il n’est cependant pas détectable chez les neutrophiles.

Sachant que des évènements mutationnels sur HMGA2 ont déjà été détectés dans certaines néoplasies, et que le gène est lié à la prolifération de métastases, un suivi particulier de ce clone est effectué.

*\*Clone cellulaire : Ensemble de cellules qui sont identiques car issues d'une même cellule d'origine.*

- **Conclusion de l’essai du vecteur LentiGlobin™ HPV569 [163] [174]**

Tableau 4 : Résultats de l’essai clinique (LentiGlobin™ HPV569) [174]

		Patient X	Patient Y
Vecteur injecté	VCN dans les cellules injectées	0.6	0.3
	Quantité de Cellules CD34+ injectées	4.9 × 10 <sup>6</sup> CD34 <sup>+</sup> /kg	4.3 × 10 <sup>6</sup> CD34 <sup>+</sup> /kg
Prise de la greffe (production de neutrophile)		Greffe+29jours	Greffe+20jours
Résultat du dernier suivi	Production de HbβA <sup>T87Q</sup>	2.7g/dl (à greffe +5ans)	0.4g/dl (à greffe +2ans)
	Transfuso-indépendance	Oui (à greffe +12mois)	Non (Fréquence des transfusions diminuée)

Aucun effet indésirable clinique n’a été présenté par les patients.

Les résultats mitigés de ce premier essai ont donc amené à repenser le vecteur en créant la seconde génération du LentiGlobin™, et nécessitent d’apporter les preuves ex-vivo et des résultats précliniques pointus afin de lancer le nouveau vecteur en essai chez les patients.

### III/(1)4)b. Essai du LentiGlobin™ BB305

- **Résultats précliniques [163]**

#### Efficacité

Le titre en charge virale du LentiGlobin™BB305 obtenu est 3 à 4 fois supérieur au titre de la génération précédente (avec des différences de concentrations similaires avant-après la purification du vecteur).

La concentration en p24 est plus élevée pour le LentiGlobin™BB305, ce qui prouve la présence de plus de matériel physique. (La protéine p24 est un composant de l'enveloppe du VIH, la capside).

L'efficacité de la transduction du vecteur a été étudiée sur des CSH humaines CD34+, en les soumettant à différentes MOI (*Multiplicity Of Infection* : multiplicité d'infection cellulaire, cette notion correspond au titre infectieux divisé par le nombre de cellules présentes). Le nombre de VCN dans les CSH après 7 jours de culture est 2 à 3 fois plus élevé pour la 2<sup>nd</sup>e génération par rapport à la 1<sup>ère</sup> génération, à multiplicité d'infection égale. En conséquence, la chaîne  $\beta$ -GlobineA<sup>T87Q</sup> est produite en quantité supérieure pour la 2<sup>nd</sup>e génération.

La transduction des CD34<sup>+</sup> et le degré d'intégration du vecteur sont donc plus élevés pour le LentiGlobin™ BB305 que pour le LentiGlobin™ HPV569.

L'étude chez les souris  $\beta$ -Thalassémiques Majeures a observé la correction de l'anémie chez toutes les souris greffées, 3 mois après la greffe. L'amélioration des phénotypes est similaire pour les deux vecteurs.

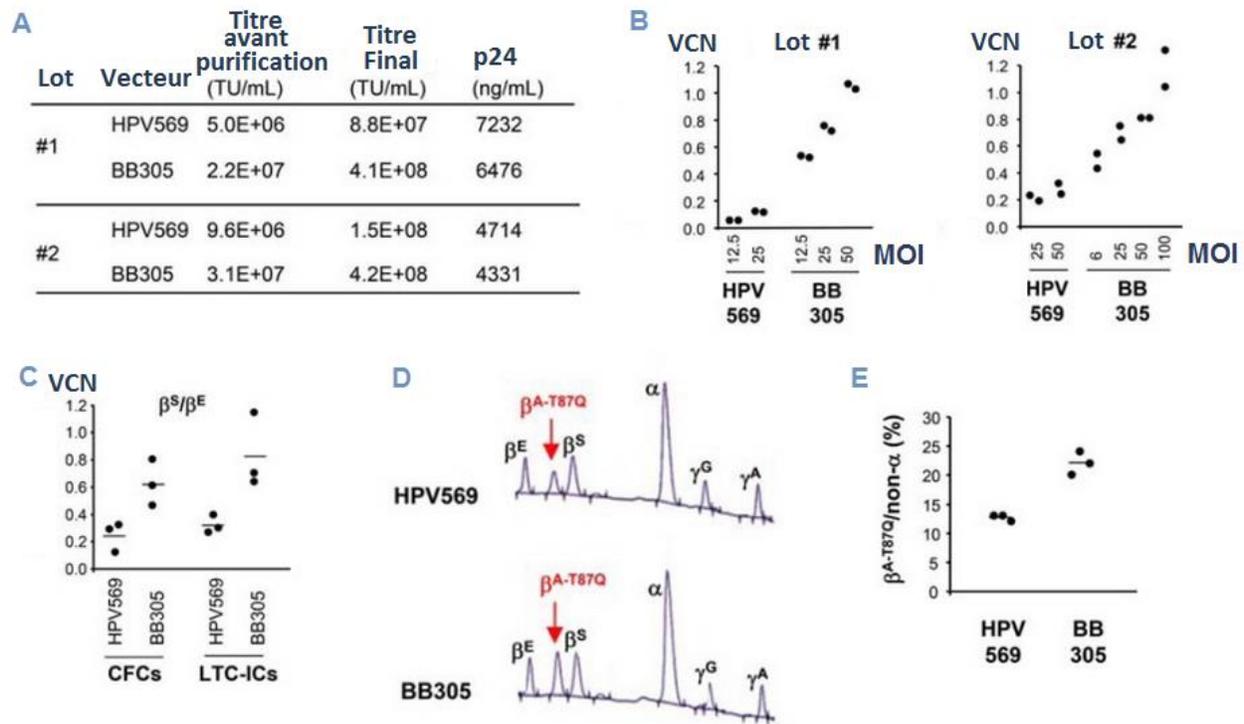


Figure 26 : Comparaison de l'efficacité des deux vecteurs BB305 et HPV569 in vitro [163]

-A: Titre fonctionnel (TU : Transducing units) et titre physique (p24) des vecteurs dans les cellules HEK293T avant et après purification.

-B: VCN = Nombre de vecteur moyen par cellule  $CD34^+$  transduite, en fonction de la multiplicité d'infection.

-C: VCN = Nombre de vecteur moyen par cellule  $CD34^+$  transduite, détecté dans les Cellules formant des Colonies (CFCs, culture à court terme) et après LTC-ICs (culture à long terme).

-D: Profile HPLC des chaînes de globine des cellules formant des colonies.

-E: Quantité de  $\beta$ -Globine modifiée par rapport à la quantité totale de globine non  $\alpha$ .

## Sécurité

Deux essais de génotoxicité insertionnelle ont été menés afin d'étudier le potentiel génotoxique du vecteur, comparé à un  $\gamma$ -rétrovirus contrôle. Il a été montré que les 2 vecteurs LentiGlobin™ BB305 et LentiGlobin™ HPV569 sont significativement moins génotoxiques que le rétrovirus contrôle.

Aucune cytotoxicité significative n'est associée à un haut titre viral transduit pour les 2 vecteurs.

L'étude des souris  $\beta$ -Thalassémiques majeures nécropsiées a montré une absence de splénomégalie, corrélée avec la diminution de l'hématopoïèse inefficace. Cette étude des organes et tissus n'a détectée aucune anomalie post-greffe.

Les sites d'insertions du vecteur ont été analysés, aucun clone spécifique n'a été détecté in-vivo. Il n'y a pas d'augmentation significative de site d'insertion près d'oncogènes après la greffe.

#### Conclusion de l'étude préclinique

Les changements apportés aux 1<sup>er</sup> vecteurs afin de créer la seconde génération ont permis d'améliorer l'efficacité de transduction et d'en faciliter la production. Les études ont montré que cette amélioration d'efficacité n'engendrait pas un risque accru d'oncogenèse due à une insertion localisée du vecteur.

- **Etude clinique [175] [176]**

La phase I/II de l'étude est en cours afin d'analyser la faisabilité, la sécurité et l'efficacité du LentiGlobin™ BB305 dans le traitement de patients  $\beta$ -Thalassémiques majeurs. Cette étude a été conçue pour tester ce vecteur sur 15 patients, en suivant pendant deux ans après la transplantation son efficacité et les potentiels effets indésirables. L'étude concerne des patients âgés de 18 à 35ans, transfuso-dépendants. (Deux études similaires sont menées simultanément, une aux Etats-Unis, une en France).

#### Historique de l'étude

-Décembre 2013 : 1<sup>er</sup> patient français à bénéficier d'une greffe autologue avec le LentiGlobin™BB305.

-Mars 2014 : 1<sup>er</sup> patient américain inclus dans l'essai.

-Mai 2015 : Discussion avec les affaires réglementaires de la FDA et de l'EMA pour faire entrer le LentiGlobin™BB305 dans les programmes respectifs d'accélération des démarches d'obtention d'AMM. Les études sur les populations pédiatriques et adolescentes sont en cours d'approbation par les Autorités de Santé. Pour les Américains, l'étude sur la population pédiatrique ne pourra débuter que dans 1 ou 2ans, nécessitant un recul plus important sur l'effet du vecteur.

Résultats de l'étude clinique [177] [178] [179]

Tableau 5 : Bilan des essais menés sur 7 patients  $\beta$ -Thalassémiques majeures avec le LentiGlobin™ BB305

Vecteur	LentiGlobin™ HPV569		LentiGlobin™ BB305						
	X	Y	1102	1104	1106	1107	1108	1201	1202
Age/Sexe/ Origine	18/M France	22/F France	18/F USA	21/F Thaï- lande	20/F Pakistan	26/F Austra- lie	18/F/ USA	18/F Syrie	16/M France
VCN dans les CD34+ transduits	0.6	0.3	1.1	0.7	1.5	1	0.9	1.5	2.1
Quantité de CD34+ greffés (x106/kg)	4.9	4.3	6.5	5.4	13.5	15	7.9	8.9	13.6
Besoin en Transfusion avant greffe (ml/kg/an)	X	X	137	153	197	223	144	139	188
Production des neutrophiles (prise de la greffe)	J+29	J+20	J+17	J+18	J+29	J+14	NA	J+13	J+15
HbA <sup>T87Q</sup> /Hb totale (%)	30	5	44.2	2.8	70.8	3.5	-	70 <sup>1</sup> 69.5 <sup>2</sup>	71.6 <sup>1</sup> 75.8 <sup>2</sup>
HbA <sup>T87Q</sup> /Hb totale (g/dL)			3,8/8,6	0,27/9,8	6,8/9,6	0,34/9,6	-	7,7/11,0 <sup>1</sup> 7,3/10,5 <sup>2</sup>	9,6/13,4 <sup>1</sup> 9,7/12,8 <sup>2</sup>
Transfusion indépendance	Oui J+1an	Non	Oui	Oui	-	-	-	Oui j+10j	Oui j+12j
Effet secondaire	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Délai Greffe-dernier résultat (en mois)	60	25	6	3	<3	1	<1	12s 15	9 15 <sup>2</sup>

*NB : Les résultats indisponibles, dû à une greffe trop récente, sont notifiés par '-'. Le suivi des patients surveille les paramètres suivants : les effets cliniques indésirables, la prise de la greffe, l'expression du transgène, les besoins en transfusions, les sites d'intégrations et la compétence du virus à se répliquer.*

### Efficacité

Les résultats cliniques semblent appuyer les résultats précliniques quant à l'efficacité supérieure du LentiGlobin™ BB305 par rapport à la première génération de vecteur, prouvé par le taux de HbA<sup>T87Q</sup> produit plus élevé.

### Sécurité

Au 14 juin 2015, le traitement se montrait bien toléré pour tous les patients, sans effet secondaire direct observé. Tous les effets secondaires observés ont été dus au conditionnement pré-greffe. Les sites d'insertion du vecteur ont été étudiés, aucun clone n'est prédominant.

- **Conclusion sur les LentiGlobin™ [178]**

Pour les deux générations de LentiGlobin™, avec un recul de 6ans pour la première et de 18mois pour la seconde, des patients n'ont plus besoin d'avoir recours aux transfusions sanguines et aucun effet indésirable majeur n'a été observé. Les améliorations apportées à la seconde génération obtiennent des résultats prometteurs pour les patients atteints de β-Thalassémie.

### III/1)4)c. Autres essais cliniques indépendants

- **Lentivirus TNS9.3.55 [180] [181] [170] [182]**

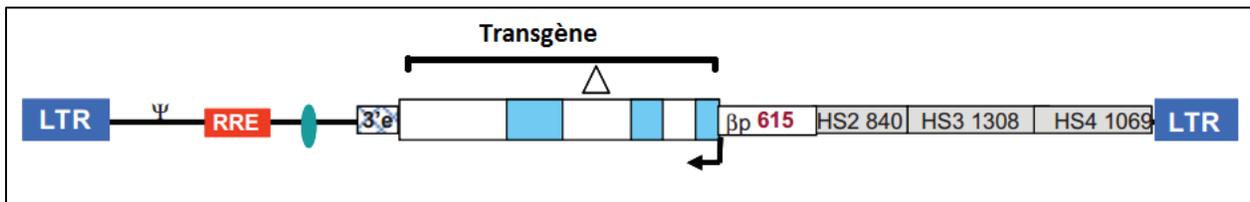


Figure 27 : Organisation du vecteur lentiviral TNS9 [161]. Il encode le gène de  $\beta$ -globine humaine : Les exons du gène  $\beta$ -globine sont représentés par les carrés bleus clairs, les introns par les carrés blancs. L'insulateur *CHS4* est codé. Le vecteur TNS9.3.55 est une version de ce lentivirus présentant des variations mineures.

La réussite de cette thérapie génique utilisant un vecteur lentiviral encodant le promoteur du gène de la  $\beta$ -Globine humaine a été démontré en premier sur le modèle  $\beta$ -Thalassémique murin. Une augmentation de l'hémoglobine totale de 4-6g/dL a été obtenue.

La phase I de cet essai a débuté en 2012, sur des patients  $\beta$ -Thalassémiques majeurs âgés de plus de 18ans.

Cette étude analyse les occurrences de sites d'insertion, la génération de lentivirus capable de se répliquer mais également, et ce qui diffère cet essai des autres : la sécurité d'un conditionnement à faible dose, un conditionnement non-myéloablatif.

Cinq patients ont été enrôlés et 3 ont bénéficiés d'une greffe autologue de cellules CD34<sup>+</sup> transduites avec le vecteur TNS9.3.55. Les cellules souches du patient ont été récoltées après traitement par un facteur de croissance stimulant les colonies de granulocytes (un G-CSF (*Granulocyte- Colony Stimulating Factor*), le filgrastim\*). Le protocole de conditionnement effectué avant la greffe n'est donc pas total mais seulement modéré (8mg/kg de busulfan). Les cellules CD34<sup>+</sup> transduites contenaient entre 0.21 et 0.39 VCN. Après la greffe, le taux de VCN dans les cellules sanguines mononuclées a progressivement augmenté de 1% jusqu'à 7% 1 an après la greffe, sans émergence de clone dominant. Cependant, la transfusion-indépendance n'a pas été atteinte pour les 3 premiers patients un an après la greffe. Suite à ces résultats, le traitement de patient supplémentaire n'a été autorisé qu'après l'évaluation de l'impact du conditionnement modéré pré-greffe sur ces 3 patients. Des études supplémentaires ont été réalisées pour démontrer l'efficacité et la sécurité du protocole, avec un vecteur produit dans des conditions BPF ; après l'obtention de résultats positifs, l'étude est de nouveau en phase de recrutement.

\*G-CSF [183]: Glycoprotéine régulant la production et la libération des polynucléaires neutrophiles fonctionnels à partir de la Moelle osseuse

\*Filgrastim (Neupogen®) [183]: Ce G-CSF provoque une forte augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles circulants, dès le premier jour de traitement. Les neutrophiles ainsi produits possèdent des activités et fonctions normales. Son intérêt ici est qu'il permet également la mobilisation des cellules souches et la croissance des cellules myéloïdes (mais également celles des cellules malignes).

- **GLOBE virus [184] [185] [186]**

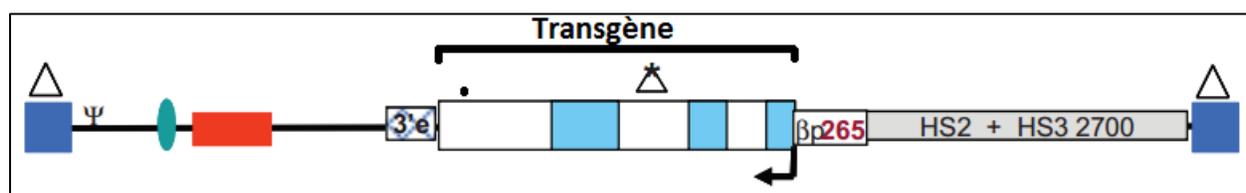


Figure 28 : Organisation du vecteur GLOBE [161]. Les triangles représentent la délétion de 400 paires de bases pour rendre le lentivirus auto-inactivateur. Les exons du gène  $\beta$ -globine sont représentés par les carrés bleu-clairs, les introns par les carrés blancs.

Un essai italien sponsorisé en partie par la fondation Téléthon a été débuté en mai 2015, recrutant des patients  $\beta$ -Thalassémiques transfuso-dépendants, répartis en 3 groupes de patients (3-7 ans, 8-17ans, >18ans). Des données précliniques sur le modèle murin  $\beta$ -Thalassémique ont démontré la capacité du vecteur à corriger la pathologie en restaurant des paramètres hématologiques normaux.

