

Année Universitaire : 2008-2010



**Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et  
Techniques

**Contribution à l'étude des  $\alpha$ -thalassémies chez les  
nouveaux-nés de la région Nord du Maroc**

**Présenté par:**

**EL WAHABI Houria**

**Encadré par:**

**- Mr. BENNANI Mohcine**

**Soutenu Le 23 Juin 2010 devant le jury composé de:**

- Mr. M. Bennani**
- Mr. M. Iraqui**
- Mme. S. Guissi**
- Mr. O. Faricha**

**Stage effectué à : Faculté des Sciences et Techniques de Tanger**



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Nom et prénom: EL WAHABI Houria**

**Année Universitaire : 2008/2010**

**Titre: Contribution à l'étude des  $\alpha$ -thalassémies chez les nouveaux-nés de la région Nord du Maroc**

### **Résumé**

Les thalassémies constituent un groupe hétérogène de maladies monogéniques héréditaires, dues à des anomalies de l'hémoglobine. Selon la chaîne de la globine déficiente, on distingue les  $\alpha$ -thalassémies et les  $\beta$ -thalassémies.

Les  $\alpha$ -thalassémies dues à un déficit moléculaire touchant le gène  $\alpha$  ou l'un de ces régions régulatrices sont le résultat de plusieurs types de mutations et de délétions, parmi les plus fréquentes dans le bassin méditerranéen on trouve  $\alpha 3.7$  et la forme  $\alpha 4.2$ .

Les alpha-thalassémies touchent les pays du bassin méditerranéen ainsi que les pays Africains. Leurs conséquences varient entre absence des signes cliniques graves à la présence d'anémie profonde et létale.

Notre travail s'inscrit dans ce contexte, afin de pouvoir établir la prévalence de cette maladie dans la région Nord du Maroc.

Nous avons analysé 450 échantillons du sang prélevé à partir du cordon ombilical des nouveaux-nés. L'étude comporte deux volets : un volet phénotypique correspondant à la réalisation d'un examen hématologique dont le but est de déterminer certains paramètres hématologiques, suivi d'un examen biochimique. Ces deux examens nous ont permis de trier certains cas qui sont soupçonnés d'être  $\alpha$ -thalassémiques et dont la TGMH est comprise entre 16 et 30 pg/cellule. Et un deuxième volet qui comprend une étude génotypique concernant la recherche par la réaction d'amplification sélective la PCR de deux types de délétions :  $\alpha 3.7$  et  $\alpha 4.2$ .

Parmi les 450 nouveaux-nés étudiés, 66 ont révélé une anémie microcytaire hypochrome, suspects d'être  $\alpha$ -thalassémique. Un nouveau-né parmi les 66 a présenté, une hémoglobine anormale révélant la présence du trait thalassémique : Hb Bart's, et deux autres nouveaux-nés ont révélé une hémoglobine S responsable de la drépanocytose.

Notre étude montre une prévalence de 0,93% de la délétion  $\alpha 3.7$  mais aucun cas de la délétion  $\alpha 4.2$  n'a été révélé.

**Mots clés:  $\alpha$ -thalassémie, prévalence, délétion  $\alpha 3.7$ , délétion  $\alpha 4.2$ , Nord du Maroc**

# **DEDICACES**

*A mes parents dont le rêve était toujours de ma voir réussir.*

*Qu'ils sachent que leur place dans mon cœur et ma*

*pensée, reste et demeure immense.*

*A toute ma famille, grands et petits : Que ces*

*modestes lignes leur servent de témoignage de mon*

*attachement indéfectible au lien sacré de ma famille.*

*A tous les étudiant(e)s de la Promotion du Master Biotechnologies*

*Microbienne, en reconnaissance pour leur solidarité.*

*A tous mes amis, et mes collègues.*

*Et à tous ceux qui me sont chers.*



# REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le professeur BENNANI Mohcine, pour son encadrement, ses conseils pratiques, sa patience, sa gentillesse, son entière disponibilité, et d'avoir mis à ma disposition tout les moyens pour élaborer mon Projet dans les meilleurs conditions.

Mes remerciements sont particulièrement adressés à Mlle HAMDOUCH Khaoula Doctorante au laboratoire de Génomique Humaine à la Faculté des Sciences et Techniques de Tanger, pour ses conseils scientifiques et son soutien moral et matériel.

Je remercie infiniment Doctorante Mlle BENYAHYA Fatiha au laboratoire de Génomique Humaine à la Faculté des Sciences et Techniques de Tanger pour son aide, son soutien et ses conseils scientifiques.