Cette phase clinique I/II évalue l'efficacité et la sécurité des cellules souches hématopoïétiques autologues génétiquement modifiées avec le lentivirus globe encodant le gène de  $\beta$ -globine humaine.

Les patients seront suivis pendant 2ans. La prise de la greffe (avec une prise dans un délai maximum de 60jours), la survenue d'effet indésirable à court terme, de réaction systémique, l'absence de lentivirus compétent pour la réplication, l'absence de prolifération anormale de clone, la réduction effective des besoins en transfusion (après 7mois post-greffe), l'amélioration de l'anémie, la quantification des VCN, l'expression de transgènes par la quantification de l'hémoglobine génétiquement modifiée produite, seront les paramètres étudiés.

Enfin, l'amélioration de la qualité de vie sera analysée par un questionnaire standardisé.

### *III/1)5) La thérapie génique: de multiples possibilités thérapeutiques [170] [187]*

#### **III/1)5)a. Une alternative aux cellules souches hématopoïétiques : les cellules souches pluripotentes induites**

- **Présentation des Cellules Souches Pluripotentes Induites [188] [189] [190] [191]**

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) sont des cellules souches pluripotentes qui ont été produites en laboratoire, à partir de cellules déjà différenciées (cellule somatique). Elles sont qualifiées de pluripotentes car, comme les cellules embryonnaires, elles peuvent se diviser à l'infini et se différencier sans restriction en n'importe quel type de cellules de l'organisme. (Contrairement aux cellules souches ombilicales ou adultes qui ont déjà débuté un processus de différenciation).

Les iPSCs sont des substrats prometteurs pour la thérapie génique à la place des actuelles cellules souches hématopoïétiques, du fait qu'elles peuvent être amplifiées de manière infinie in vitro et permettent la sélection de clones d'intérêt thérapeutique. Elles sont toutefois soumises aux mêmes probabilités de mutations indésirables que les cellules classiques.

L'induction de la pluripotence est permise par la 'reprogrammation' de la cellule différenciée. L'expression des gènes inhérents au stade embryonnaire, correspondant aux signaux d'immaturité et de prolifération, est réactivée. Pour permettre cette réactivation, un ensemble de 4 gènes spécialisés des cellules souches (nommés : Oct3/4, Sox2, c-Myc, et Klf4) est vectorisé dans le noyau de la cellule différenciée par un virus ou par d'autre technique d'injection d'ARNm. La pluripotence est ainsi réactivée tandis que les gènes associés à la différenciation de la cellule initiale sont alors réprimés. Ce phénomène est appelé la 'dé-différenciation cellulaire'. Différents types de cellules humaines, comme les kératinocytes, fibroblastes, adipocytes et les cellules hématopoïétiques entre autres, présentent la capacité d'être reprogrammées.

La transplantation d'iPSC représente cependant des risques, notamment de formation de tumeur en cas de prolifération incontrôlée des cellules, ou des risques de mutagenèse insertionnelle. Par ailleurs, une reprogrammation incomplète, dans le cas où des spécialisations du génome acquises au cours de la vie différenciée de la cellule persistent après sa reprogrammation, peut provoquer l'incapacité de la différencier complètement en de nouvelles cellules adultes.

Le mode de production d'iPSC à large échelle, tout en minimisant les risques tumoraux et le caractère immunogène des cellules transplantées, n'a pas encore été fixé de façon consensuelle.

- **Les iPSC : Rôle dans la recherche sur la  $\beta$ -Thalassémie [192]**

La technologie d'iPSC a été utilisée dans de récentes recherches concernant les hémoglobinopathies et la  $\beta$ -Thalassémie en particulier, en tant que modélisation de la pathologie, une alternative au modèle murin : les cellules d'un patient sont reprogrammées, mises en culture pour qu'elles prolifèrent, puis redifférencier en érythrocytes.

Par ailleurs, il a été prouvé que des cellules de liquide amniotique obtenues durant le diagnostic prénatal d'une  $\beta$ -Thalassémie peuvent être reprogrammées rapidement et efficacement en iPSC. Une étude montre d'une part que les cellules  $\beta$ -Thalassémiques peuvent bien bénéficier de cette technologie et d'autre part que le liquide amniotique pourrait être une source de cellules plus adaptée que les cellules de la peau classiquement utilisées pour la production d'iPSC, la reprogrammation s'effectuant en 10 jours avec le liquide amniotique contre 4 semaines avec les fibroblastes.

La limite de cette approche est liée à l'observation que les globules rouges dérivés des iPSC ont des capacités limitées à exprimer l'hémoglobine adulte. C'est un problème majeur qui doit être résolu avant l'application clinique de cette stratégie thérapeutique.

Enfin, les recherches in vitro des thérapies géniques s'effectuant régulièrement sur des cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines, l'emploi de cellules souches pluripotentes induites permettraient de palier au problème bioéthique (cf. partie III/2)3) posé par la recherche sur les cellules embryonnaires.

### **III/1)5)b. Autres perspectives [170]**

Le principe de la thérapie génique et les connaissances de plus en plus développées de la régulation du gène  $\beta$ -Globine ouvrent la voie à de nombreuses hypothèses de stratégies de traitement, qui pourraient s'effectuer grâce à cette technique. Cibler l'HbF est notamment une autre possibilité d'agir sur la pathologie.

- **Activation de l'hémoglobine foetale [193]**

Augmenter la production de l'HbF chez les patients  $\beta$ -Thalassémiques est sans nul doute bénéfique. Au lieu d'agir sur le gène  $\beta$  porteur de la mutation (difficile à cibler car la  $\beta$ -Thalassémie résulte de

plus de 300 mutations possibles), vectoriser un transgène qui active la  $\gamma$ -Globine endogène permettrait d'augmenter la production d'HbF.

Une autre alternative est représentée par la récente mise au point d'un facteur de transcription du gène  $\gamma$ -Globine qui, vectorisé dans les cellules adultes, réactive les gènes  $\gamma$ -Globine silencieux.

Par ailleurs, la conjugaison de la thérapie génique avec un inducteur d'HbF (Hydroxyurée) apparaît comme étant une stratégie pertinente pour obtenir des améliorations de l'état clinique non observées avec l'une ou l'autre des stratégies utilisée seule. Les résultats montrent que la combinaison des deux thérapeutiques permet d'atteindre des taux élevés d'Hb fonctionnelle dans les cellules  $\beta$ -Thalassémiques et de diminuer l'excès d' $\alpha$ -Globine.

- **Nucléases de synthèse [194]**

Le développement de 2 types d'enzyme de restriction, des nucléases artificielles (nommée 'TALEN' pour *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*, et une nucléase à doigt de zinc artificielles *ZN zinc finger nucleases*) permet de repérer le locus du gène  $\beta$ -Globine humaine et de cliver le gène  $\beta$ -Globine muté.

Les enzymes de restriction sont des enzymes capables de couper l'ADN au niveau d'une séquence bien spécifique. Les *Transcription activator-like effectors* (TALEs, un type d'activateur de transcription) peuvent être synthétisés pour se fixer à quasiment n'importe quelle séquence d'ADN ciblée, ici la mutation responsable de la pathologie. Un domaine TALE associé à un domaine de clivage de l'ADN crée ainsi une enzyme de restriction spécifique pour une mutation précise. Pour être applicable en clinique, Cette technique est donc à adapter aux mutations  $\beta$ -T les plus répandues.

Expérimentalement, la vectorisation concomitante d'un TALEN et d'une séquence codant pour le gène  $\beta$ -Globine humain dans une cellule iPSC (modèle  $\beta$ -Thalassémique) a permis de corriger le gène, les érythroblastes dérivés des cellules iPSC présentant une globine  $\beta$  normale.

La vectorisation de ces nucléases de synthèse représenterait ainsi l'approche de thérapie génique la plus directe pour traiter la  $\beta$ -Thalassémie.

### III/1)6) Conclusion sur les thérapies géniques [195] [196]

- **Un espoir limité par des questions en suspens**

La thérapie génique représente une des approches les plus prometteuses pour l'avenir des traitements des  $\beta$ -Thalassémies et regroupe de nombreuses stratégies complémentaires, permettant

de traiter la cause directe de la pathologie et non plus ses complications. La plus avancée des stratégies, la vectorisation du gène de  $\beta$ -Globine par un lentivirus dans le génome des cellules souches hématopoïétiques du patient permet déjà une production *de novo* de l'HbA. Comparée à une greffe de cellule souche allogénique classique, cette technique évite les problèmes d'incompatibilité HLA, les réactions de GVH et limite ainsi la durée des traitements immunosuppresseurs post-greffes.

Des recherches supplémentaires sont cependant nécessaires pour résoudre certaines questions et fixer certains paramètres. La toxicité latente des vecteurs viraux, et les réponses immunes et inflammatoires qu'ils provoquent sont notamment des points préoccupants qui pourraient remettre en cause l'utilisation de ce type de vecteur et favorisent déjà la réflexion autour du développement de nouveaux moyens d'insertion des transgènes, comme l'électroporation. L'intensité du conditionnement pré-greffe, et l'emploi de traitement permettant une meilleure mobilisation de cellules souches du sang périphérique du patient sont deux autres points discutés. Enfin, la source même des cellules greffées, les cellules souches hématopoïétiques du patients présentes parfois en faible quantité, est challengée par la mise au point de cellules souches pluripotentes induites, obtenues en quantité infinie.

#### • Les thérapies géniques pour tous

Les thérapies géniques en général représentent un secteur de recherche compétitif et en pleine expansion: entre 2013 et 2014, 600 millions de dollars ont été injectés par les compagnies pharmaceutiques afin de les développer. Le premier traitement par thérapie génique (Glybéra®) a obtenu son AMM en 2012 et incarne le médicament le plus cher au monde avec un coût de plus 1million de dollars par patient. Ce paramètre pourrait être limitant dans le cadre de la  $\beta$ -Thalassémie, en effet la plus part des patients résident dans des pays en développement, où les recherches de thérapies géniques ne sont pas très avancées.

### • Un problème éthique

Une telle possibilité de manipuler les gènes pose le problème des limites acceptables de ces thérapies géniques et du champ de restriction de leur application. En effet, une dérive potentielle de l'usage de ces connaissances scientifiques est un risque porté par une telle technique. Parmi les multiples dérives possibles de son usage, on note le dopage des sportifs, ou encore l'ingénierie génétique humaine; changer les performances physiques, les facultés mentales (comme la mémoire ou l'intelligence). Par ailleurs, certains pays interdisent les essais de thérapie génique chez l'homme afin de palier à ces risques de dérives. L'éthique, plus précisément la bioéthique, devient ainsi une composante primordiale du cadre limitant les recherches scientifiques.

## III/2) L'espoir thérapeutique d'un diagnostic particulier

La mise au point de techniques de plus en plus performantes de diagnostic permet de faire évoluer les pratiques et les intérêts de ceux-ci. Le diagnostic familial d'une  $\beta$ -Thalassémie représente un enjeu majeur pour l'avenir de cette famille, mais peut également dans certain cas être vecteur d'un double espoir : celui d'éviter la maladie aux descendants et d'en guérir les porteurs de la mutation.

### *III/2)1) Les deux types de diagnostics anténataux [1] [197] [198] [199]*

#### **III/2)1)a. Le Diagnostic Prénatal (DPN)**

Il s'effectue sur un embryon ou un fœtus en développement, donc au cours d'une grossesse. Le prélèvement peut être effectué à différents stades de la grossesse : les prélèvements de villosités chorales (appelés choriocentèse) s'effectuent entre 10 et 18 semaines de grossesse, le prélèvement de liquide amniotique (appelé amniocentèse) est fait entre 14 et 16 semaines et la cordocentèse, correspondant au prélèvement de sang fœtal du cordon ombilical est effectué après 20 semaines de grossesse. Dans le cas de famille dont les deux parents sont porteurs de gènes  $\beta$ -Thalassémiques, le DPN est proposé lors d'une consultation de conseil génétique, afin de savoir si l'enfant est indemne ou atteint de la pathologie. Les résultats rassurent les futurs parents lorsque l'enfant est indemne. Dans le cas contraire, une interruption médicale de grossesse (IMG) est envisageable selon l'avis des médecins spécialistes et du Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal (CPDPN). L'arrêt de la grossesse représente une décision et une épreuve difficile pour tous les couples.

### III/2)1)b. Le Diagnostic Préimplantatoire (DPI)

Le DPI est un processus complexe. Il permet de détecter des anomalies génétiques portées par des embryons conçus lors d'une fécondation in vitro (FIV), en vue d'être implantés pour une grossesse. Ce diagnostic précoce est une alternative récente au DPN permettant d'éviter les IMG. Il nécessite cependant de recourir à un protocole d'assistance médicale à la procréation pour des couples qui ne présentent pas forcément de problème de fertilité: ce protocole est lourd, contraignant et régit par des lois strictes.

### III/2)2) Le double diagnostic préimplantatoire [198]

Comme son nom l'indique, cet examen est double: un typage HLA est couplé au DPI classique.

Dans un contexte de parents porteurs de gènes  $\beta$ -Thalassémiques, avec un premier enfant atteint de  $\beta$ -Thalassémie majeure, ce double diagnostic permet de détecter les embryons non porteurs de la pathologie, mais également compatibles génétiquement avec le premier enfant malade via le typage HLA. Ainsi, cet enfant peut recevoir une greffe de cellule souche à partir du sang placentaire du nouveau-né, possédant les taux de compatibilité HLA les meilleurs possibles, lorsque les banques de sang placentaires ne possèdent pas de dons compatibles et qu'une greffe intrafamiliale n'est pas possible.

En effet, le sang placentaire (contenu dans le cordon ombilical et le placenta) contient de nombreuses cellules souches hématopoïétiques. De plus, contrairement à un prélèvement de moelle osseuse, celui-ci est facile et sans conséquence pour le nouveau-né. Enfin, ce type de tissu biologique se conserve aisément.

Les tests de compatibilité HLA étant réalisé sur peu de cellules pendant le protocole de FIV, de nouveaux test sont effectués sur le sang avant la réalisation de la greffe, il existe toujours un risque que la compatibilité ne soit pas celle espérée et que la greffe ne puisse pas avoir lieu.

Les indications pour effectuer ce double diagnostic sont précises et très strictement encadrées par la loi.

Cette technique soulève aussi de nombreux débats bioéthiques autour du 'bébé-médicament'.

### III/2)2)a. La première naissance française issue d'un double DPI [200]

Un couple d'origine turque, tous les deux sans antécédents particuliers, ont donné naissance à deux enfants  $\beta$ -Thalassémique majeures. Après un conseil génétique, ils ont décidé de suivre la démarche du double DPI.

Après une stimulation ovarienne classique, 23 ovocytes ont été recueillis lors de la ponction, 17 ont été fécondés, aboutissant à 14 embryons, dont 7 ont été biopsiés à J3. Sur ces 7 embryons, 3 étaient sains, dont un était HLA compatible avec sa grande sœur malade. Le couple a demandé le retransfert de deux embryons, donc un embryon non HLA compatible, afin d'augmenter leur chance de naissance d'un enfant sain. La grossesse ne s'est poursuivie qu'avec un seul embryon. Après un DPN à 19 semaines d'aménorrhée, il a été confirmé que cet embryon était non porteur de mutation du gène  $\beta$ -Globine pathologique, et HLA compatible.

La grossesse a été menée sans complication, le petit 'Umut-Talha' ('espoir' en turc) est né à presque 39 semaines d'aménorrhée. Le sang du cordon ombilical a été récupéré : deux poches ont été récoltées (environ 500ml de sang). La compatibilité HLA avec la grande sœur a été reconfirmée.

Un an et demi après la naissance d'Umut-Thala, la greffe avait eu lieu et la grande sœur était alors transfuso-indépendante.

### III/2)2)b. Le DPI-HLA en pratique [200] [201] [202]

- **La validation de la demande**

Le pédiatre hématologue qui suit la famille adresse la demande à un des centres spécialistes du DPI, qui pré-évalue celle-ci. Elle y est étudiée par une équipe pluridisciplinaire, formée de généticiens, biologistes, gynécologues-obstétriques, et de psychiatres appartenant à un des CPDPN autorisé par l'Agence de Biomédecine. D'une part, les rapports d'analyses génétiques et les caryotypes des parents sont étudiés, d'autre part, les chances de réussites de la FIV sont calculées, un rapport bénéfice/risque pour la mère est établi.

Si le CPDPN valide la requête, celle-ci est analysée par l'Agence de Biomédecine\*. Cette dernière vérifie la bonne indication de la greffe de cellules souches pour l'enfant malade, les motivations de la famille, et également la conformité de cette demande avec la loi.

4 centres sont agréés par l'Agence de Biomédecine pour la réalisation des DPI en France (Paris, Montpellier, Strasbourg, Nantes).

*\*Agence de Biomédecine : Agence Publique nationale dont les missions s'articulent autour de la gestion des prélèvements et greffes de cellules, tissus, organes, et également dans les domaines de la génétique, l'embryologie et la procréation.*

*Elle délivre aux centres de diagnostic préimplantatoire leur autorisation d'activité, les inspectent, et remet les agréments aux praticiens. L'Agence participe également à l'élaboration de bonnes pratiques.*

*Elle fait office d'Autorité de référence concernant les aspects scientifiques, médicaux et éthiques de ces domaines.*

- **La FIV [203]**

La fécondation in vitro est la base du double DPI. 21 jours avant la ponction, les ovaires 'sont mis au repos', l'ovulation est freinée par l'administration d'analogue de GN-RH (Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires), la triptoréline (*Decapeptyl*<sup>®</sup>), qui inhibent les sécrétions des hormones gonadotropes, empêchant donc le pic de ces hormones responsables de l'ovulation. 10 jours avant la ponction, la stimulation ovarienne est débutée permettant le développement multifolliculaire: elle s'effectue via une injection quotidienne d'Hormone FolliculoStimulante (FSH recombinante: *Puregon*<sup>®</sup>, *Gonal-F*<sup>®</sup>).

Lorsque la maturation folliculaire est optimale, l'ovulation est déclenchée après une injection de gonadotrophine (Hormone Chorionique Gonadotrope HCG recombinante : *Ovitrelle*<sup>®</sup>). Les protocoles hormonaux avant la ponction sont à adapter à chaque patiente.

La ponction folliculaire s'effectue sous anesthésie, dans les 36 heures suivant l'injection, par aspiration du liquide de tous les follicules aperçus à l'échographie. (Un ovocyte est contenu dans chaque follicule, et baigne dans le liquide folliculaire). Sous microscope, les ovocytes sont ensuite prélevés de ce liquide. En parallèle s'effectue le recueil du sperme.

Dernière étape dans les heures qui suivent les recueils : un spermatozoïde du père est injecté directement dans le cytoplasme de l'ovocyte (cf Figure 30), conservé dans un milieu de culture. Pas nécessaire pour tous les cas de FIV, l'injection intra cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) est systématique dans le cadre de DPI : elle permet d'éviter la contamination de la zone pellucide par des spermatozoïdes qui y resteraient accrochés et qui pourraient perturber le diagnostic génétique en étant analysés avec le blastomère.

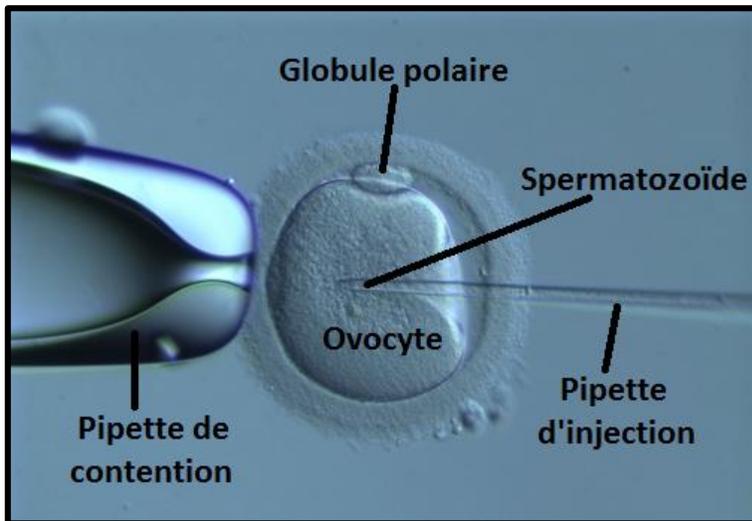


Figure 29 : Déroulement de l'ICSI [204]

L'ovocyte fécondé débute alors sa division, donnant des cellules appelées 'blastomères' (cf Figure 31). Une biopsie ne peut être effectuée sur les embryons que lorsqu'ils présentent entre six et huit blastomères de taille équivalente, ce stade est présenté après 3 jours de développement.

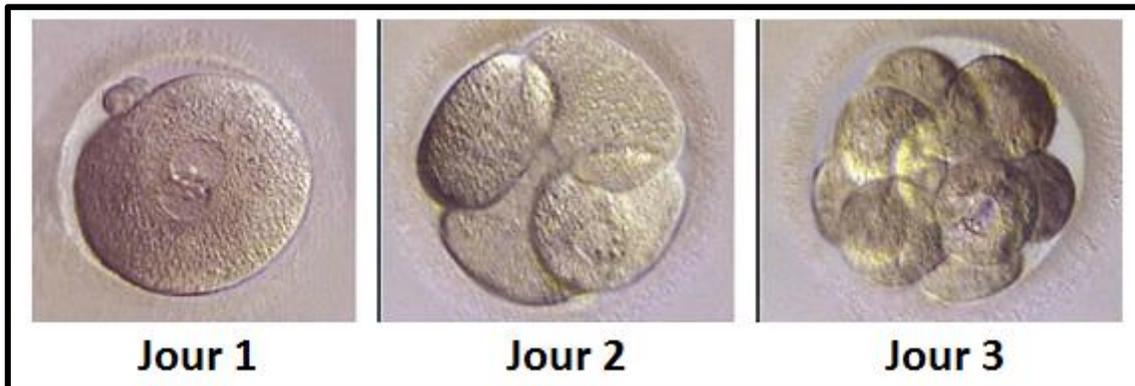


Figure 30 : Développement d'un embryon et sa division en blastomères [205] (Jour 1 : ovocyte fécondé, jour 3 : Stade à 8 blastomères)

- **L'Identification des embryons transférables**

Un prélèvement de deux blastomères est effectué après l'ouverture de la zone pellucide (la couche glycoprotéique sulfatée autour de l'ovocyte et limitant son augmentation volumique) par un laser (cf Figure 32).



*Figure 31 : Ponction de blastomère en vue de leur biopsie [204]*

Les recherches des mutations des  $\beta$ -Thalassémies sont faites par des techniques de PCR. Celles-ci sont adaptées à chaque couple et leur mise au point par le laboratoire peut mettre beaucoup de temps (jusqu'à 6 mois), la technique doit être finalisée avant de débiter le process de stimulation hormonale.

L'analyse génétique doit être effectuée au maximum le jour suivant le prélèvement des cellules, les embryons sont pendant ce temps conservés dans un milieu de culture approprié en incubateur.

Lors de l'analyse, les embryons sains sont d'abord identifiés, puis l'étude de la compatibilité HLA est effectuée sur les blastomères prélevés. Une durée d'analyse courte optimise les conditions du transfert des embryons sains dans l'utérus de la mère.

Le prélèvement de cellules et les dommages physiques engendrés ne sont pas sans risque pour l'embryon et peuvent compromettre son bon développement, son implantation dans la cavité utérine. Cependant, la biopsie de blastomère est la technique qui montre le plus grand taux de grossesses réussies.

- **Les résultats**

Seuls 3 embryons sur 16 obtenus par FIV sont sains et compatibles (1 chance sur 4 d'être HLA compatible x 3 chances sur 4 d'être sain ou porteur d'un trait  $\beta$ -thalassémique non symptomatique ( $1/4 * 3/4 = 3/16$ )).

Les résultats du diagnostic sont remis dès le lendemain au couple ainsi que le degré de confiance leur étant attribué (la technique accélérée de ce genre de test ne peut garantir la même valeur que les analyses biologiques habituelles, mais les données internationales font état de moins de 0,2% d'erreurs de diagnostics).

Les embryons sains sélectionnés sont réinjectés dans l'utérus de la mère, au stade de blastocyste, et continuent leur développement en s'implantant dans la muqueuse utérine. Si des embryons sains ne sont pas transférés, ils sont cryoconservés dans l'azote liquide (cependant les transferts post-cryoconservation présentent un taux de réussite moins élevé). En général, entre deux et trois embryons sains sont réinjectés, même s'ils ne sont pas HLA compatibles, en fonction du souhait des parents. Les chances de grossesse suite à la réimplantation d'embryon post-FIV sont ensuite d'une sur trois.

Selon le degré de confiance des résultats du DPI, un DPN au cours de la grossesse peut être conseillé aux parents. Cependant ce contrôle invasif est porteur de risques de fausse couche (entre 1 et 2% selon le stade de développement) et n'est que rarement réclamé par les parents.

- **A la naissance**

Le sang est prélevé au niveau du cordon et du placenta lorsqu'il est encore dans la cavité utérine de la mère, avant la délivrance; il est alors toujours oxygéné ce qui favorise la qualité des cellules recueillies. Afin de vérifier l'absence d'agent infectieux, des analyses sont effectuées et le typage HLA est réeffectué. Ce sang subit ensuite un traitement afin d'éliminer les hématies et le plasma. Le produit réduit ainsi obtenu est associé à un solvant (du Dimethylsulfoxyde) et est stocké dans de l'azote liquide (à  $-150^{\circ}\text{C}$ ) jusqu'à utilisation.

Enfin, les cellules souches sont transfusées au patient par voie intraveineuse. Le patient aura auparavant subi le conditionnement approprié pour entraîner une myélosuppression.

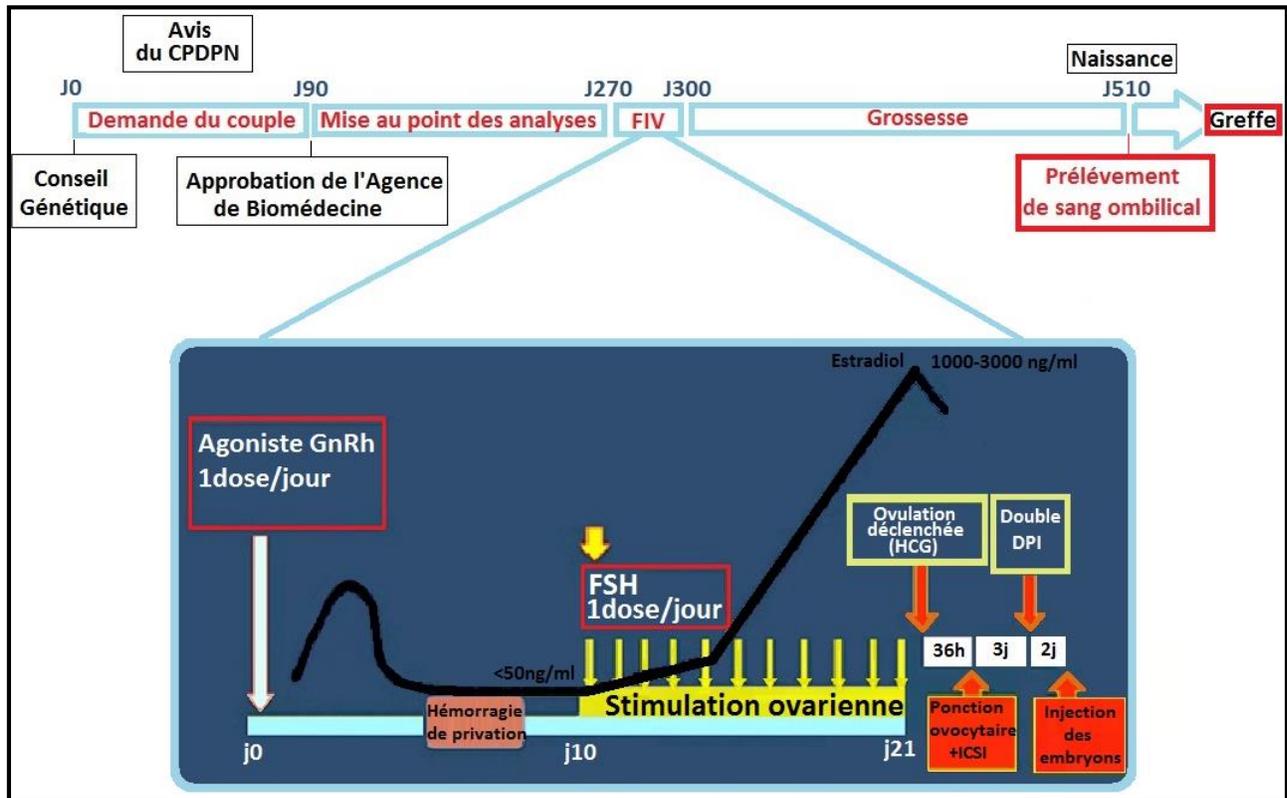


Figure 32 : Processus du double DPI [206]

Le délai entre la demande parentale et la greffe effective est variable selon les cas. Selon la complexité de la demande et la difficulté pour les instances de statuer sur son autorisation, le délai de mise au point des analyses des mutations familiales, le nombre de tentatives de FIV, ce délai peut être largement allongé (en général entre 18mois et 2ans). Hors, le temps est un facteur critique pour cette technique : l'enfant malade peut voir son état se dégrader en l'espace d'une année, et les chances de grossesse après une FIV diminuent avec l'âge de la mère.

### III/2)3) Le double DPI : entre éthique et législation [207] [208] [209]

#### III/2)3)a. La Bioéthique

- **Définition et missions [210] [211] [212]**

Le terme « Bioéthique » vient de « bio », qui veut dire « vivant », et d'« éthique », qui signifie « ce qui est bon et utile pour l'homme » et est apparu dans les années 1970.

Les nombreuses recherches scientifiques et leurs apports de connaissances toujours plus rapides et pointus en matière du vivant, et plus précisément de l'Homme, nécessitent des réflexions anticipées quant à l'utilisation de ces découvertes. La bioéthique désigne donc tous les discours ou pratiques 'éthiques et sociétales' permettant de clarifier la mise en application de développement

technoscientifique au service de la santé humaine. L'émergence des biotechnologies a été un déclencheur de ce besoin d'allier l'innovation aux valeurs humaines, telles que la morale, la déontologie et les droits de l'homme.

La bioéthique a pour but de cadrer l'emploi de la médecine sur le corps humain, en veillant à l'intégrité et à la dignité du patient, et en contrôlant les risques de dérives par l'exploitation détournée des savoirs (par exemple le clonage humain, les trafics d'organes).

- **Les acteurs [213]**

L'actuelle évolution de la bioéthique et sa place de plus en plus prépondérante dans la société (et dans les médias) montre que les interrogations auxquelles elle tend à apporter une réponse sont fondamentales pour la société.

Des instances de bioéthique sont ainsi créées pour répondre d'une manière officialisée à ces questions.

En France, Le Comité Consultatif National d'Ethique (CCNE) a été créé en 1983 et rédige des avis concernant les sujets bioéthiques d'actualité.

L'Europe possède l'Institut Européen de Bioéthique depuis 2001.

Le Comité Internationale de la Bioéthique (CIB) est une section de l'Unesco (l'Organisation des nations unies pour l'éducation, la science et la culture), fondée en 1998. Au sein de groupes de travail, le CIB déclenche les débats et réflexions autour des enjeux juridiques et éthiques des dernières recherches scientifiques et encourage les actions de sensibilisation.

Enfin, l'exercice de la bioéthique est multidisciplinaire : il implique bien sûr les professionnels de Santé (médecins, pharmaciens, biologistes, généticiens) mais également les juristes, sociologues ou encore philosophes.

- **Les aspects bioéthiques du double DPI [214] [215]**

L'AMP, avec la naissance du premier 'enfant FIVETE' (Fécondation InVitro Et Transfert d'Embryon) a été un des premiers sujets amenant à la réflexion bioéthique en France dans les années 1980. Plusieurs problématiques bioéthiques s'imposent face à la possibilité d'enfant FIVETE après un double DPI :

Par la sélection des embryons se pose la question de l'eugénisme\*. Une des dérives possible est notamment le choix concomitant du sexe de l'enfant dans certaine culture, ou encore le choix de caractéristiques physiques (la couleur des yeux). Ce phénomène est exprimé par le terme 'designer baby' (traduisible par *bébé sur mesure*), observé aux Etats-Unis. Le sexe, La couleur des yeux, Le quotient intellectuel, pour quels critères le choix pourrait-il encore s'effectuer?

Par le souhait de sauver un premier enfant en sélectionnant le second se pose la question de l'instrumentalisation du nouveau-né, du 'bébé-médicament'. Quels seraient les relations intrafamiliales en cas d'échec de la greffe du sang de cordon ?

Autant de questionnements sur lesquels les instances se sont penchées, et autour desquels des lois ont été élaborées en France afin de cadrer l'activité du DPI et la possibilité de le coupler à un typage HLA, et d'en écarter le risque de dérives.

*\*Eugénisme [216]: Provient du grec eu 'bien' et 'genos' 'naissance, genre, race, espèce'. La définition même de l'eugénisme peut être sujette à débat.*

*Le terme a été employé pour la première fois en 1883 par Francis Galton, un naturaliste anglais. Il a désigné par ce mot 'la science, technique et politique visant à améliorer les qualités héréditaires de groupes humains par le contrôle de la procréation'.*

*Une des lois de bioéthique présente la définition suivante : 'L'eugénisme peut être désigné comme l'ensemble des méthodes et pratiques visant à améliorer le patrimoine génétique de l'espèce humaine. Il peut être le fruit d'une politique délibérément menée par un Etat et contraire à la dignité humaine. Il peut aussi être le résultat collectif d'une somme de décisions individuelles convergentes prises par les futurs parents, dans une société où primerait la recherche de l'enfant parfait, ou du moins indemne de nombreuses affections graves'.*

- **Le double DPI : une pratique controversée [217] [218]**

En 2011, avec la naissance du premier enfant issu de cette technique et la révision des lois de bioéthique, un vaste débat s'est réveillé. De nombreux arguments et questionnements pour et contre cette pratique sont soulevés par diverses professions :

La place du nouveau-né dans le schéma familial est souvent mise au cœur des arguments. Comment sera intégrer le nouveau-né si la greffe de cellules souches n'est finalement pas possible, si le premier enfant n'est pas guéri? Le désir de sauver ne peut-il pas être parfois plus fort que le désir premier d'avoir un enfant : comment les parents géreront alors leur potentielle déception ? Quels liens fraternels vont-ils se créer? Comment l'enfant en grandissant va-t-il percevoir sa naissance programmée, quel poids va t'il ressentir?

Quel devenir pour les embryons surnuméraires ?

Et si la greffe est une réussite, le nouveau-né ne sera-t-il pas ressollicité plus tard pour d'autre don? Ne ressentira-t-il pas un devoir thérapeutique envers ses aînés? L'aîné ne se sentira-t-il pas redevable envers son cadet ? Avoir le consentement du donneur est une étape indispensable dans un processus de don classique : prélever des cellules d'un enfant trop jeune pour donner son accord, n'est-ce pas bafouer un des premiers principes de la déontologie ?

D'un autre côté, des arguments avancés par des généticiens indiquent que le double DPI n'est qu'une modernisation d'une pratique déjà existante : en effet, certains couples concevaient des enfants dans l'espoir qu'ils soient compatibles avec l'aîné malade. Par ailleurs, l'autorisation donnée au cas par cas empêcherait les dérives de la méthode selon des spécialistes du droit et l'Académie Nationale de Médecine.