Je voudrais aussi remercier le personnel du ministère de la santé public notamment, Messieurs les Délégués de la ville de Tanger de Tétouan et de Larache pour leur aide dans la réalisation de l'échantillonnage au sein des hôpitaux de la région Tanger-Tétouan-Larache.

Je tiens à remercier Mr. MADRARI Hassan Pharmacien biologiste du laboratoire d'analyses médicales BIOLOGICA de Larache pour son accueil au sein de son laboratoire, sa collaboration et ses conseils avisés.

Je tiens à remercier monsieur le professeur M. IRAQUI, ainsi qu'à tout le corps enseignant du Master Biotechnologie microbienne à la faculté des Sciences et Technique de Fès dont j'ai bénéficié durant ma formation Master.

J'adresse vivement mes remerciements aux membres du jury pour leur assistance pédagogique et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également tous les étudiants du département de Biologie de la FST de Tanger notamment Mr MAHRACH Younes et tous ceux qui ont contribué d'une manière ou une autre à la réalisation de ce travail.



# Liste des abréviations

- **A** : Adénine
- **ADN** : Acide Désoxyribo-Nucléique.
- **ARN** : Acide Ribo- Nucléique
- **ARNm** : Acide Ribo- Nucléique messenger
- **Br.Et** : Bromure d'éthidium
- **C** : Cytosine
- **Da** : Dalton
- **DO** : Densité optique
- **EDTA** : Ethyle Diamine Tris-Acétate
- **G** : Guanine
- **GR** : Globule rouge
- **Hb** : Hémoglobine
- **MgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Magnésium
- **Kb** : Kilobases
- **NaCl** : Chlorure de Sodium
- **dNTP** : Désoxyribo- Nucléotide triphosphate
- **pb** : Paire de base
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **Qsp** : quantité suffisante pour
- **r.p.m** : Rotation Par Minute
- **T** : Thymine
- **TGMH** : Teneur Globulaire moyenne en Hémoglobine
- **T.A.E** : Tris Acétate EDTA
- **T.B.E** : Tris Borate EDTA
- **SDS** : Sodium Dodécyl Sulfate
- **T°m** : Température de fusion
- **UV** : Ultra violet

# Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b> Schéma d'une molécule d'hémoglobine illustrant ses quatre sous unités.....	5
<b>Figure 2 :</b> Hémoglobine sous forme réduite et oxydée.....	5
<b>Figure 3 :</b> Organisation chromosomique du gène $\alpha$ de la globine.....	8
<b>Figure 4 :</b> Structure du gène $\beta$ de la globine. ....	8
<b>Figure 5 :</b> Evolution de la synthèse des chaînes des molécules d'hémoglobine en fonction de l'âge.....	10
<b>Figure 6 :</b> Répartition géographique de l'alphathalassémie.....	13
<b>Figure 7 :</b> Organisation chromosomique des gènes de l' $\alpha$ - globine normale.....	13
<b>Figure 8a :</b> Mécanisme de la délétion $\alpha$ 3.7.....	16
<b>Figure 8b :</b> Mécanisme de la délétion $\alpha$ 4.2.....	16
<b>Figure 9 :</b> Forme délétionnelle responsable d'une $\alpha$ + thalassémie.....	17
<b>Figure10 :</b> Forme délétionnelle responsable d'une $\alpha$ thalassémie.....	17
<b>Figure 11 :</b> Forme délétionnelle responsable d'une Hémoglobinose H.....	20
<b>Figure 12 :</b> Forme délétionnelle responsable d'un Hydrops foetalis.....	21
<b>Figure 13 :</b> La délétion d'un ou plusieurs gènes $\alpha$ aboutit à divers phénotypes.....	22
<b>Figure14 :</b> Physiopathologie des alpha-thalassémies.....	25
<b>Figure 15 :</b> Cellule « Thoma » pour la numération des globules rouges.....	33
<b>Figure 16 :</b> Micropipette Potan.....	33

<b>Figure 17:</b> Système MINICAP Hémoglobine.....	36
<b>Figure 18 :</b> la réaction de polypérisation en chaîne (PCR).....	41
<b>Figure 19:</b> Distribution des valeurs de la TGMH des 450 nouveau-nés étudiés.....	52
<b>Figure 20a :</b> Electrophorèse de l'hémoglobine sur acétate de cellulose à pH alcalin(8,6), révélant la présence de l'hémoglobine Bart's.....	54
<b>Figure 20b :</b> Electrophorèse de l'hémoglobine sur acétate de cellulose à pH alcalin (pH= 8,6), révélant la présence d'une hémoglobine anormale HbS.....	54
<b>Figure 21a :</b> profil de l'électrophorèse capillaire d'un nouveau-né alpha thalassémiques.....	56
<b>Figure 21a :</b> profil de l'électrophorèse capillaire d'un nouveau- né normal.....	56
<b>Figure 22 :</b> Identification moléculaire par PCR de la délétion $\alpha 3.7$ .....	61
<b>Figure 23 :</b> Identification moléculaire par PCR de la délétion $\alpha 4.2$ .....	61

## ***Sommaire***

---

INTRODUCTION GENERALE.....	4
<b>Première partie: Revue Bibliographique</b>	
1. Structure et fonction de l'hémoglobine .....	3
1.1. Structure de l'hémoglobine .....	3
1.2. Rôle de l'hémoglobine .....	4
2. Organisation des gènes de globine humaine en famille .....	6
2.1. La famille des gènes des $\alpha$ -globines .....	6
2.2. La famille des gènes des $\beta$ -globines .....	6
2.3. Evolution ontogénique des hémoglobines humaines .....	7
3. Alpha thalassémie .....	9
3.1. Historique .....	11
3.2. Épidémiologie .....	12
3.3. L' $\alpha$ -thalassémie et Génotype associés .....	15
3.3.1. $\alpha$ - thalassémie silencieuse ou de type 2, $-\alpha/\alpha\alpha$ .....	15
3.3.2. $\alpha$ - thalassémie mineure ou de type 1 $--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha /-\alpha$ .....	16
3.3.3. Hémoglobinoïde H : 3 gènes $\alpha$ atteints $-\alpha/--$ .....	19
3.3.4. Hydrops foetal. $--/--$ .....	19
3.3.5. Mutations non délétionnelles .....	20
3.4. Description clinique et Diagnostic .....	24
3.5. Physiopathologie .....	25
3.6. Le traitement, la prise en charge et la prévention .....	26
4. But du travail .....	27
<b>Deuxième partie: Matériel et Méthodes</b>	
1. Sujets étudiés .....	29
2. Méthodes .....	29
2.1. Etude phénotypique ou Examen hématologique .....	29
2.1.1. La numération formule sanguine (NFS) .....	29
A. METHODE MANUELLE : COMPTAGE DES GLOBULES ROUGES .....	30
B. HEMOGRAMME PAR AUTOMATE .....	31
2.1.2. Dosage d'hémoglobine .....	31
2.1.3. Teneur Globulaire Moyenne en Hémoglobine (TGMH) .....	32
2.1.4. Electrophorèse de l'hémoglobine.....	32
A. ÉLECTROPHORESE CAPILLAIRE .....	33

---

B.	ÉLECTROPHORESE SUR PLAQUE D'ACETATE DE CELLULOSE .....	34
2.2.	Etude géotypique .....	36
2.2.1.	Extraction de l'ADN à partir du sang total .....	36
2.2.2.	Contrôle de l'ADN extrait .....	38
2.2.3.	Amplification enzymatique in vitro de l'ADN génomique (PCR) .....	39
2.2.4.	Recherche des délétions $\alpha$ 3.7 et $\alpha$ 4.2 .....	43
A.	REACTION .....	43
B.	REACTION D'AMPLIFICATION.....	43
2.2.5.	Analyse des produits amplifiés .....	44
<b>Troisième partie: Résultats et discussion</b>		
1.	Résultats phénotypiques .....	47
1.1.	Les sujets étudiés .....	47
1.2.	Résultats hématologiques .....	48
1.3.	Résultats électrophorétiques .....	50
1.3.1.	Electrophorétiques sur plaque d'acétate de cellulose .....	50
1.3.2.	Electrophorèse capillaire .....	53
2.	Résultats géotypiques .....	55
2.1.	Recherche de la délétion $\alpha$ 3.7 .....	55
2.2.	Recherche de la délétion $\alpha$ 4.2 .....	56
Conclusion et Perspectives.....		57
Références Bibliographiques.....		60

---

# **INTRODUCTION GENERALE**

---

---

Les hémoglobinopathies sont des maladies héréditaires à transmission autosomale récessive liées à une anomalie qualitative ou quantitative de l'hémoglobine. Parmi les hémoglobinopathies, on distingue les thalassémies qui sont des anémies quantitatives caractérisées par le défaut de synthèse de chaîne de globine de l'hémoglobine et les hémoglobinoses qui sont des anémies qualitatives liées à un défaut de structure de la molécule d'hémoglobine.