Les psychiatres encourageant la technique mettent également en avant le fait qu'elle permet d'apporter un secours à une famille en souffrance, et qu'elle permet d'éviter la lourde prise en charge thérapeutique d'une  $\beta$ -Thalassémie. Le don de sang de cordon ombilical présente d'ailleurs de meilleurs résultats que le don de moelle osseuse intrafamilial.

Dans le cas du premier enfant né du double DPI en 2011, les parents avaient souhaité l'implantation d'embryons sains non compatibles, montrant ainsi que leur souhait premier à travers cette démarche était d'avoir un enfant 'pour lui-même'.

Si les réponses à ces questions et arguments ont une part de subjectivité et de convictions propres à chacun, dépendantes en partie de la culture et de la religion, il est cependant certain qu'un suivi psychologique adapté de la famille doit être mis en place dès la demande de double DPI par les parents.

### III/2)3)b. Le cadre défini par la loi de Bioéthique en France [219] [220]

Tableau 6 : Evolution des pratiques de diagnostics génétiques en France et dans le Monde [198]

En France	Dans le monde
<p><u>1982</u>: Naissance du 1<sup>er</sup> enfant FIVETE</p> <p><u>1994</u>: Rédaction des Lois de bioéthique : Le DPI est légiféré par la loi n°94-654 concernant le don et l'utilisation des éléments et des produits du corps humain, et relative à l'Aide Médicale à la Procréation et au DNP. Cette loi est intégrée dans le code de la santé publique : article L.2121-4 et L.2131-4-1.</p> <p><u>1999</u>: Autorisation du DPI à titre expérimental, après la rédaction des décrets expliquant les conditions d'applications des lois de 1994.</p> <p><u>2002</u>: Avis 102 du CCNE sur le Double DPI</p> <p><u>2004</u>: Intégration du DPI expérimental avec un typage HLA dans les textes législatifs lors de la révision des lois de bioéthique.</p> <p style="padding-left: 40px;">Création de l'Agence de Biomédecine*</p> <p style="padding-left: 40px;">Emergence du débat du 'bébé-médicament'</p> <p><u>2006</u>: Rédaction du décret d'application de la loi de 2004 : le double DPI est alors réalisable.</p> <p><u>2009</u>: Avis 107 du CCNE autour des problématiques des diagnostics anténataux (DPI et DPN).</p> <p><u>2011</u> (Janvier): Naissance du premier 'bébé du double espoir'.</p> <p style="padding-left: 40px;">(Juillet): Nouvelle loi de Bioéthique : le caractère 'expérimental' du Double DPI n'est plus une exigence.</p> <p><u>2012</u>: Avis 117 du CCNE concernant le don de sang placentaire.</p> <p><u>2013</u>: Rédaction de bonnes pratiques du DPI par l'Agence de Biomédecine.</p> <p><u>2015</u> (1<sup>er</sup> Juin): Arrêté sur les Bonnes Pratiques des DPN et DPI, concernant les modalités de prises en charges des couples et le fonctionnement des CPDPN.</p>	<p><u>1988</u>: <i>Etats-Unis</i> Première greffe à partir de sang de cordon ombilical.</p> <p><u>2001</u>: <i>Etats-Unis</i> Naissance d'un enfant sain après un double DPI.</p> <p><u>2003</u>: <i>Angleterre</i> Premier Bébé double DPI.</p> <p><u>2005</u>: <i>Belgique</i> Premier Bébé double DPI</p> <p><u>2008</u>: <i>Espagne</i> Bébé double DPI <math>\beta</math>-Thalassémique.</p> <p><u>2015</u>: (14 juin) <i>Suisse</i> : Referendum pour l'Autorisation du DPI : Vote 'oui' à 61,9%.</p>

- **Définition réglementaire du DPN**

‘Le diagnostic prénatal (DPN) s'entend de l'ensemble des moyens médicaux cliniques, biologiques et d'imagerie qui peuvent être mis en œuvre au cours de la grossesse pour détecter in utero chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité’. Cette définition large implique donc les recherches moléculaires de maladie génétique héréditaire comme la  $\beta$ -Thalassémie mais également les échographies de routine obligatoires pour chaque grossesse. Dans le cadre de recherche de maladie génétique héréditaire, des analyses doivent avoir été effectuées chez les parents avant la grossesse.

- **Exigences de la Législation du DPI**

Pour qu'une demande de DPI soit acceptée par l'agence de biomédecine, il faut ‘une forte probabilité’ que le couple donne ‘naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic’. Le DPI n'est effectué qu'après identification de l'anomalie à l'origine de la maladie dans le couple.

L'autorisation d'un DPI n'est donnée que dans le seul but de rechercher cette pathologie familiale.

Deux catégories de maladies peuvent en bénéficier : d'une part, les maladies monogéniques, entre autres les maladies autosomiques récessives dont fait partie la  $\beta$ -Thalassémie, ou encore les maladies autosomiques dominantes ou liées au chromosome X. Les mutations à l'origine de ces maladies sont connues, et donc facilement détectables par PCR. D'autre part, le DPI est applicable aux problèmes chromosomiques, par exemple les translocations robertsoniennes. Une liste des anomalies génétiques pouvant faire l'objet d'un DPI est fixé par un arrêté du Ministère de la santé. (146 indications y figuraient en 2012).

- **Exigences de la Législation du DPI avec Typage HLA [221]**

En premier lieu, ce type de DPI suit bien sûr la réglementation du DPI simple exposée ci-dessus.

L'histocompatibilité HLA avec la fratrie peut être déterminée en parallèle d'une recherche de maladie génétique dans le seul cas ou ‘le couple a donné naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique entraînant la mort dès les premières années de vie.’ La dernière révision de la loi restreint les conditions de réalisation de ce double test, en imposant de démontrer qu'aucune alternative thérapeutique n'est possible, à partir de donneurs familiaux ou des banques de sang de cordon.

Le double DPI est applicable si les conditions suivantes, inscrites en ces termes à l'article L. 2131-4-1 du Code de la Santé Publique, sont remplies :

*'- Le pronostic vital de cet enfant peut être amélioré, de façon décisive, par l'application sur celui-ci d'une thérapeutique ne portant pas atteinte à l'intégrité du corps de l'enfant né du transfert de l'embryon in utero (le traitement fait appel à la greffe de cellules hématopoïétiques issues du sang de cordon de l'enfant à naître) ;*

*- Le diagnostic a pour seuls objets de rechercher la maladie génétique ainsi que les moyens de la prévenir et de la traiter, d'une part, et de permettre l'application de la thérapeutique mentionnée ci-dessus, d'autre part.*

*Si ces conditions sont réunies, les deux membres du couple doivent exprimer par écrit leur consentement à la réalisation du diagnostic.'*

Ce cadre juridique insiste également sur la nécessité des informations à donner aux parents, à propos des contraintes de cette lourde démarche, mais également des risques d'échec. Il souligne le fait que les parents doivent à l'origine montrer un vrai désir d'enfant, et non l'unique souhait de guérir leur aîné. En effet, il est explicité qu'une seconde tentative de double DPI ne peut être débutée si des embryons sains non compatibles ont pu être conservés.

Outre la  $\beta$ -Thalassémie, les techniques actuelles permettent à 75 pathologies entrant dans ces indications de bénéficier du double DPI (par exemple les pathologies liées à l'X, la drépanocytose, les pathologies mitochondriales, l'anémie de Fanconi).

Par la promulgation de la Loi de bioéthique, la France cadre le double DPI dans une démarche d'exception. Cette loi doit être révisée tous les 5ans.

La centralisation des demandes parentales par l'Agence de Biomédecine et le fait que chaque centre soit également autorisé par celle-ci permettent d'obtenir des rapports d'activité de ces centres, et ainsi d'étudier les tendances et les risques de déviations de l'usage français du double DPI.

Les chiffres de l'Agence de Biomédecine témoignent effectivement du caractère exceptionnel de ce diagnostic, effectué au cas par cas. En 2012, 3 tentatives d'AMP pour double DPI dans le cadre de  $\beta$ -Thalassémie ont été effectuées, 3 demandes de double DPI ont été examinées, deux ont été acceptées par l'Agence de Biomédecine.

En 2012, au total 13 double DPI ont été effectués, pour 3 pathologies différentes. (cf Annexe 6)

### **III/2)3)c. Les avis du CCNE [214] [222] [223]**

Avant l'inclusion du double DPI dans la loi de bioéthique de 2004, le CCNE avait été saisi afin d'émettre un avis. La réflexion du CCNE s'est basée autour de la citation du philosophe allemand du XVIIIème siècle, Emmanuel Kant : *'Tout être humain doit aussi être considéré comme une fin en soi, et jamais uniquement comme un moyen'*.

Outre les critères de sélection des embryons et les problèmes familiaux possiblement engendrés, le problème essentiel dégagé à travers cet avis est celui de l'existence ou non d'un vrai projet parental, et du potentiel risque d'instrumentalisation de l'enfant

Quant aux possibilités d'autres dérives, Le CCNE a donc déclaré que 'l'inquiétude demeure d'avoir ouvert des champs de possibilités inconnues. L'humanité pourrait tendre à se considérer elle-même comme un moyen plutôt qu'une fin'.

Cependant, dans son dernier avis sur le DPI et le DPN en 2009, Le CCNE estime que le cadre juridique fournit par la loi de bioéthique présente des 'garde-fous' suffisants pour parer aux dérives.

En 2012, le CCNE a publié un avis concernant le don de sang placentaire, affirmant sa légitimité dans les hémoglobinopathies telles que la  $\beta$ -Thalassémie en représentant 'un traitement pertinent permettant la guérison'. Cet avis positionne également le don de sang placentaire comme un don de la part de la mère et non un don du nouveau-né. Ce don est donc éclairé et son consentement est dûment écrit et signé avant l'accouchement.

### **III/2)3)d. Conclusion**

Le double DPI peut être utilisé dans le cadre d'un terrain familial  $\beta$ -Thalassémique en dernier recours et seulement face à un projet parental clairement exprimé. Le protocole est long et les chances de réussites à la première tentative sont minces. Mais une greffe réussie permet de libérer l'enfant malade des lourds traitements de la  $\beta$ -Thalassémie dans 98% des greffes, sans oublier que cet enfant est alors entouré d'un cadet en pleine santé.

Cependant, au vu des conditions requises par la loi de bioéthique, et des nombreuses autres alternatives thérapeutiques de la  $\beta$ -Thalassémie aujourd'hui testées, il est envisageable que la pathologie ne puisse plus faire l'objet de cette technique de diagnostic dans quelques années.

Pour terminer, le terme portant à polémique de 'Bébé-médicament' a été délaissé pour celui de 'Bébé du double espoir': l'espoir que le nouveau-né soit sain, et l'espoir qu'il puisse guérir.

## CONCLUSION

Avec une technique non sans risque de la greffe de cellules souches hématopoïétiques et un arsenal thérapeutique et médicamenteux sans grande évolution durant 30ans, il subsistait un réel besoin de solutions plus sûres et plus efficaces pour traiter la  $\beta$ -Thalassémie.

Cette hémoglobinopathie fait donc actuellement l'objet de nombreuses recherches afin de mettre au point des traitements qui modifieraient de façon conséquente les habitudes thérapeutiques, en diminuant leurs contraintes. Ils permettraient ainsi l'amélioration de la qualité de vie des patients au quotidien.

La première évolution notable a été l'arrivée de la chélation orale et d'outils de mesure non invasifs et directs de la surcharge en fer.

Aujourd'hui, outre l'optimisation des premiers chélateurs oraux en vue d'augmenter leur observance et d'obtenir une meilleure tolérance des patients, les recherches portent maintenant sur les aspects moléculaires et génétiques de la pathologie. La découverte de nouveaux régulateurs et récepteurs dans le métabolisme du fer et de l'érythropoïèse a permis l'identification de nouvelles cibles à fort potentiel thérapeutique, et a multiplié les possibilités d'action sur la pathologie. Ainsi, une partie des traitements en cours d'étude clinique ne vise plus seulement à traiter les symptômes mais également à avoir une action curative en traitant les causes primaires de la maladie.

La mise au point de ces nouveaux traitements marque donc un vrai changement de stratégie thérapeutique.

A ce jour, les résultats du dernier essai clinique de thérapie génique placent ce traitement comme le plus prometteur et le plus avancé, offrant rapidement la transfuso-indépendance aux patients en rétablissant le gène qui code pour la  $\beta$ -globine. Une autre approche d'un fort intérêt est celle des pièges à ligand du récepteur de l'activine, ciblant l'induction d'une érythropoïèse normale pour aboutir à la réduction de l'anémie.

La potentielle multiplication des alternatives thérapeutiques et la variété des phénotypes présentés par les patients  $\beta$ -Thalassémiques affirment ainsi la nécessité de développer au cas par cas les protocoles thérapeutiques, en appliquant donc une médecine personnalisée. Le développement et la généralisation du génotypage de l'anomalie génétique portée par le jeune patient  $\beta$ -Thalassémique

permettrait de prédire l'évolution de sa pathologie, et de mettre en place la thérapie adaptée de façon anticipée.

Le conseil génétique a également une place primordiale face à un couple désirant un enfant. L'amélioration des techniques de détection de mutations génétiques et de la recherche de compatibilité HLA d'une part, et l'évolution de la société et des lois d'autre part, ont rendus possible la réalisation double DPI.

En 2017, les lois de bioéthique auront été revues et de nombreux essais cliniques présenteront leurs résultats. Alors qu'il est actuellement impossible de déterminer le mode thérapeutique qui l'emportera pour une application clinique généralisée dans l'avenir, le panel dense et varié de stratégies diamétralement opposées en cours d'étude permettra la sélection du moyen le plus efficace et le plus sûr, toujours pour le bénéfice du patient, mais avec un nouvel arbitre: la bioéthique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Haute Autorité de Santé, «Syndromes thalassémiques majeurs et intermédiaires : Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare,» Saint-Denis La Plaine, 2008.
- [2] Orphanet, «La bêta-thalassémie,» Juin 2008. [En ligne].  
<https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/BetaThalassemie-FRfrPub51.pdf>. [Accès le 22 Dec 2014].
- [3] R. Galanello et R. Origa, «Beta-thalassemia,» *GeneReviews*, University of Washington, Seattle, Mai 2015.
- [4] N. Marpillat, «Prévalence des maladies rares :Données bibliographiques,» *Les Cahiers d'Orphanet*, n°11, p. 63, Juil 2015.
- [5] B. Modell et M. Darlison, «Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators,» *Bulletin of the World Health Organisation*, vol. 86, n°16, p. 480-487, Juin 2008.
- [6] D. Weatherall, «Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases,» *British medical journal*, vol. 321, n°17269, p. 1117-1120, Nov 2000.
- [7] S. Glushakova, A. Balaban, P. McQueen, *et al.*, «Hemoglobinopathic erythrocytes affect the intraerythrocytic multiplication of plasmodium falciparum in vitro,» *Clinical infectious diseases*, p. 1100-1109, Mars 2014.
- [8] P. Aguilar Martiner, M. Angastiniotis, A. Eleftheriou, *et al.*, «Haemoglobinopathies in Europe: health & migration policy perspectives,» *Orphanet Journal of rare diseases*, vol. 9, n° 197, p. 2-7, Juil 2014.
- [9] N. Marchi, S. Pissard, M. Cliquennois, *et al.*, «Confirmation of a founder effect in a Northern European population of a new  $\beta$ -globin variant: HBB:c.23\_26dup (codons 8/9 (+AGAA)),» *European Journal of Human Genetics*, vol. 263, p. 1-3, Dec 2014.
- [10] D. J. Weatherall, «The definition and epidemiology of non-transfusion-dependent thalassemia,» *Blood reviews*, p. 3-6, 2012.
- [11] C. Badens, «Registre des patients thalassémiques en France,» 30 Nov 2004. [En ligne].  
[https://epidemiologie-france.aviesan.fr/epidemiologie-france/fiches/registre-des-patients-thalassemiques-en-france-registre-qualifie/fre-fr#tab\\_4](https://epidemiologie-france.aviesan.fr/epidemiologie-france/fiches/registre-des-patients-thalassemiques-en-france-registre-qualifie/fre-fr#tab_4). [Accès le 03 Janv 2015].
- [12] I. Thuret, «Prise en charge actuelle des thalassémies intermédiaires,» *Transfusion clinique et biologique*, vol. 21, n°14-5, p. 143-149, Nov 2014.
- [13] P. Joly, C. Pondarre et C. Badens, «Les bêta-thalassémies : aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques,» *Annales de biologie Clinique*, vol. 72, n°16, p. 639-668, Dec 2014.
- [14] V. Morice, «Protéine transporteuse : l'hémoglobine,» [En ligne].  
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/SFbioch/POLY.Chp.3.html>. [Accès le 13 Janv 2015].

- [15] J-P. Colin, «Rouge sang,» Dec 2010. [En ligne]. <http://svtcolin.blogspot.fr/2010/12/rouge-sang.html>. [Accès le 3 Janv 2015].
- [16] J. Barrère, «La famille multigénique des globines,» Mars 2005. [En ligne]. <http://aces.ens-lyon.fr/biotic/evolut/mecanismes/globines/html/synthese.htm>. [Accès le 12 Janv 2015].
- [17] N. Bonello-Palot et C. Badens, «Bases moléculaires des syndromes thalassémiques et facteurs génétiques modulateurs de sévérité de bêta-thalassémie,» *Revue méditerranéenne de génétique humaine*, vol. 1, n°11, p. 1-10, Avril 2010.
- [18] CHU Angers, «Métabolisme du fer chez l'homme,» Janv 2012. [En ligne]. <http://hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/43-metabolisme-du-fer-chez-lhomme>. [Accès le 10 Mai 2015].
- [19] J-C. Deybach, «Homéostasie du fer, Biosynthèse de l'hème et Porphyrines,» Inserm, Paris, 2012.
- [20] C. Désidéri-Vaillant, H. Galinat et J. Sapin-Lory, «Apport du dosage du récepteur soluble de la transferrine,» *Transfusion Clinique et Biologique*, vol. 18, n°12011, p. 36-39, 2011.
- [21] C. Beaumont et Z. Karim, «Actualité du métabolisme du fer,» *La Revue de médecine interne*, vol. 34, p. 17-25, 2013.
- [22] CHU Angers, «Erythroïèse,» Oct 2011. [En ligne]. <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/20-erythroiose>. [Accès le 15 Mars 2015].
- [23] C. Binet, «Erythroïèse : Cellules souches, morphologie, compartiments, régulation,» Tours, 2009.
- [24] B. Klein, «Cellules souches hématopoïétiques : biologie et applications cliniques,» Inserm, Montpellier, 2012.
- [25] D. J. Weatherall et S. Fucharoen, «The Hemoglobin E Thalassemias,» *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 2, n°18, p. 1-16, 2012.
- [26] M. Roussey, «Association Française pour le Dépistage et la Prévention des handicaps de l'Enfant,» Paris, 2011.
- [27] Orphanet, «Orphaschool - Transmission des maladies génétiques,» [En ligne]. <http://www.orpha.net/orphaschool/elearn1.htm>. [Accès le 17 Janvier 2015].
- [28] C. Badens, P. Joly, I. Agouti, *et al.*, «Variants in genetic modifiers of  $\beta$ -thalassemia can help to predict the major or intermedia type of the disease,» *Haematologica*, vol. 96, n°111, p. 1712–1714, nov 2011.
- [29] P. S. Rani et S. Vijayakumar, «Beta thalassemia, Mini review,» *International Journal of Pharmacology Research*, vol. 3, n°12, p. 71-79, 2013.
- [30] C. Borgna-Pignatti, «Modern treatment of thalassaemia intermedia,» *British Journal of haematology*, vol. 138, n°13, p. 291-304, 2007.

- [31] Université Lyon Sud, «Anémie,» 15 Mars 2012. [En ligne]. [http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/servlet/com.univ.collaboratif.utils.LectureFichier?ID\\_FICHIER=1320402929576](http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/servlet/com.univ.collaboratif.utils.LectureFichier?ID_FICHIER=1320402929576). [Accès le 17 Janv 2015].
- [32] C. Borgna-Pignatti, S. Rugolotto, P. De Stefano, *et al.*, «Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine,» *Haematologica*, vol. 89, n°110, p. 1187-1193, Oct 2004.
- [33] C. Barro, «Thalassémies (297a),» Faculté de Médecine, Grenoble, 2005.
- [34] Université, Angers, «Les syndromes thalassémiques,» 2011. [En ligne]. <http://hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/87-les-syndromes-thalassemiques>. [Accès le 10 Janv 2015].
- [35] S. Vulont, «L'hepcidine, la grande dame du fer,» *Actualités néphrologiques*, p. 223-227, 2006.
- [36] D. Ashby, D. Gale, M. Busbridge, *et al.*, «Erythropoietin Administration In Humans Causes A Marked And Prolonged Reduction In Circulating Hcpidin,» *Haematologica*, vol. 95, n°13, p. 505-508, Mars 2010.
- [37] I. Thuret, C. Pondarré et A. Loundou, «Complications And treatment of patients with  $\beta$ -Thalassemia in France: Results of the national registry,» *Haematologica*, vol. 95, n°15, p. 724-729, Mai 2010.
- [38] C. Poindarré, «Complications And Treatment Of Patients With B-Thalassemia In France: Results Of The National Registry,» *Haematologica*, vol. 95, p. 724-729, Mai 2010.
- [39] K. Musallam, M. Cappellini, J. Wood et A. Taher, «Iron overload in non-transfusion-dependent thalassemia: a clinical perspective,» *Blood review*, n°11, p. 16-19, 2012.
- [40] S. Swaminathan, V. Fonseca, M. G. Alam, *et al.*, «The role of iron in diabetes and its complications,» *Diabetes care*, vol. 30, n°17, p. 1926-1933, Mars 2007.
- [41] A. Aessopos, D. Farmakis, S. Deftereos, *et al.*, «Thalassemia heart disease : A comparative evaluation of thalassemia major and thalassemia intermedia,» *CHEST Journal*, vol. 127, n°15, p. 1523-1530, Mai 2005.
- [42] S. Z. Sayed, B. A. Aly, A. El-Hakim, *et al.*, «The early cardiac involvement in patients with  $\beta$ -thalassemia major,» *The egyptian heart journal*, vol. 65, n°13, p. 243-249, Sept 2013.
- [43] A. R. Cohen, R. Galanello, D. J. Pennell, *et al.*, «Thalassemia,» *American Society of Hematology*, p. 14-34, 2004.
- [44] S. Srihirun, N. Tanjararak et S. Chuncharunee, «Platelet hyperactivity in thalassemia patients with elevated tricuspid regurgitant velocity and the association with hemolysis,» *Thombosis research*, vol. 135, p. 121-126, Oct 2014.
- [45] M. Reza Safarinejad, «Evaluation of Semen Quality, Endocrine profile and hypothalamus-pituitary-testis axis in male patients with homozygous B thalassemia major,» *The journal of urology*, vol. 179, n°16, p. 2327-2332, Juin 2008.

- [46] A. Leen Ang, P. Tzoulis, E. Prescott, *et al.*, «History of myocardial iron loading is a strong risk factor for diabetes mellitus and hypogonadism in adult with beta thalassemia major,» *European journal of haematology*, vol. 92, n°13, p. 229-236, Fev 2014.
- [47] M. Vogiatzi G., E. Macklin, F. Trachtenber, *et al.*, «Differences in the prevalence of growth, endocrine and vitamin D abnormalities among the various thalassaemia syndromes in North America.,» *British Journal of Haematology*, vol. 146, n°15, p. 546-556, Juil 2009.
- [48] H. Al-Rimawi, M. Jallad, Z. Amarin et R. Al Sakaan, «Pubertal evaluation of adolescent boys with  $\beta$ -thalassemia major and delayed puberty,» *Fertility and Sterility*, vol. 86, n°14, p. 886-890, Oct 2006.
- [49] H. Al-Rimawi, M. Jallad, Z. Amarin, *et al.*, «Hypothalamic-pituitary-gonadaal function in adolescent females with beta-thalassemia major,» *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, vol. 90, n°11, p. 44-47, Mars 2005.
- [50] S. Tuck M., «Fertility and pregnancy in Thalassemia Major,» *Annals of the New-York Academy of sciences*, vol. 1054, p. 300-307, Janv 2006.
- [51] N. Angelopoulos, A. Goula, G. Rombopoulos, *et al.*, «Hypoparathyroidism in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia,» *Journal of bone and mineral metabolism*, vol. 24, p. 138-145, 2006.
- [52] R. Haidar, K. Musallam, A. Taher, *et al.*, «Bone disease and skeletal complications in patients with beta thalassemia major,» *Bone*, vol. 48, n°13, p. 425-432, 2011.
- [53] J. Bahram et S. Nasser, «Craniofacial manifestations of Beta-thalassemia major,» *Oral Surgery, Oral Medecine, Oral Pathology and Oral Radiology*, vol. 119, n°11, p. 33-40, Janv 2015.
- [54] D. Zafeiriou et M. Economou, «Neurologicals complications in beta-thalassemia,» *Brain and development*, vol. 28, n°18, p. 477-481, 2006.
- [55] P. Nemtsas, M. Amaoutoglou, V. Perifanis, *et al.*, «Neurological complications of beta-thalassemia,» *Annals of hematology*, vol. 94, n°18, p. 1261-1265, 2015.
- [56] G. Varlet, N. Oka, K. Drogba, *et al.*, «Bêta-thalassémie intermédiaire compliquée d'une compression médullaire.,» *Neurochirurgie*, vol. 56, n°14, p. 315-323, Avril 2010.
- [57] I. Panigrahi et S. Agarwal, «Thromboembolic complications in  $\beta$ -thalassemia : beyond the horizon,» *Thrombosis research*, vol. 120, n°16, p. 783-789, 2007.
- [58] A. Adly, D. Toaima, N. Mohamed, *et al.*, «Subclinical renal abnormalities in young thalassemia major and intermedia patients and its relation to chelation therapy,» *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, vol. 15, n°14, p. 369-377, Oct 2014.
- [59] P. Aguilar-Martinez et C. Badens, «Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies,» *Annales de Biologie Clinique*, vol. 68, n°14, p. 455-464, Juil-Aout 2010.
- [60] R. M. Al Haddad, «Molecular, biochemical and hematological investigations of beta-thalassemic in Gaza governorate,» Faculty of Science, Gaza, 2012.

- [61] A. H. Khelil, S. Laradi, N. Nabli, *et al.*, «Paramètres biochimiques chez les Béta-thalassémiques,» *Immuno-analyse & biologie spécialisée*, vol. 16, n° 15, pp. 317-320, Mai 2001.
- [62] T. Coman et L. Karlin, Cahiers des ECN: hématologie, oncohématologie, Paris: Elsevier Lemasson, 2011.
- [63] J. Barro et A. Casini, «Anémie,» Hôpitaux Universitaires de Genève, Genève, 2013.
- [64] D. Greene, C. Vaughn, B. Crews, *et al.*, «Advances in detection of hemoglobinopathies,» *Clinica Chimica Acta*, vol. 439, p. 50-57, Oct 2014.
- [65] N. Couque et M. De Montalembert, «Diagnostic d'une hémoglobinopathie,» *Feuillets de Biologie*, vol. 311, p. 5-18, Mars 2013.
- [66] I. Borde, «La PCR,» Mars 2006. [En ligne]. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/index.htm>. [Accès le 13 Fev 2015].
- [67] T. Prajantasen, S. Fucharoen et G. Fucharoen, «High resolution melting analytical platform for rapid prenatal and postnatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia common among Southeast Asian population,» *Clinica Chimica Acta*, vol. 441, p. 56-62, Dec 2015.
- [68] HAS, «Dépistage néonatal de la drépanocytose en france - Rapport d'orientation,» Saint Denis, 2013.
- [69] A. Z. Al-Riyami, S. Al-Mahrooqi, S. Al-Hinai, *et al.*, «Transfusion therapy and alloimmunization in Thalassemia Intermedia : A 10 year experience at a tertiary care university hospital,» *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 51, n°11, p. 42-46, 2014.
- [70] A. Taher, A. Radwan et V. Viprakasit, «When to consider transfusion therapy for patients with non-transfusion-dependent thalassaemia,» *Vox Sanguinis*, vol. 108, n°11, p. 1-10, Janv 2015.
- [71] M. Tazerout, «Manuel d'aide à la formation en transfusion sanguine,» Coordination Régionale d'Hémovigilance, Toulouse, 2008.
- [72] Société Française d'Hématologie, «Transfusion sanguine et produits dérivés du sang, indications, complications. Hémovigilance,» Mai 2006. [En ligne]. [http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle\\_2/MIB/ECN/Hemato/178\\_UMVF-TransfusionSanguine.pdf](http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_2/MIB/ECN/Hemato/178_UMVF-TransfusionSanguine.pdf). [Accès le 25 Mars 2015].
- [73] Tout sur la Transfusion, «Risques Résiduels,» 2010. [En ligne]. <http://www.toutsurlatransfusion.com/transfusion-sanguine/transfusion/risques-residuels-transfusions.php>. [Accès le 26 Mars 2015].
- [74] HAS & ANSM, «Recommandation de bonnes pratiques : Transfusions de globules rouges homologues: produits, indications alternatives,» Saint Denis la Plaine, 2014.
- [75] N. Ben Salah, W. El Borgi, F. Ben Lakhal, *et al.*, «Immunisation anti-érythrocytaire et anti-HLA au cours des hémoglobinopathies,» *Transfusion clinique et biologique*, vol. 21, n°14, p. 314-319, Oct 2014.
- [76] B.-N. Pham, P.-Y. Le Pennec, P. Rouger, *et al.*, «Allo-immunisation anti-érythrocytaire,» *Transfusion Clinique et Biologique*, vol. 19, n°16, p. 321-332, Dec 2012.

- [77] A. Ronson et C. Hershko, «Les progrès dans le traitement chélateur du fer,» *Hématologie*, vol. 14, n°15, p. 378-384, Oct 2008.
- [78] R. Girot, I. Hagège, J.-F. Deux, *et al.*, «Traitement de la surcharge en fer dans les maladies hématologiques (hémochromatoses héréditaires exclues),» *Hématologie*, vol. 12, n°13, p. 181-193, 2006.
- [79] M. Ruivard, «Les chélateurs du fer : quand et comment les utiliser chez l'adulte ?,» *La Revue de médecine interne*, vol. 34, p. 32-38, 2013.
- [80] Novartis Pharmaceuticals, «Deferoxamine mesylate for injection,» FDA, Stein, 2011.
- [81] Novartis Pharma SAS, «Résumé des caractéristiques du produit,» Mars 2013. [En ligne]. <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0220039.htm>. [Accès le 05 Avril 2015].
- [82] A. Fazary, «Deferoxamine B from *Streptomyces pilosus*; Bioproduction, Characterization, Complexation, and Biodegradation Studies,» *Bioengineering Conference Proceeding*, vol. 95, n°15, p. 87-93, Nov 2014.
- [83] M. Sooriyaarachchia et J. Gailer, «Removal of Fe<sup>3+</sup> and Zn<sup>2+</sup> from plasma metalloproteins by iron chelating therapeutics depicted with SEC-ICP-AES,» *Dalton transaction*, vol. 32, n° 139, p. 7466-7473, Mai 2010.
- [84] O. Bausset, C. Darles, J.-B. Morvan, *et al.*, «Mucormycose rhino-cérébral à *Rhizopus oryzae* : à propos d'un cas,» *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*, vol. 26, n°12, p. 82-86, Avril 2011.
- [85] W. Cheng-Hsiu, *et al.*, «Deferoxamine retinopathy: spectral domain-optical coherence tomography findings,» *BMC Ophthalmology*, Juin 2014.
- [86] Apotex Europe, «Annexe1 - Résumé des caractéristiques du produit,» Aout 2009. [En ligne]. [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000236/WC500022050.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000236/WC500022050.pdf). [Accès le 05 avril 2015].
- [87] Novartis pharma SAS, «Annexe 1 - Résumé des caractéristiques du produit - Exjade,» Aout 2011. [En ligne]. [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000670/WC500033925.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000670/WC500033925.pdf). [Accès le 10 Janv 2015].
- [88] Toronto research chemicals inc, «Products for innovativ research,» 2014. [En ligne]. <http://www.trc-canada.com/Structures/D228670.png>. [Accès le 26 avril 2015].
- [89] N. Arandi, S. Haghpanah, S. Safaei, *et al.*, «Combination therapy - deferasirox and deferoxamine - in thalassemia major patients in emerging countries with limited resources,» *Official journal of the british blood transfusion society*, vol. 25, n°11, p. 8-12, Mars 2015.
- [90] A. Lal, J. Porter, N. Sweeters, *et al.*, «Combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in thalassemia,» *Blood cells, molecules and diseases*, vol. 50, n°12, p. 99-104, Fev 2013.
- [91] E. Voskaridou, D. Christoulas et E. Terpos, «Successful chelation therapy with the combination of deferasirox and deferiprone in a patient with thalassemia major and persisting severe iron overload after single-agent chelation therapies,» *British Journal of Haematology*, vol. 154, n°15, p. 654-656, Mai 2011.

- [92] S. Fisher, S. Brunskill, C. Doree, *et al.*, «La déféroxamine mésilate ( déféroxamine) pour la prise en charge de l'excès de fer dans le sang des personnes atteintes de thalassémie qui dépendent de transfusions sanguines,» *Cystic fibrosis and genetic disorders group*, vol. 8, p. 1-98, Aout 2013.
- [93] HAS, «HAS - Commission de la transparence,» 05 Mars 2011. [En ligne]. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-04/desferal\\_-\\_ct-9759.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-04/desferal_-_ct-9759.pdf). [Accès le 13 Avril 2015].
- [94] Inserm, «Orphanet - Liste des médicaments orphelins,» 2015 Avril. [En ligne]. [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Drugs\\_ListOrphanDrugs\\_List.php?lng=FR&TAG=D](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Drugs_ListOrphanDrugs_List.php?lng=FR&TAG=D). [Accès le 10 Avril 2015].
- [95] EMA, «Résumé EPAR à l'intention du public - Exjade,» Janv 2013. [En ligne]. [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000670/WC500033927.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000670/WC500033927.pdf). [Accès le 09 Avril 2015].
- [96] M. Touati et D. Bordessoule, «Les surcharges en fer dans les hémopathies,» Hématolim, Limoges, 2012.
- [97] D. Guyader, «Quantification de la surcharge en fer,» *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive*, vol. 6, n°15, p. 363-369, 1999.
- [98] Novartis Oncology, «Dosage du fer : concentration hépatique en fer,» Janv 2015. [En ligne]. <http://www.ironhealthalliance.com/fr/disease-states/thalassemia/iron-loading-measurement/liver-iron-concentration.jsp>. [Accès le 15 Juin 2015].
- [99] A. Quatre, A. Jacquier, P. Petit, *et al.*, «Surveillance de la surcharge en fer myocardique par IRM : utilisation de l'IRM cardiaque combinée à l'IRM hépatique dans une cohorte de patients thalassémiques polytransfusés,» *Journal de Radiologie Diagnostique et Interventionnelle*, vol. 95, n°111, p. 1055-1059, Nov 2014.
- [100] T. Ferry, «Journée en Traumatologie - Prévention des infections après splénectomie,» Université de Lyon, Lyon, 2014.
- [101] EMA, «Annexe 1 - Résumé des caractéristiques du produit - Siklos,» 27 Mai 2014. [En ligne]. [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000689/WC500050503.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000689/WC500050503.pdf). [Accès le 15 Avril 2015].
- [102] Bristol-Meyers Squibb, «Résumé des caractéristiques du produit - Hydréa,» 06 Oct 2010. [En ligne]. <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0185534.htm>. [Accès le 15 Avril 2015].
- [103] F. Pourfarzad, M. Von Lindern, A. Azazkeivan, *et al.*, «Hydroxyurea responsiveness in B-thalassemic patients is determined by the stress response adaptation of erythroid progenitors and their differentiation propensity,» *Haematologica*, vol. 98, n°15, p. 696-704, 2013.
- [104] D. Grunig Humberto Silva, «Genetic and biochemical markers of hydroxyurea therapeutic response in sickle cell anemia,» *BMS Medical Genetics*, vol. 108, n°114, p. 1471, Oct 2013.
- [105] Académie nationale de pharmacie, «Hydroxycarbamide,» Sept 2014. [En ligne]. <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Hydroxycarbamide>. [Accès le 10 Avril 2015].
- [106] AddMédica, «Siklos - Guide d'information destiné au corps médical,» Action d'éclat, Paris, 2012.