Les thalassémies dues à un déficit de synthèse de l'un des chaînes de la globine  $\alpha$  et/ou  $\beta$  constituent un groupe d'anémies héréditaires de présentation clinique variable. Elles représentent les maladies monogéniques les plus répandues chez l'homme (Weatherall.D.J et al ,1982). On distingue en conséquence deux grands types de thalassémie, les thalassémies touchant les gènes alpha, ou alpha-thalassémies, et les thalassémies touchant les gènes bêta, ou bêta-thalassémies.

Grâce aux techniques de la biologie moléculaire les gènes de la globine, même qui sont particulièrement petits, sont certainement les mieux connus de tous les gènes humains, ce qui a permis la compréhension et l'étude de la régulation de la synthèse de l'hémoglobine et donc l'identification des différents défauts moléculaires qui peuvent en résulter lors de la régulation ou de la synthèse comme pour les alpha thalassémies suite à la présence d'une délétion ou mutation au niveau d'un gène  $\alpha$ .

A l'heure actuelle, d'après l'OMS près de 5 % de la population mondiale sont porteurs d'un gène de l'hémoglobine potentiellement pathologique et que chaque année, près de 300000 nourrissons naissent dans le monde avec des syndromes thalassémiques (30 %) ou une anémie drépanocytaire (70 %) (Rapport de l'OMS, 2006).

Les alpha-thalassémies sont très répandue dans le monde. Elles sont très fréquentes dans certains pays africains, indiens, népalais, du Sardaigne et de nombreuses autres populations méditerranéennes, en chine, et d'autres populations d'Asie orientale. (Souza A.E.S. et al 2009). L'anomalie génétique en cause dans l'alpha-thalassémie confère une résistance naturelle au paludisme, ce qui explique qu'elle soit plus fréquente dans ces régions très exposées au paludisme. Vu cette distribution et les divers conséquences qu'engendre ce désordre génétique sur la santé des sujets atteints, l'étude et la détermination de la prévalence de cette maladie au Maroc, s'avère nécessaire : le diagnostic précoce permet une meilleur prise en charge des cas thalassémiques, aussi bien que la détermination des familles et des couples à risque contribue à la diminution de l'incidence de la maladie.

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Structure et fonction de l'hémoglobine :

### 1.1. Structure de l'hémoglobine :

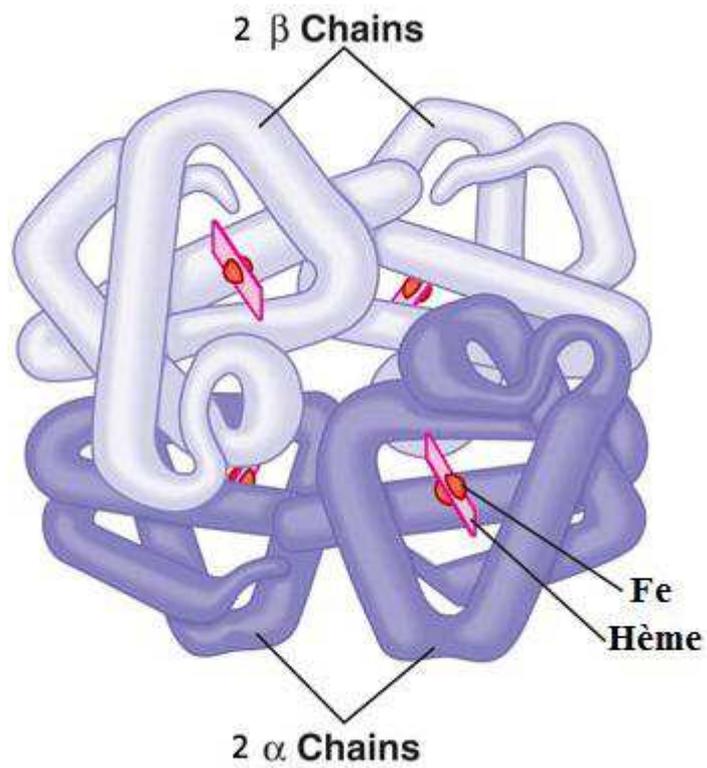
L'hémoglobine est le pigment rouge qui transporte l'oxygène dans les hématies des vertébrés. Elle est normalement produite par les globules rouges dans la moelle osseuse. C'est une protéine qui a un poids moléculaire de 64 450 daltons. C'est une molécule globulaire qui comprend quatre sous-unités formant une structure appelée tétramère. Chaque sous-unité contient une portion **hème** conjuguée à un polypeptide (Figure 1).

L'hème c'est une petite molécule cyclique porphyrinique (donnant sa couleur rouge au sang), il est constitué par un anneau d'atomes de carbone, d'azote et d'hydrogène, au centre duquel s'attache un atome de fer dont le rôle dans la fixation de l'oxygène est primordial (Figure 2). Les polypeptides sont désignés collectivement sous le nom de portion **globine** de la molécule d'hémoglobine. Chaque molécule d'hémoglobine contient deux paires de polypeptides. Dans l'hémoglobine normale d'un adulte (hémoglobine A), ces deux types de polypeptides sont appelés les chaînes  $\alpha$ , qui ont chacune 141 acides aminés, et les chaînes  $\beta$ , qui ont chacune 146 acides aminés. Bien que leurs séquences en aminoacides soient différentes, ces chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont repliées en structures tridimensionnelles à conformation similaire (Gganong W et Jobin M. 2005).

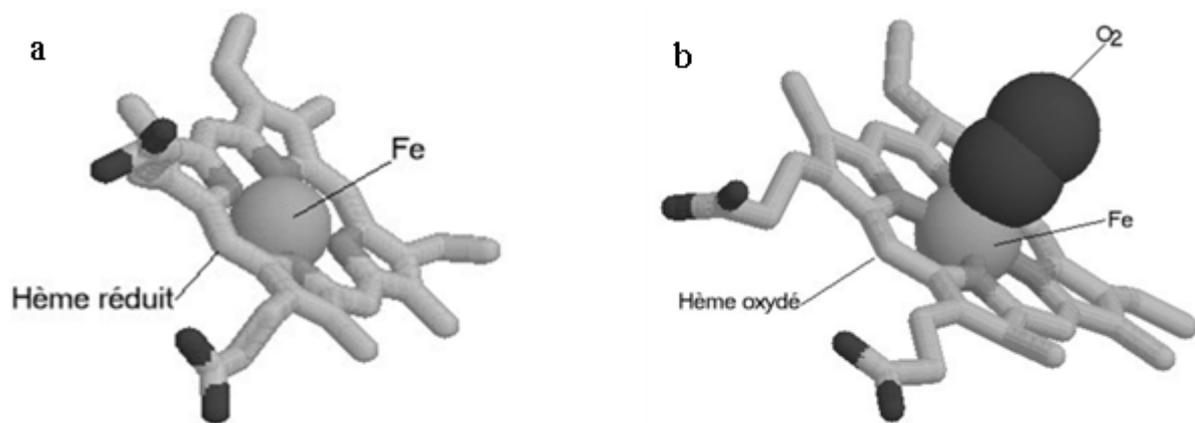
---

## 1.2. Rôle de l'hémoglobine :

L'hémoglobine constitue environ 35 % de la masse des globules rouges dans lesquels elle est contenue. On compte environ 250 millions de molécules d'hémoglobine dans chaque globule rouge, ce qui représente, potentiellement, la fixation d'un milliard de molécules d'oxygène (chaque hème d'une chaîne de globine pouvant fixer une molécule d'oxygène) (Figure 2). Lors du passage des globules rouges dans les capillaires pulmonaires, l'hémoglobine fixe directement l'oxygène qui s'y trouve, elle le libère ensuite dans les tissus des organes périphériques, où la pression partielle en oxygène est beaucoup plus faible. La fonction de l'hémoglobine est régulée par des anions effecteurs et dépend également du pH et de la température. La quantité d'oxygène fixée à l'hémoglobine représente environ 98 % de l'oxygène total contenu dans le sang. L'oxygène circule donc sous une forme majoritairement liée à l'hémoglobine et ne passe à l'état dissous que lors des phénomènes d'échange (Gganong W et Jobin M. 2005).



**Figure 1:** Schéma d'une molécule d'hémoglobine illustrant ses quatre sous unités



**Figure 2 :** Hémoglobine sous forme réduite (a) et Hémoglobine sous forme oxydée (b)

---

## 2. Organisation des gènes de globine humaine en famille :

L'hémoglobine humaine adulte est un tétramère de deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$  (hémoglobine A :  $\alpha_2\beta_2$ ), mais aussi de façon minoritaire d'une autre combinaison polypeptidique:  $\alpha_2\delta_2$ . D'autres types d'hémoglobine sont synthétisés durant le développement embryonnaire (tétramères  $\zeta_2\varepsilon_2$ ,  $\zeta_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\varepsilon_2$ ), puis fœtal, (tétramère  $\alpha_2\gamma_2$ ). Tous les gènes fonctionnels codant ces différentes chaînes protéiques sont regroupés en famille (cluster : "agrégat") :  $\alpha$  ( $\zeta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ ) et  $\beta$  ( $\varepsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ). Les gènes sont organisés sur le même modèle à 3 exons et dérivent par duplications successives d'un ancêtre commun existant il y a environ 450 millions d'années (Kalpan J.C et al, 1989).