- [107] AMGEN; Société de Leucémie et Lymphome du Canada, «Greffe de cellules souches du sang et de la moelle osseuse,» 2008. [En ligne].  
[https://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/french/pdf/fr\\_bloodmarrowstemcelltransplantation.pdf](https://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/french/pdf/fr_bloodmarrowstemcelltransplantation.pdf). [Accès le 23 Mai 2015].
- [108] V. Jagannath, Z. Fedorowicz, A. Al Hajeri, *et al.*, «Hematopoietic stem cell transplantation for people with  $\beta$ -thalassaemia (review),» *The Cochrane Library*, vol. 10, p. 1-14, 2014.
- [109] Centre de référence des Thalassémies et SFGM-TC, «Recommandations pour les greffes de cellules souches hématopoiétiques dans les béta-thalassémies,» Sept 2011. [En ligne]. [http://www.chu-lyon.fr/web/attached\\_file/Recommandations%20doc%20final%20oct%202011.pdf?ComponentId=kmelia16&attachmentId=17466](http://www.chu-lyon.fr/web/attached_file/Recommandations%20doc%20final%20oct%202011.pdf?ComponentId=kmelia16&attachmentId=17466). [Accès le 15 Mai 2015].
- [110] R. Houot et K. Tarte, «Greffe de CSH: aspects biologiques et cliniques,» Rennes, 2014.
- [111] Pierre Fabre Médicament, «Résumé des caractéristiques du produit - Busulfan,» Sept 2014. [En ligne].  
[http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000472/WC500052066.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000472/WC500052066.pdf). [Accès le 24 Avril 2015].
- [112] J. Heron, «Cyclophosphamide,» Aout 2010. [En ligne].  
[http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09\\_Chimiotherapie/Complements/g09\\_comp15.php](http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/Complements/g09_comp15.php). [Accès le 25 Avril 2015].
- [113] S. Bertocci, «Aplasie médullaire idiopathique et traitement par thymoglobuline - Symposium Genzyme,» Avril 2007. [En ligne]. <http://www.hematologie-dz.com/online/index.php?page=liens-utiles>. [Accès le 25 Avril 2015].
- [114] Faculté de Médecine Montpellier - Nîmes, «Immunité adaptative : structures reconnues (CMH et Antigènes),» 2007. [En ligne]. [http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle\\_1/PCEM2/mod-base/MB7\\_Bio\\_Med/Ressources\\_locales/IMMUNO/I5-CMH\\_et\\_AG\\_v2.pdf](http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-base/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/IMMUNO/I5-CMH_et_AG_v2.pdf). [Accès le 10 Mai 2015].
- [115] S. Pisu, «Reassessing the approach to informed consent: the case of unrelated hematopoietic stem cell transplantation in adult thalassemia patients,» *Philosophy, Ethics, and humanities in medicine.*, vol. 9, n°11, p. 9-13, Aout 2014.
- [116] Novartis Pharma S.A.S, «Résumé des caractéristiques du produit - Néoral,» Sept 2011. [En ligne].  
<http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0197414.htm>. [Accès le 25 Avril 2015].
- [117] Vidal, «DEFITELIO 80 mg/ml sol conc à diluer p perf,» Mars 2015. [En ligne].  
<http://www.vidal.fr/Medicament/defitelio-135808-pharmacodynamie.htm>. [Accès le 24 04 2015].
- [118] S. Gardenghi, «Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in  $\beta$ -thalassemic mice,» *The journal of Clinical Investigation*, vol. 120, n°112, p. 4466-4477, Dec 2010.
- [119] M. L. Ould Salem, M. Ould Mouloud, S. Ould Ghaber, *et al.*, «L'hepcidine : état actuel de nos connaissances,» *Revue francophone des laboratoires*, n°1429, p. 47-50, Fev 2011.
- [120] L. Rochette, A. Gudjoncik, C. Guenancian, *et al.*, «The iron-regulatory hormone hepcidin : a possible therapeutic target,» *Pharmacology&Therapeutics*, vol. 146, n°14, p. 35-52, 2015.

- [121] L. Viatte et S. Vaulont, «L'hepcidine, une histoire de fer au coeur du foie,» *Hématologie*, vol. 13, n°13, p. 165-176, 2007.
- [122] S. Vaulont et D. Labie, «Les beta-thalassémies, espoirs thérapeutiques de l'hepcidine,» *Médecine science*, vol. 27, n°15, p. 473-475, Mai 2011.
- [123] G. C. Preza, P. Ruchala, R. Pinon, *et al.*, «Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload,» *The journal of clinical investigation*, vol. 121, n°112, p. 4880-4888, Nov 2011.
- [124] J. Arezes et E. Nemeth, «Hepcidin and iron disorders: new biology and clinical approaches,» *International Journal of Laboratory Hematology*, vol. 37, n°11, p. 92-98, Mars 2015.
- [125] P. Ruchala et E. Nemeth, «The pathophysiology and pharmacology of hepcidin,» *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 35, n°13, p. 155-161, Mars 2014.
- [126] E. Ramos, P. Ruchala, J. Goodnough, *et al.*, «Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis,» *Blood*, vol. 120, n°118, p. 3829 - 3836, Nov 2012.
- [127] S. Guo, C. Casu, S. Gardenghi, *et al.*, «Reducing TMPRSS6 ameliorates hemochromatosis and  $\beta$ -thalassemia in mice,» *The journal of the clinical investigation*, vol. 123, n°14, p. 1531-1541, Avril 2013.
- [128] P. J. Schmidt, I. Toudjarska, A. Sendamarai, *et al.*, «An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe $^{-/-}$  mice and ameliorates anemia and iron overload in murine  $\beta$ -thalassemia intermedia,» *Blood*, vol. 121, n°17, p. 1200-1208, Fev 2013.
- [129] P. J. Schmidt, T. Racie, M. Westerman, *et al.*, «Combination therapy with a Tmprss6 RNAi-therapeutic and the oral iron chelator deferiprone additively diminishes secondary iron overload in a mouse model of beta-thalassemia intermedia,» *American Journal of Hematology*, vol. 90, n°14, p. 310-313, Avril 2015.
- [130] A. Zhen, N. Nguyen, Y. Gibert, *et al.*, «The small molecule, genistein, increases hepcidin expression in human hepatocytes,» *Hepatology*, vol. 58, n°14, p. 1315-1325, 2013.
- [131] V. Gaun, B. Patchen, J. Volovetz, *et al.*, «A chemical screen identifies small molecules that regulate hepcidin expression,» *Blood Cells, Molecules and Diseases*, vol. 53, n°14, p. 213-240, Mars 2014.
- [132] L. Kautz, G. Jung, E. Valore, *et al.*, «Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism,» *Nature genetics*, vol. 46, n°17, p. 678-684, 2014.
- [133] D. Labie, «L'érythroferrone, un régulateur de l'homéostasie du fer,» *Hématologie*, vol. 20, n°14, p. 198-199, Aout 2014.
- [134] COI Pharmaceuticals inc., «Silarus therapeutics,» Sept 2014. [En ligne]. <http://www.coipharma.com/portfolio/silarus/>. [Accès le 16 mai 2015].
- [135] R. Hider, «Recent developments centered on rally active iron chelators,» *Thalassemia reports*, vol. 4, n°12, p. 19-27, Mars 2014.

- [136] R. Bergeron, J. Wiegand, J. McManis, *et al.*, «Desferrithiocin: A search for clinically effective iron chelators,» *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 55, n°122, p. 9259-9291, Sept 2014.
- [137] Genzyme, «Iron Balance Study of DFO and GT56-252 in Patients With Transfusional Iron Overload Secondary to Beta-Thalassemia,» Mai 2015. [En ligne]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00069862?term=gt56-252&rank=1>. [Accès le 10 Mai 2015].
- [138] R. C. Hider, X. Kong, V. Abbate, *et al.*, «Deferitazole, a new orally active iron chelator,» *The Royal Society of Chemistry*, vol. 44, p. 5197-5204, Fev 2015.
- [139] Sideris Pharmaceuticals, «Safety and Pharmacokinetic Study of Escalating Doses of SP-420, an Iron Chelator, in Patients With  $\beta$ -Thalassemia,» Fev 2015. [En ligne]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02274233?term=sp420&rank=1>. [Accès le 15 Mai 2015].
- [140] S. Rivella, «Beta-Thalassemias : paradigmatic diseases for scientific discoveries and development of innovative therapies,» *Haematologica*, vol. 100, n°14, p. 418-428, Janv 2015.
- [141] H. Li, A. Rybicky, S. Szuka, *et al.*, «Transferrin therapy ameliorates disease in  $\beta$ -thalassemic mice,» *Nature medicine*, vol. 16, p. 177–182, Janv 2010.
- [142] M. Mastrogianaki, P. Matak, C. Peyssonnaud, *et al.*, «The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions,» *Blood journal*, vol. 122, n°16, p. 885-893, Aout 2013.
- [143] E. Anderson, M. Taylor, S. Ramakrishnan, *et al.*, «Intestinal HIF2alpha promotes tissue-iron accumulation in disorders of iron overload with anemia,» *Proceeding of the National Academy of sciences of the USA*, vol. 110, n°150, p. 4922-4930, Dec 2013.
- [144] L. Breda et S. Rivella, «Modulators of Erythropoiesis: Emerging Therapies for Hemoglobinopathies and Disorders of Red Cell Production,» *Hematology/Oncology Clinics of North America*, vol. 28, n°12, p. 375-386, 2014.
- [145] Novartis Pharmaceuticals, «Study of Efficacy and Safety of INC424 in Regularly Transfused Patients With Thalassemia,» 25 Avril 2015. [En ligne]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02049450?term=jak+2+thalassemia&rank=1>. [Accès le 20 Mai 2015].
- [146] HAS, «Commission de la transparence - Jakavi - Avis,» 9 Janv 2013. [En ligne]. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-02/jakavi\\_ins\\_\\_avis2\\_ct12530.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-02/jakavi_ins__avis2_ct12530.pdf). [Accès le 26 Mai 2015].
- [147] M. Dussiot, T. Maciel, A. Fricot, *et al.*, «An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in Beta-Thalassemia,» *Nature Medicine*, vol. 20, p. 398-407, Mars 2014.
- [148] Celgene Corporation et Acceleron Pharma Inc, «Présentation, à l'occasion du 19ème congrès annuel de l'Association européenne d'hématologie, d'études évaluant des programmes de pièges à ligands pour le récepteur de l'activine visant à traiter la bêta-thalassémie,» European Hematology Association Congress, Milan, 2014.

- [149] L. Breda et S. Rivella, «Modulators of erythropoiesis : Emerging therapies for hemoglobinopathies and disorders of Red Cell Production,» *Hematology Oncology Clinical North America*, vol. 28, n°12, p. 375-386, Avril 2014.
- [150] R. F. Paulson, «Targeting a new regulator of erythropoiesis to alleviate anemia,» *Nature Medicine*, vol. 20, p. 334-335, Avril 2014.
- [151] Celgene Corporation, «Study to Determine the Safety and Tolerability of Sotatercept (ACE-011) in Adults With Beta(  $\beta$ )-Thalassemia,» Sept 2014. [En ligne].  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01571635?term=ACE-011+thalassemia&rank=1>. [Accès le 21 Mai 2015].
- [152] G. Courtois, «Du nouveau sur l'anémie des thalassémies,» Nov 2014. [En ligne].  
<http://www.cnrs.fr/insb/recherche/parutions/articles2014/g-courtois.html>. [Accès le 22 Mai 2015].
- [153] Acceleron Pharma, Inc, «ACE-536 Extension Study - Beta Thalassemia,» Nov 2014. [En ligne].  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02268409?term=ACE-536+Extension+Study+-+Beta+Thalassemia&rank=1>. [Accès le Mai 2015].
- [154] R. N. Suragani, S. Cadena, S. Cawley, *et al.*, «Transforming growth factor-B superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis,» *Nature Medicine*, vol. 20, p. 408414, Mars 2014.
- [155] J-B. Arlet, J-A. Ribeil, F. Guillem, *et al.*, «HSP70 sequestration by free  $\alpha$ -globin promotes ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassaemia,» *Nature*, vol. 514, p. 242-246, Oct 2014.
- [156] J-B. Arlet, «Rôle de la chaperonne HSP70 dans l'érythropoïèse inefficace des béta-thalassémies majeures,» Université Paris XI - Thèse, Paris, 2013.
- [157] J.-B. Arlet, «Rôle d'HSP70 dans l'érythropoïèse inefficace des  $\beta$ -thalassémies majeures,» *Médecine/Sciences*, vol. 31, p. 9-11, Fev 2015.
- [158] A. Dong, S. Rivella et L. Breda, «Gene therapy for hemoglobinopathies: progress and challenges,» *Translational research*, vol. 161, n°14, p. 293-306, Avril 2013.
- [159] E. Payen et B. Leboulch, «Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the B-hemoglobinopathies,» *American Society of Haematology*, vol. 2012, p. 276-283, 2012.
- [160] G. Querat, «Cours de vecteurs non réplicatif,» Marseilles, 2004.
- [161] P. Arumugam et P. Malik, «Genetic therapy for beta-thalassemia: from the bench to the bedside,» *American society of Hematology*, vol. 2010, p. 445-450, 2010.
- [162] E. Payen, C. Colomb, O. Negre, *et al.*, *Methods in Enzymology*, vol. 507, Fontenay aux Roses: Elsevier, 2012, p. 110-122.
- [163] O. Negre, C. Bartholomae, Y. Beuzard, *et al.*, «Preclinical evaluation of efficacy and safety of an improved lentiviral vector for the treatment of  $\beta$ -Thalassemia and Sickle Cell Disease,» *Current gene therapy*, vol. 15, n°11, p. 64-81, Fev 2015.

- [164] D. Larroque, M. Vandermersch et C. Gaiffier, «CEA-iMETI : des maladies émergentes aux thérapies innovantes,» 2008. [En ligne]. <http://www.cea.fr/content/download/5452/35621/file/Maladies-emergentes-cea-juin-2008.pdf>. [Accès le 30 Mai 2015].
- [165] V. Morice, «Chapitre 2 - Génétique bactérienne,» Mai 2003. [En ligne]. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.2.2.3.html>. [Accès le 10 Juin 2015].
- [166] K. Sanber S., S. K. Knight, S. L. Stephen, *et al.*, «Construction of stable packaging cell lines for clinical lentiviral vector production,» *Scientific reports*, vol. 5, n°19021, p. 1-10, Mars 2015.
- [167] R. Kutner et X. Zhang, «Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors,» *Nature Protocol*, vol. 4, n°14, p. 495-505, 2009.
- [168] L. Amar, «Développement de vecteurs lentiviraux régulables pour le transfert de gène dans le Système Nerveux Central,» Thèse Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2007.
- [169] Bluebirdbio, «What is gene therapy,» Janv 2012. [En ligne]. <http://www.bluebirdbio.com/patients-families/gene-therapy/>. [Accès le 30 Mai 2015].
- [170] A. Finotti, L. Breda, C. W. Lederer, *et al.*, «Recent trends in the gene therapy of  $\beta$ -thalassemia,» *Journal of blood medicine*, vol. 6, p. 69-85, Fev 2015.
- [171] A. Bank A, R. Dorazio, P. Leboulch, *et al.*, «A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia,» *Annals of the New-York academy of Sciences*, vol. 1054, p. 3008-316, Nov 2005.
- [172] M. Cavazzana-Calvo, E. Payen, O. Negre, *et al.*, «Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia,» *Nature*, vol. 16, n°1467, p. 318-322, Sept 2010.
- [173] A. Morishita, M. Zaidi MR, A. Mitoro, *et al.*, «HMGA2 is a driver of tumor metastasis,» *Cancer research*, vol. 73, n°114, p. 4289-4299, Juil 2013.
- [174] M. Cavazzana, J. Ribeil, E. Payen, *et al.*, «Outcomes of Gene Therapy for beta-thalassemia major via transplantation of autologous hematopoietic stem cells transduced ex vivo with a Lentiviral A-T87Q-Globin Vector,» 19th European Hematology Association Congress, Milan, 2014.
- [175] Bluebirdbio, «A study evaluating the safety and efficacy of the LentiGlobin® BB305 drug product in Beta-Thalassemia major subjects,» Mai 2015. [En ligne]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01745120?term=lentiviral+vector+thalassemia&rank=3>. [Accès le 22 Juin 2015].
- [176] Bluebirdbio, «A study evaluating the efficacy and safety of LentiGlobin BB305 drug product in Beta-Thalassemia major and Sickle Cell Disease,» Janvier 2015. [En ligne]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02151526?term=bb305&rank=3>. [Accès le 22 Juin 2015].
- [177] Bluebirdbio, «Data demonstrating first four patients with  $\beta$ -Thalassemia major treated with LentiGlobin™ are transfusion-free,» 56th Annual meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, 2014.
- [178] Bluebirdbio, «New Beta-thalassemia major and severe Sickle Cell Disease data from HGB-205 study at EHA,» 20th Congress of the European Hematology Association, Vienne, 2015 juin.