L'ordre des gènes, de 5' en 3', au sein de chaque complexe, reflète l'ordre de leur expression séquentielle au cours de l'ontogénèse.

### 2.1. La famille des gènes $\alpha$ -globines :

Cette famille est localisée sur la partie distale du bras court du chromosome 16 où elle occupe environ 30 kb. Le gène  $\zeta$ , le plus télomérique, est le premier à être exprimé durant l'embryogenèse. Les gènes  $\alpha_2$  et  $\alpha_1$  sont exprimés dès la vie fœtale et continueront à fonctionner durant la vie adulte.

Les séquences exoniques des gènes  $\alpha_2$  et  $\alpha_1$  sont identiques, ainsi que celles de leur premier intron. Cette homologie de séquence serait le résultat de l'évolution concertée par conversion génique. Les gènes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  sont eux-mêmes insérés dans deux régions de forte homologie, d'une taille de 4 kb, détaillées en trois boîtes X, Y et Z. Trois pseudogènes,  $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha_2$  et  $\psi\alpha_1$ , s'intercalent entre  $\zeta$  et  $\alpha_2$ . Une région cis-régulatrice a été identifiée à 40 kb en amont de  $\zeta$ . Nommée HS40, elle contrôle l'expression des gènes  $\zeta$  et  $\alpha$  (Figure 3).

Le phénomène de la commutation des gènes (le switch), c'est-à-dire le passage de l'expression du gène  $\zeta$  à celle des gènes  $\alpha$ , au début de la vie fœtale, n'est pas encore clairement décrypté.

### 2.2. La famille des gènes $\beta$ -globines :

La famille des  $\beta$  globines s'étend sur environ 60 kb à l'extrémité distale du bras court du chromosome 11. Le gène  $\varepsilon$ , le plus en 5' du complexe, est le premier à être exprimé, durant la vie embryonnaire. Les gènes  $G\gamma$  et  $A\gamma$  s'expriment durant la vie fœtale (hémoglobine F:  $\alpha_2\gamma_2$ ); l'adulte présentera normalement moins de 1 % d'hémoglobine F. Leurs séquences exoniques sont identiques à une position près : le codon 136 (glycine pour la chaîne  $G\gamma$  et alanine pour la chaîne  $A\gamma$ ).

À nouveau, l'évolution concertée est évoquée pour expliquer le maintien d'une si forte homologie. Entre les paires  $G\gamma / A\gamma$  et  $\delta / \beta$  est localisé un pseudogène de type  $\beta$  ( $\psi\beta$ ) (Figure 4). L'expression du gène  $\beta$  commence dès la vie fœtale et atteindra son plateau d'expression quelques mois après la naissance. Le gène  $\delta$ ,

---

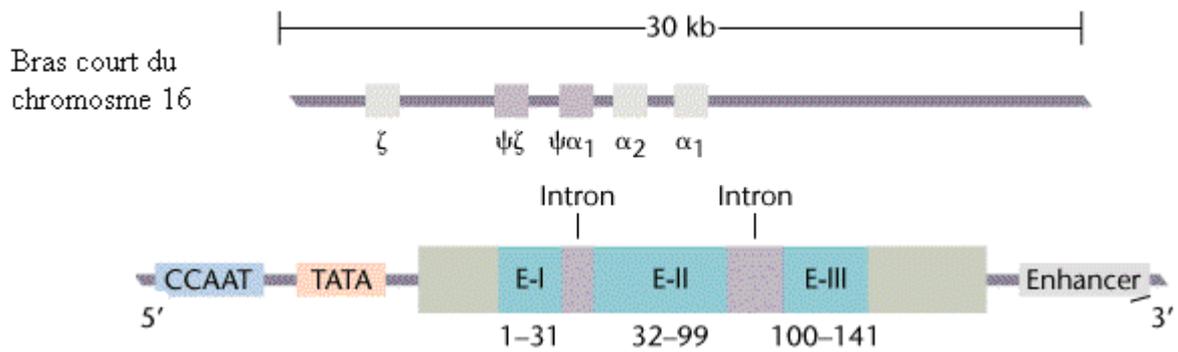
dont l'expression débute seulement après la naissance, est faiblement transcrit. Il n'intervient que pour 2 à 3% des tétramères (hémoglobine A2 :  $\alpha_2 \gamma_2$ ). De 6 à 20 kb en amont du gène  $\epsilon$ , quatre sites, HS1 à HS4 constituent la région *cis*-régulatrice distale, ou LCR (Locus control Region), du complexe  $\beta$ .

La commutation des gènes de la famille  $\beta$ , sous le contrôle des éléments du LCR entre autres, se fait en deux étapes :  $\epsilon$  vers  $G\gamma$  et  $A\gamma$ , au début de la vie fœtale, puis  $\beta$  et  $\delta$  dans la période périnatale (Bensimon C, 1999).

### **2.3. Evolution ontogénique des hémoglobines humaines :**

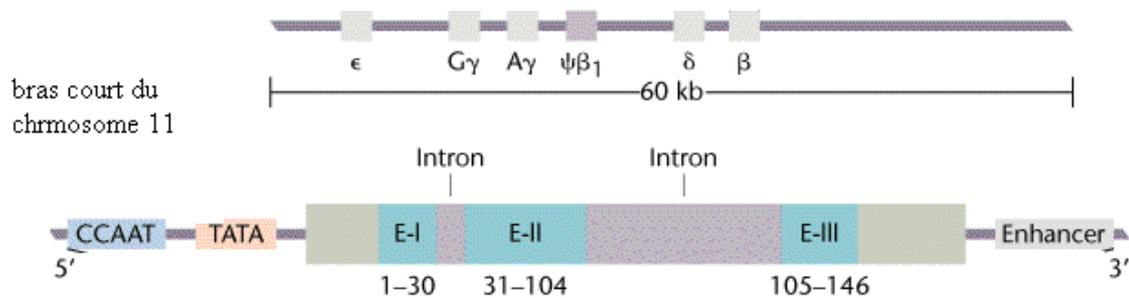
Plusieurs hémoglobines existent à l'état physiologique et se succèdent au cours du développement ontogénique, probablement pour répondre aux besoins en oxygène de l'embryon, du fœtus et de l'adulte (Hanscombe O et al, 1991).

Chez l'Homme, l'érythropoïèse débute dans la lignée primitive érythroblastique du sac vitellin dès la fin de la troisième semaine de gestation du fait de l'activation des loci  $\alpha$  et  $\beta$ . Trois hémoglobines embryonnaires sont alors successivement synthétisées : Gower 1 ( $\xi_2 \epsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2 \epsilon_2$ ) et Portland ( $\xi_2 \gamma_2$ ). Ces hémoglobines ont pu être purifiées et caractérisées récemment par l'obtention de souris transgéniques exprimant à un taux élevé les gènes codant ces protéines (He et Russell, 2001). Chez l'Homme, dès la cinquième semaine de gestation, les hémoglobines embryonnaires sont progressivement remplacées par l'hémoglobine fœtale ( $\alpha_2 \gamma_2$ ) qui devient alors majoritaire à partir de la dixième semaine de gestation et ce jusqu'à la naissance (Tableau 1) (Figure 5).



E : Zones codantes ou Exons

**Figure 3** : Organisation chromosomique du gène  $\alpha$ -globine.



E : Zones codantes ou exons.

**Figure 4** : Structure du gène  $\beta$ -globine.

L'hémoglobine fœtale est d'abord synthétisée dans le foie (jusqu'à la vingtième semaine) puis dans la rate et la moelle osseuse. Bien que les chaînes  $\gamma$  soient synthétisées à un taux largement supérieur à celui des chaînes  $\beta$  durant les trente premières semaines de gestation (rapport  $\gamma/\beta = 50/1$ ), ces dernières sont détectables à partir de la dixième semaine (Figure 5). Leur synthèse augmentera progressivement durant le développement intra-utérin. A la naissance, l'HbA représentera 10% de l'hémoglobine totale. Environ 6 mois à un an après la naissance, l'hémoglobine fœtale, du fait de la commutation hémoglobine