- [179] Bluebirdbio, «First two patients in the HGB-205 Study achieved transfusion independence within two weeks of an autologous transplant with bluebird's lentiviral gene therapy,» 19th Annual Congress of the European Hematology Association, Milan, 2014 juin.
- [180] Memorial Sloan Kettering Cancer Center, « $\beta$ -Thalassemia major with autologous CD34+ hematopoietic progenitor cells transduced with TNS9.3.55 a Lentiviral Vector Encoding the Normal Human  $\beta$ -Globin Gene,» Juillet 2012. [En ligne].  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01639690?term=gene+therapy+thalassemia&rank=8>. [Accès le 22 Juin 2015].
- [181] F. Boulad, X. Wang, J. Qu, *et al.*, «Safe mobilization of CD34+ cells in adults with  $\beta$ -thalassemia and validation of effective globin gene transfer for clinical investigation,» *Journal of the American Society of Hematology*, vol. 123, n°110, p. 1482-1486, 2014.
- [182] I. Riviere, W. Xiuya, F. Boulad, *et al.*, «First US Phase I Clinical trial of globin gene transfer For the treatment of Beta-Thalassemia major,» *Blood Journal*, vol. 122, n°121, p. 716, Nov 2013.
- [183] Vidal, «Filgrastim,» 16 Janv 2013. [En ligne].  
<http://www.vidal.fr/substances/1493/filgrastim/>. [Accès le 23 Juin 2015].
- [184] IRCCS San Raffaele, «Gene Therapy for Transfusion Dependent Beta-thalassemia (TIGET-BTHAL),» 9 Juin 2015. [En ligne].  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02453477?term=gene+therapy+thalassemia&rank=1>. [Accès le 22 Juin 2015].
- [185] E. A. Roselli, R. Mezzadra, M. Frittoli, *et al.*, «Correction of  $\beta$ -thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients,» *EMBO Molecular Medecine*, vol. 2, n°18, p. 315-328, Aout 2010.
- [186] A. M. Miccio, R. Cesari, F. Lot, *et al.*, «In vivo selection of genetically modified erythroblastic progenitors leads to long-term correction of  $\beta$ -thalassemia,» *Proceeding of National Academy of Sciences of USA*, vol. 105, n°130, p. 10547–10552, Juil 2008.
- [187] A. Dong, L. Breda et S. Rivella, «Chap.12 Gene Therapy for Hemoglobinopathies: Progress and Challenges,» chez *Translating Gene Therapy to the Clinic*, New York, Elsevier, 2015, p. 191-206.
- [188] M. Girard, «Cellules pluripotentes induites (IPS),» Fev 2013. [En ligne].  
<http://www.inserm.fr/thematiques/biologie-cellulaire-developpement-et-evolution/dossiers-d-information/cellules-pluripotentes-induites-ips>. [Accès le 22 Juin 2015].
- [189] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, *et al.*, «Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by defined factors,» *Cell*, vol. 131, p. 861-872, Nov 2007.
- [190] M. G. Angelos, F. Kidway, D. S. Kaufman, *et al.*, «Chapter 2 – Pluripotent Stem Cells and Gene Therapy,» chez *Translating Gene Therapy to the Clinic*, New-York, Elsevier, 2015, p. 11-26.
- [191] E. Sirinathsinghji, «La promesse des cellules souches pluripotentes induites,» Institute of Science in Society, Molégès, 2011.

- [192] Y. Fan, Y. Luo, X. Chen, Q. Li, *et al.*, «Generation of human  $\beta$ -thalassemia induced pluripotent stem cells from amniotic fluid cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette.,» *Journal of Reproduction and Development*, vol. 58, n°14, p. 404-409, 2012.
- [193] C. Zuccato, L. Breda, F. Salvatori, *et al.*, «A combined approach for  $\beta$ -thalassemia based on gene therapy-mediated adult hemoglobin (HbA) production and fetal hemoglobin (HbF) induction,» *Annals of hematology*, vol. 91, n°18, p. 1201-1213, Mars 2012.
- [194] N. Ma, B. Liao, L. Wang, *et al.*, «Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free  $\beta$ -thalassemia induced pluripotent stem cells,» *The journal of biological chemistry*, vol. 288, n°148, p. 34671-34679, Nov 2013.
- [195] F. C. Emengaha, J. Nnodim, O. Hope, *et al.*, «Gene therapy in the developing countries,» *International Journal of Medical and Health Sciences Research*, vol. 2, n°15, p. 80-92, 2015.
- [196] G. Karponi, N. Psatha, C. W. Lederer, *et al.*, «Plerixafor+G-CSF-mobilized CD34+ cells represent an optimal graft source for thalassemia gene therapy,» *American Society of Hematology*, n°12015, p. 1-15, Juin 2015.
- [197] Agence de la Biomédecine, «Rapport annuel,» Saint-Denis, 2013.
- [198] Comité directeur pour la bioéthique, «Document de base sur le diagnostic préimplantatoire et prénatal,» Strasbourg, 2011.
- [199] P. Malzac, «Apport du conseil génétique dans la prise en charge des pathologies constitutionnelles du globule rouge,» *Revue Française des laboratoires*, n°1324, p. 63-66, Juin-Juil 2000.
- [200] F. Lamazou, J. Steffann et N. Frydman, «Diagnostic préimplantatoire avec typage HLA : naissance du premier enfant du double espoir en France,» *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*, vol. 40, n°17, p. 682-686, Aout 2011.
- [201] P. Gosset et C. Moutou, «Aperçu du diagnostic préimplantatoire actuel en France,» *Revue médicale périnatale*, vol. 4, n°12, p. 53-60, Avril 2012.
- [202] F. Lamazou, Interviewee, *On l'appelle Double Espoir*. [Interview]. 10 Février 2011.
- [203] CHU Toulouse, «La fécondation in vitro (FIV),» 24 Janv 2005. [En ligne]. <http://www.chu-toulouse.fr/-la-fecondation-in-vitro-fiv->. [Accès le 8 Juin 2015].
- [204] P. Barrière et C. Le Caignec, «Le cycle de DPI proprement dit,» 06 Dec 2013. [En ligne]. <http://www.chu-nantes.fr/deroulement-du-dpi-3-le-cycle-de-dpi-proprement-dit-46369.kjsp>. [Accès le 05 Juin 2015].
- [205] J. Plouchart, «Association FIV France,» 17 Mai 2015. [En ligne]. [http://www.fivfrance.com/page\\_embryonqualite.html](http://www.fivfrance.com/page_embryonqualite.html). [Accès le 10 Juin 2015].
- [206] Clinique Ghandi, «Stimulation ovarienne,» Avril 2013. [En ligne]. <http://www.ghandifiv.com/a/deroulement-pma/protocoles-stimulation>. [Accès le 07 Juin 2015].
- [207] Institut Européen de Bioéthique, «Le diagnostic prénatal et pré-implantatoire,» Bruxelles, 2012.

- [208] J. Cousineau et A. Decroix, «Diagnostic préimplantatoire et eugénisme : l'argument de la pente glissante,» *Revue de Droit de l'Université de Sherbrooke*, vol. 41, p. 50-82, 2011.
- [209] C. Brochier, P-O. Arduin et P. De Diesbach, «Le 'bébé médicament' - Dossiers de l'Institut Européen de Bioéthique,» Bruxelles, 2005.
- [210] Direction de l'information légale et administrative, «Glossaire de vie publique - Bioéthique,» 05 Mai 2014. [En ligne]. <http://www.vie-publique.fr/th/glossaire/bioethique.html>. [Accès le 10 Juin 2015].
- [211] G. Durand, Introduction générale à la bioéthique, Montréal: Fides, 2005, p. 10-15.
- [212] J. R. Goldim, «Genetics and ethics: a possible and necessary dialogue,» *Journal of community genetics*, vol. 2015, n°16, p. 232-236, Mai 2015.
- [213] Unesco, «Comité international de bioéthique (CIB),» 1 Janv 2015. [En ligne]. <http://www.unesco.org/new/fr/social-and-human-sciences/themes/bioethics/international-bioethics-committee/>. [Accès le 10 Juin 2015].
- [214] CCNE, «Avis 072 : Réflexion sur l'extension du diagnostic pré-implantatoire,» Paris, 2002.
- [215] Y. Eudes, «La clinique des bébés sur mesure,» *Le Monde Magazine*, Juillet 2010.
- [216] Conseil d'Etat, «La révision des lois de Bioéthiques,» Paris, 2009.
- [217] M. Couvert, «"Bébé-médicament" ou "Bébé du double espoir" : le double diagnostic pré-implantatoire et ses conséquences,» Ecole Universitaire de maeutique - Thèse, Marseille, 2013.
- [218] P. Bonte, «Is there a moral obligation to conceive children under the best possible conditions? A preliminary framework for identifying the preconception responsibilities of potential parents,» *BMC Medical Ethic*, vol. 15, n°15, p. 1472, Janv 2014.
- [219] Assemblée Nationale et Sénat, «Loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique,» 07 Juil 2011. [En ligne]. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000024323102>. [Accès le 11 Juin 2015].
- [220] B. Vallet, «Arrêté du 1er juin 2015 déterminant les recommandations de bonnes pratiques relatives aux modalités d'accès, de prise en charge des femmes enceintes et des couples, d'organisation et de fonctionnement des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal,» 1 Juin 2015. [En ligne]. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000030707965>. [Accès le 16 Juin 2015].
- [221] Sénat et A. Milon, «Projet de loi relatif à la bioéthique,» Paris, 2011.
- [222] CCNE, «Avis n°107 : Avis sur les problèmes éthiques liés aux diagnostics anténatals :le diagnostic prénatal (DPN) et le diagnostic préimplantatoire (DPI),» Paris, 2009.
- [223] CCNE, «Utilisation des cellules souches issues du sang de cordon ombilical, du cordon lui-même et du placenta et leur conservation en biobanques. Questionnements éthiques.,» Paris, 2012.

- [224] I. Thuret et C. Pondarre, «Centre de référence Maladies Rares des Thalassémies - Rapport d'activités,» Marseilles, 2011.
- [225] M. D. Cappellini, V. Viprakasit et A. T. Taher, «An overview of current treatment strategies for beta-thalassemia,» *Expert opinion on orphan drug*, vol. 2, n°17, p. 665-679, 2014.
- [226] W.-L. Ho, «A pharmaco-economic evaluation of deferasirox for treating patients with iron overload caused by transfusion-dependent thalassemia in Taiwan,» *Journal of the Formosan Medical Association*, vol. 112, p. 221-229, 2013.
- [227] Agence de Biomédecine, «Le rapport médical et scientifique de l'agence de biomédecine,» Saint-Denis, 2013.

## **ANNEXES**

Annexe 1: Fiche de suivi du patient [224]

DATE DE LA FICHE :	NOM : PRENOM :
DATE DE NAISSANCE	
GENOTYPE*	
DEGRE D'ANEMIE -Taux d'hémoglobine de base pour les TI -Taux d'hémoglobine pré-transfusionnel pour les TM -Asthénie chronique**	
DOULEURS CHRONIQUES -Traitement antalgique quotidien -Palier d'antalgiques utilisé (1, 2 ou 3)	
ATTEINTES DEGENERATIVES ENDOCRINIENNES : à préciser Hypogonadisme/Ostéoporose/Diabète/Hypothyroïdie Hypoparathyroïdie/Insuf surrénalienne	
CO-MORBIDITE : à préciser	
TRAITEMENT QUOTIDIEN Traitement chélateur (préciser P OS ou parentéral)  Traitement à visée cardiaque, endocrinienne au long cours (préciser P Os ou parentéral) Traitement par Hydréa ou EPO	
CONTRAINTES THERAPEUTIQUES°	
RYTHME DES TRANSFUSIONS	
NOMBRE ANNUEL DE JOURS -d'hospitalisation conventionnelle -de séances d'HDJ	
NOMBRE DE CONSULTATIONS ANNUELLES	
RETENTISSEMENT PSYCHOLOGIQUE°	

\* : Thalassémie Majeure plus sévère que Thalassémie Intermédiaire

\*\* à côté 0 : absente, + : modérée (gêne aux efforts physiques), ++ : moyenne (gêne à l'activité physique en général), +++ : majeure (difficultés pour les activités quotidiennes de base)

° à côté 0 : absente, + : modérée, ++ : moyenne, +++ : majeure

Conclusion médicale éventuelle sur la sévérité du handicap :

Synthèse éventuelle du psychologue :

## LA BETA-THALASSEMIE, TRAITEMENTS ET SUIVIS



Information à l'intention des patients et de leur famille

Juillet 2015

### Qu'est-ce que la Bêta-Thalassémie?

La  $\beta$ -Thalassémie est une maladie génétique, héréditaire, touchant l'hémoglobine, un composant des globules rouges permettant de transporter l'oxygène dans l'organisme. Les  $\beta$ -Thalassémies ne présentent pas toute la même sévérité, les formes majeures et intermédiaires sont les plus sévères. La maladie se manifeste par une anémie due au manque de globules rouges et d'hémoglobine. Grande fatigue, pâleur, essoufflement et parfois vertige sont les signes de l'anémie. Selon son importance, ses premiers symptômes vont apparaître vers l'âge de 6 mois, 1 an, ou beaucoup plus tard. Des complications peuvent être associées à l'anémie, comme des problèmes de croissances, des problèmes osseux qui se manifestent par la suite. Les traitements permettent de contrôler l'anémie et de limiter l'apparition de complications.

*Cette fiche apporte des informations sur la maladie et les grands principes du traitement. Son but est de faciliter les échanges avec l'équipe médicale. Chaque forme de Bêta-Thalassémie présente des particularités, seul le médecin référent peut informer de façon complète et adaptée à propos de la maladie.*

### Les traitements

Quel traitement ?	A quoi sert-il?	Comment ?
La transfusion sanguine	Lorsque l'anémie est importante, le sang reçu vous apporte l'hémoglobine et les globules rouges nécessaires.	Dans le service d'hématologie de l'hôpital, la perfusion dure entre 1h30 et 3h. Effectuées toutes les 2 à 5 semaines ou de façon irrégulière.
Les chélateurs du fer	Un excès de fer est toxique pour l'organisme. Ces médicaments sont prescrits lorsque plus de 20 transfusions ont été reçues ou que la ferritine sérique, image des réserves de fer dans le corps, est supérieure à 1000 $\mu$ g/l.	Selon les cas : *Comprimé, 2 ou 3 fois par jour *Par perfusion, 5 nuits par semaine à l'aide d'une chambre implantable (utilisé dans moins de 30% des cas)
L'hydroxyurée	Ce médicament améliore l'anémie, en augmentant un autre type d'hémoglobine pour compenser celle défectueuse.	Comprimé, 1 ou 2 fois par jour

Tableau1: Traitements classiques de la Bêta-Thalassémie

Le traitement instauré est **adapté à chaque patient** par les médecins selon l'âge, les complications manifestées, la tolérance au traitement

La greffe de cellule souche hématopoïétique peut être envisagée par les médecins, en particulier pour les enfants atteints de forme sévère. Un donneur compatible dans la famille sera recherché. Les cellules du donneur sont perfusées après un traitement particulier pour limiter les risques de rejet.

L'ablation de la rate (la splénectomie) peut être recommandée, pour limiter les besoins en transfusions et limiter la destruction excessive des globules rouges en éliminant son siège principal.

Des suppléments vitaminiques peuvent être prescrits (Acide folique, Vitamine C).

La Bêta-Thalassémie est au cœur de nombreuses recherches pour faire évoluer les traitements.

Il existe un registre national des Patients atteints de Bêta-Thalassémie, qui a pour but d'analyser l'évolution de la maladie.

Cette base de donnée est essentielle pour faire avancer la recherche. Après en avoir discuté avec le médecin référent, un consentement formalisé sera demandé pour faire partie de ce registre.

## Le suivi de la maladie

L'anémie et l'excès de fer peuvent être à l'origine de nombreuses complications (retard de croissance, déformation osseuse, insuffisance hormonale, ostéoporose, diabète, problème cardiaque, infections, ulcères de jambes). Les tests ci-dessous permettent de détecter l'apparition des principales complications et d'en mesurer l'évolution, afin de bien les traiter. Des traitements complémentaires pourront être prescrits selon les résultats.

Paramètres explorés	Fréquences du suivi	Comment ? Pourquoi ?
<b>Evaluation des apports en fer</b>	A chaque transfusion	Calcul de la quantité de fer reçue en fonction du volume sanguin qui vous a été transfusé
<b>Evaluation des besoins en chélation</b>	Trimestrielle	Pour ajuster la dose du chélateur, en fonction des apports en fer. En fonction du chélateur prescrit, un suivi particulier est mis en place (examen visuel et auditif possible)
<b>Croissance et développement sexuel</b>	Semestrielle (enfant)	Dosage sanguin des hormones sexuelles, Examen clinique
<b>Densité osseuse</b>	Annuelle	Une imagerie à rayon X vérifie analyse le contenu minéral des os
<b>Fonction hépatique</b>	Trimestrielle	Dosage sanguin des transaminases, permet de repérer des lésions ou infections au niveau du foie
<b>Dosage de la ferritine sérique</b>	Trimestrielle	Mesure les réserves en fer (dosage sanguin)
<b>Diabète(1)</b>	Annuelle (chez les adultes)	(1) Test au glucose (Dosage du sucre dans le sang 1h après la prise orale de 50g de glucose)
<b>Thyroïde(2)</b>		(2) Dosages sanguins de trois hormones (TSH, Thyroxine libre, TRH),
<b>Métabolisme calcique(3)</b>		(3) Dosage sanguin du calcium et du phosphore
<b>Fer hépatique</b>	Annuelle (à partir de 8ans)	Echographie abdominale pour détecter les zones de stockage du fer
<b>Fer cardiaque</b>	Annuelle (à partir de 8ans)	Mesure de la quantité de fer au niveau du cœur, par imagerie médicale, l'IRM
<b>Fonction cardiaque</b>	Annuelle (à partir de 8ans)	Le rythme du cœur est analysé par un électrocardiogramme. Son volume, sa morphologie et ses battements sont vérifiés par une échographie

Tableau2: Types de suivis et leurs fréquences

*Des associations de patients dédiées à la Bêta-Thalassémie permettent d'échanger sur le vécu de chacun:*

*\*Association Française de Lutte contre les Thalassémies*

*\*Fédération des malades drépanocytaires et thalassémique*

*\*Association France Thalassémie*

*\*SOS Globi*

## Vivre avec la maladie

### Hygiène de vie

Une activité physique régulière est conseillée. Côté alimentation, elle doit être équilibrée, apportant les vitamines C et E, et pauvre en fer. (limiter le boudin noir, les huîtres, palourdes, haricots blancs, soja, les céréales et fruits secs). La consommation d'alcool est à éviter.

### Prise régulière du traitement

Le suivi régulier du traitement de chélateur augmente l'espérance de vie. Si des difficultés sont rencontrées pour suivre ce traitement, il est nécessaire d'en discuter avec les médecins. L'adolescence est notamment une période charnière dans l'évolution de la maladie, elle présente aussi le plus de risques de baisse de suivi des chélateurs dû à un déni de la maladie exprimé par les enfants.

### Famille

La maladie est héréditaire: à la découverte de celle-ci dans la famille, un dépistage des frères et soeurs est conseillé. Face à un désir d'enfant, un conseil génétique est proposé, un diagnostic prénatal peut être effectué. Un soutien psychologique familial peut être bénéfique dans toutes les étapes difficiles.

### Cas d'urgence

Pour les patients splénectomisés ou sous la Défériprone (un chélateur), l'apparition d'une fièvre amène à consulter aux urgences. Pour tous les patients, essoufflement, malaise, palpitation, et douleur abdominale brutale sont signes d'urgence. Avant toute chirurgie, le personnel soignant doit être informé de la pathologie.

### Où se faire suivre?

Dans les services de médecine internes ou d'hématologie. Certains hôpitaux sont spécialisés pour suivre cette maladie. (A Paris, Marseille, Lyon).

(1) R. Galanello et R. Origa, «Beta-thalassemia,» *GeneReviews*, University of Washington, Seattle, Mai 2015.

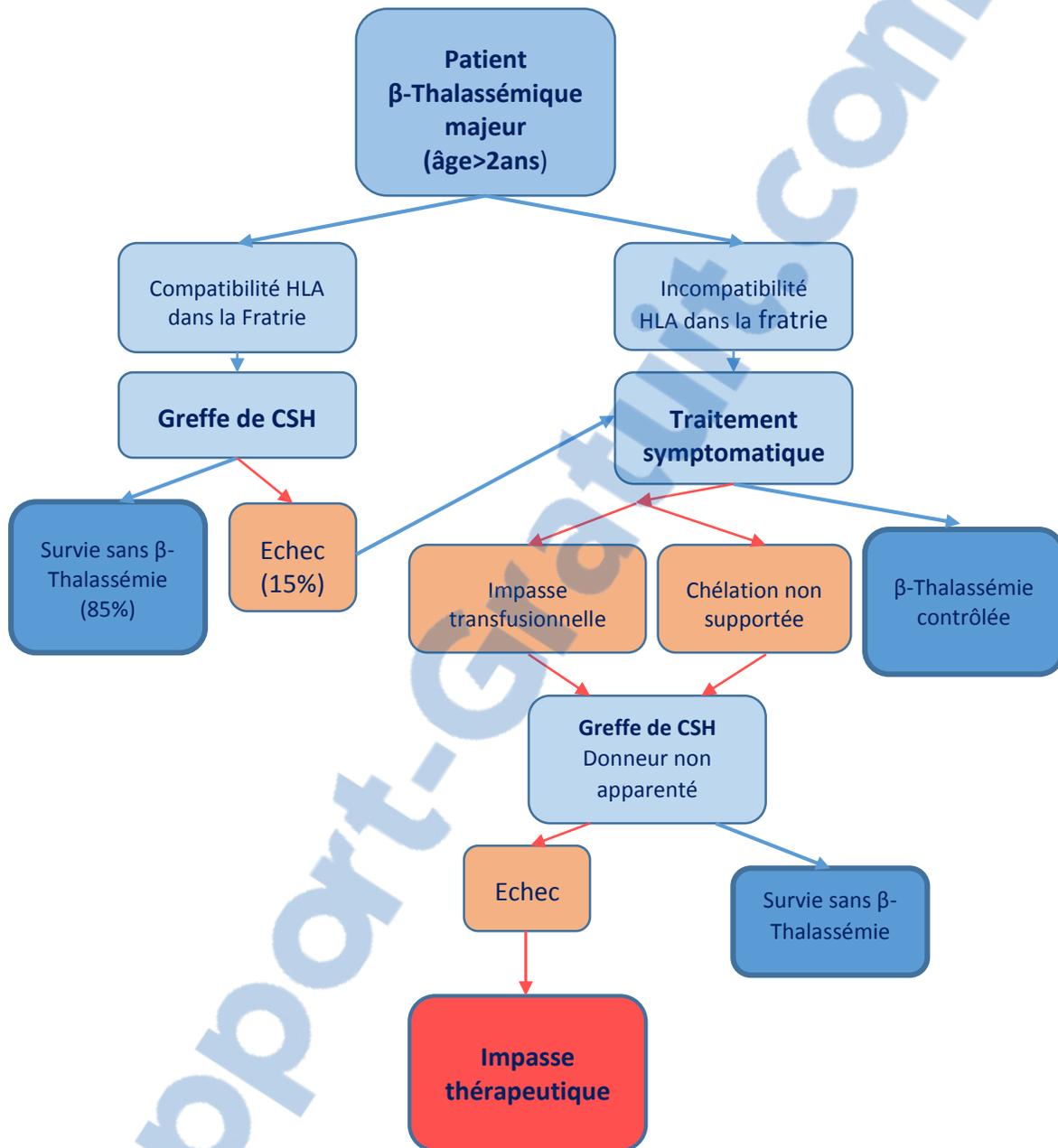
(2) M. D. Cappellini, V. Viprakasit et A. T. Taher, «An overview of current treatment strategies for beta-thalassemia,» *Expert opinion on orphan drug*, vol. 2, n°17, p. 665-679, 2014.

(3) Orphanet, «La bêta-thalassémie,» Juin 2008. [En ligne]. <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/BetaThalassemie-FRfrPub51.pdf>. [Accès le 12/08/2015].

Annexe 3: Tableau comparatif des chélateurs du fer [79] [226]

Dénomination Commune Internationale	Déféroxamine DFO (mesilate de)	Défériprone DFP	Déférasirox DFX
Spécialité pharmaceutique	Desferal®	Ferriprox®	Exjade®
Patient	Enfant > 2ans, Adulte	>6ans si DFO mal supportée	>6ans Ou >2ans si DFO mal supportée
Poids moléculaire	657Da	139Da	373.4Da
Demi-vie	20-30 minutes	3-4 heures	12-16 heures
Voie d'administration	Parentéral	Orale	Orale, comprimé dispersible
Posologie	8 à 12h par nuit 5jours par semaine 40-50mg/kg/jour	3 prises par jour 75mg/kg/jour	20–30 mg/kg/jour Jusqu'à 80mg/kg/jour
Excrétion du fer	Fèces : 40% Urine : 60%	Urine : 90 %	Fèces : 85%
Bénéfice Cellules cibles	Diminution efficace de la Ferritinémie Cellule Hépatique	Cellule Cardiaque	Cellule Hépatique Cellule Cardiaque
Effet secondaire	Réaction au site de perfusion (douleur brulure, érythème, prurit) Toxicité visuel Surdité neurosensorielle Retard de croissance, déformation osseuse Mycose	Troubles gastro-intestinaux Agranulocytose Arthrites	Trouble gastro-intestinaux Rash Troubles hématologiques Troubles hépatiques Insuffisance rénale
Estimation du Coût journalier	58€	22€	95€

Annexe 4: Diagramme des possibilités thérapeutiques officiellement recommandées



*Annexe 5: Critère d'inclusion des patients  $\beta$ -Thalassémiques majeurs dans l'essai clinique du LentiGlobin™BB305 [175]*

- Age : 12-35ans
- Genre : Homme/Femme
- Volontaires sains acceptés : Non

Critères d'inclusion

- Patient capable de donner un avis de consentement écrit
- Diagnostic de  $\beta$ -Thalassémie Majeure, avec un besoin en transfusion de plus de 100mL/kg/an, ou plus de 8 transfusions depuis au moins 2ans
- Eligible pour une Greffe de Moelle Osseuse Allogénique
- Traité et suivi depuis au moins 2ans dans un centre spécialisé (dossier de suivi complet)

Critères d'exclusion

- Séropositif pour les virus VIH1 et VIH2
- Taux de globules blancs  $<3 \times 10^9/L$  et un taux de plaquette  $<100 \times 10^9/L$  en l'absence d'hypersplénisme
- Trouble de la coagulation
- Historique de Maladie maligne, myéloproliférative, ou immunodéficience
- Membre de la famille directe avec un cancer héréditaire
- Greffe allogénique déjà reçue
- Désordre hépatique (cirrhose, fibrose hépatite, transaminase x3 le taux normal)
- Clairance à la créatinine  $<30\%$  du taux normal
- Hypertension pulmonaire
- Capacité de diffusion du Monoxyde de carbone  $<50\%$
- IRM cardiaque :  $T2^* < 10ms$
- Autre réception de thérapie génique
- Participation à une autre étude clinique

**Indications des tentatives d'AMP en 2012**

Indication	Total en France	
	Cycles débutés*	Tentatives **
<b>Autosomique récessif :</b>	<b>82</b>	<b>63</b>
Acidurie glutarique (EFTDH)	1	0
Albinisme oculo cutané	1	1
Amyotrophie spinale	15	9
Drépanocytose	7	7
Dysplasie spondylo épiphysaire	2	2
Déficit en plasminogène de type 1 (gène PLG)	1	1
Epidermolyse bulleuse	2	0
Glycogénose de type 3	1	0
Glycogénose de type 4	1	0
Hyperplasie congénitale surrénales	1	1
Hyperphénylalaninémie	2	2
Mucoviscidose	41	35
Pseudohypoaldostéronisme	1	1
Syndrome Néphrotique Finlandais	1	1
Syndrome de Berardinelli Seip	1	1
<b>Thalassémie</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Tyrosinémie de type 1 (gène FAH)	1	0
<b>Autosomique dominant (total)</b>	<b>153</b>	<b>135</b>
<b>Liée au chromosome X Diagnostic moléculaire (total)</b>	<b>53</b>	<b>45</b>
<b>Liée au chromosome X Diagnostic cytogénétique (total)</b>	<b>13</b>	<b>7</b>

<b>Anomalie de caryotype (total)</b>	<b>296</b>	<b>253</b>
<b>Autres (y compris DPI HLA) :</b>	<b>22</b>	<b>17</b>
<b>Bêta Thalassémie+ HLA</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
Drépanocytose + HLA	12	9
Granulomatose septique + HLA	1	1
Myopathie mitochondriale + mucoviscidose	1	1
Syndrome de Di George	2	1
Trisomie 21	2	2
<b>Total (toutes pathologies)</b>	<b>619</b>	<b>520</b>

\*Stimulation ovarienne débutée

\*\*Cycles avec ponction

**Nombre de demandes de DPI examinées et acceptées par les centres français en 2012**

Indication	Total en France	
	Examinées	Acceptées
<b>Autosomique récessif :</b>	<b>131</b>	<b>101</b>
Acidémie propionique	1	0
Albinisme oculo-cutané	1	1
Alpha-thalassémie	1	0
Amaurose congénitale de Leber	2	1
Amyotrophie spinale	19	15
Ataxie télangiectasie	1	1
<b>Bêta-thalassémie</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
Calcification artérielle généralisée	1	1
Cytopathie Mitochondriale	2	1
Drépano-thalassémie	1	1
Drépanocytose	14	13
Dystrophie musculaire congénitale LAMA2	2	2
Dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine	1	1
Dystrophie neuro-axonale	1	1
Déficit de la bêta oxydation des acides gras	2	2
Déficit en alpha 1 antitrypsine	2	0
Déficit en cofacteur du molybdène	2	2
Déficit en cofacteur molybdène	1	1
Déficit en protéine mitochondriale trifonctionnelle	2	2
Déficit en pyruvate déshydrogénase	1	0
Déficit en transaldolase	1	1
Déficit immunitaire combiné sévère (mutation du gène JAK3)	1	0
Encéphalopathie épileptique néonatale PNPO	1	1
Epidermolyse bulleuse congénitale	1	0
Forme modérée de déficit en PTPS	1	0
Gamma sarcoglycanopathie	1	1
Glycogénose de type Ia	1	1
Hyper insulinisme (mutation du gène KCJ11)	1	0
Hyperplasie congénitale des surrénales	1	0
Intolérance aux protéines dibasiques	1	1

Le décalage entre les nombres de dossiers examinés, refusés et acceptés est en rapport avec le chevauchement de quelques dossiers entre deux années.

<b>Autosomique récessif (suite)</b>		
Leucodystrophie métachromatique	1	1
Lymphohistiocytose familiale	1	1
Maladie de Morquio de type A	1	1
<b>Autosomique dominant (total)</b>	<b>232</b>	<b>167</b>
<b>Liée au chromosome X (total)</b>	<b>81</b>	<b>57</b>
<b>Anomalie de caryotype (total)</b>	<b>248</b>	<b>216</b>
<b>Autres :</b>	<b>37</b>	<b>25</b>
46,X,del(X)(q27),t(11;19)(q23.2;p13.2)	1	0
46,XX,der(4)t(4;15)(p15.2;q21.2)inv(4)(p15.2;q12)	1	1
Alagille Mme + Klinefelter Mr	1	0
Allo-immunisation anti Kell	1	1
Allo-immunisation anti-plaquettaire	1	1
Aneuploïdie en mosaïque du chr 21	3	1
<b>Bêta thalassémie + HLA</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
Drépanocytose et 46,XX,t(11;17)(q25;p11.1)	1	1
Drépanocytose+HLA	4	3
Dysgonosomie en mosaïque	2	0
Granulomatose septique chronique+HLA	2	2
Hypochondrodysplasie + dysplasie polyépiphytaire	1	1
Inversion paracentrique	1	0
Inversion péricentrique	5	4
Mutation de l'ADN mitochondrial	3	2
Myopathie de Duchenne et Duplication de la région 22q11.2	1	1
Neuropathie optique de Leber + Dysplasie ectodermique anhidrotique lié à l'X	1	1
Prédisposition aux tumeurs rhabdoïdes+46,XX,dup(22)(q11.2;q11.2)	1	1
Syndrome de DiGeorge	2	1
Syndrome de Prader Willi	1	1
Syndrome de Shwachman Diamond + HLA	1	1
<b>Total (toutes pathologies)</b>	<b>729</b>	<b>566</b>

# EMILIE CHEVET

## Nouvelles pistes thérapeutiques dans la $\beta$ -Thalassémie

### RÉSUMÉ

La  $\beta$ -Thalassémie est une hémoglobinopathie caractérisée par un défaut de synthèse de la chaîne  $\beta$ -globine. Le recours aux transfusions et aux chélateurs du fer, contraignants et parfois difficilement supportés, permet depuis les années 70 de limiter les principaux symptômes de la pathologie : l'anémie et la surcharge en fer. L'espérance de vie des patients a ainsi été largement augmentée. Cependant, même avec l'arrivée plus récente de la greffe de cellule souche hématopoïétique, un certain nombre de patients font encore face à une impasse thérapeutique. Mais aujourd'hui, la connaissance de plus en plus approfondie des métabolismes du fer et de l'érythropoïèse augmente le nombre de cibles thérapeutiques envisageables. En parallèle, le développement de la thérapie génique appliquée à la restauration du gène de la  $\beta$ -globine progresse. Cette thèse parcourt les traitements usuels de la  $\beta$ -Thalassémie et dresse le bilan des nombreuses alternatives thérapeutiques en cours d'étude en 2015. Certaines pistes montrent un réel potentiel curatif qui bouleverserait les protocoles de soin actuels, tandis que les enjeux bioéthiques portés par la dernière approche pourraient remettre en cause son application.

Mots-clés : Anémie – Surcharge en fer - Transfusion – Chélation – Erythroferrone - Cellule souche hématopoïétique – Thérapie génique – Diagnostic préimplantatoire

## New approaches for the $\beta$ -Thalassemia therapy

### ABSTRACT

$\beta$ -Thalassemia, a hemoglobinopathy, is defined by a defect of the  $\beta$ -globine chain synthesis. Since 70's, the use of blood transfusion and iron chelation, burdensome and sometimes hardly supported, allows the limitation of the main symptoms of the disease: anemia and iron overload. Life expectancy of patients has been largely increased. However, even with the latest establishment of the hematopoietic stem cell transplantation, a number of patients are still dealing with a therapeutic stalemate. But knowledge more and more detailed about iron metabolism and erythropoiesis expands today the field of conceivable therapeutic targets. In parallel, the development of gene therapy applied to the correction of the  $\beta$ -globin gene is underway. This thesis is a review of usual treatments of  $\beta$ -Thalassemia and an update regarding the various therapeutics ways under study in 2015. Some of these approaches are showing a real curative potential which could deeply modify the current treatment protocol. In the meantime, the bioethic aspects of the last one could challenge its application.

Keywords : Anemia – Iron overload – Blood transfusion – Chelation – Erythroferrone – Stem cell – Gene therapy – Preimplantation diagnosis