---

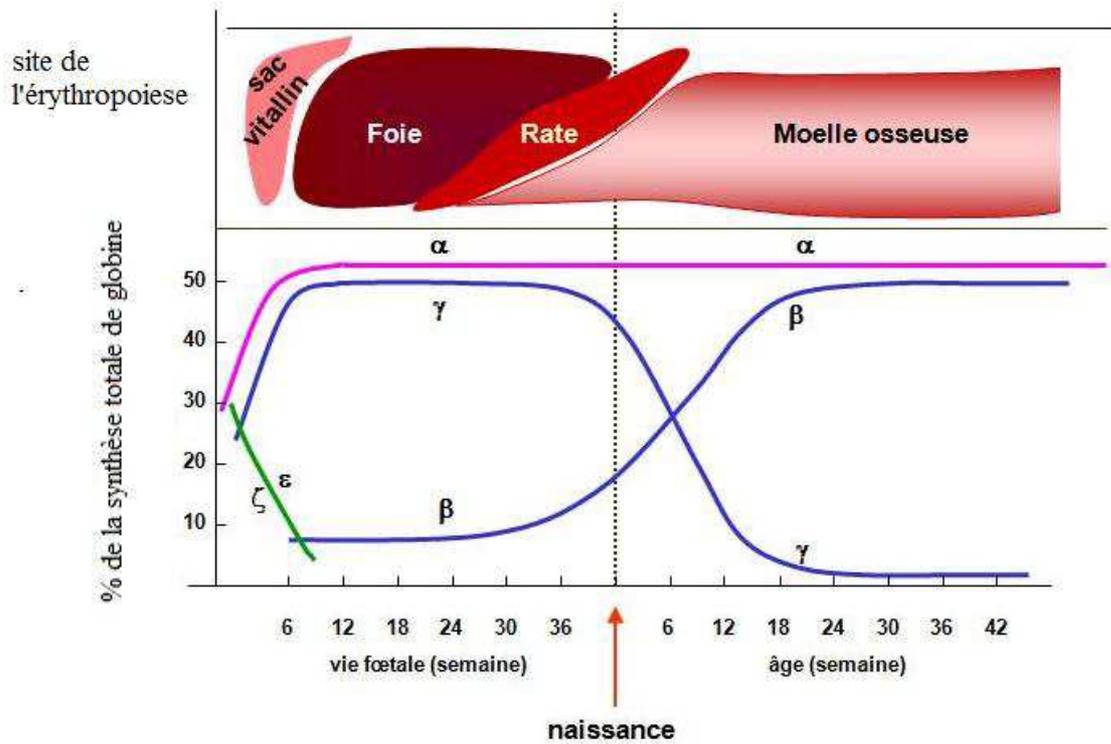
fœtale →hémoglobine adulte, chutera et ne constituera que moins de 3% de l'hémoglobine totale. A la fin de la deuxième année, le taux d'hémoglobine fœtale se stabilisera (moins de 1%), le globule rouge contient alors les taux d'hémoglobines fœtales et adultes caractéristiques du globule rouge adulte.

Parallèlement au changement des sites érythropoïétiques au cours du développement ontogénique, se produit une évolution dans la morphologie des cellules érythroïdes: dans le sac vitellin les cellules dites embryonnaires ou primitives sont nucléées alors que dans le foie fœtal et la moelle osseuse (cellules définitives) elles ne le sont plus.

L'expression de tous les gènes de la famille est coordonnée, et l'activation séquentielle des gènes embryonnaires, fœtaux et adultes implique une commutation unique embryon Fœtus pour la famille  $\alpha$ , et une double commutation : embryon → fœtus et fœtus → adulte pour la famille  $\beta$  (Zhenning He and Eric Russell J, 2001).

### **3. Alpha thalassémie :**

Les alpha-thalassémies constituent un groupe d'anomalies génétiques à transmission autosomiale. C'est un désordre de l'hémoglobine caractérisé par l'absence ou la diminution de synthèse de la chaîne  $\alpha$ -globine (Weatherall D J, 2001). La diminution de la synthèse de la chaîne  $\alpha$ -globine cause l'excès de la production de la chaîne  $\gamma$ -globine ou  $\beta$ -globine (Siala H et al, 2008).



**Figure 5 :** Evolution de la synthèse des chaînes des molécules d'hémoglobine en fonction de l'âge.

**Tableau1:** Composition protéique des différentes hémoglobines humaines.

Vie Embryonnaire	Vie Fœtale	Vie Adulte
Hb GowerI( $\zeta$ 2 $\epsilon$ 2)	Hb F ( $\alpha$ 2 $\gamma$ 2)	Hb A ( $\alpha$ 2 $\beta$ 2)
Hb GowerII ( $\alpha$ 2 $\epsilon$ 2)		Hb A2 ( $\alpha$ 2 $\delta$ 2)
Hb Portland ( $\zeta$ 2 $\gamma$ 2)		

---

L'anomalie moléculaire résulterait d'une délétion d'un ou plusieurs gènes alpha situés sur le chromosome 16. La délétion intéressant le chromosome 16 n'influence pas la synthèse des chaînes non alpha ( $\beta$  ou  $\gamma$ ) dont les gènes sont situés sur un chromosome différent (chromosome 11). Il en résulte une diminution du rapport des chaînes alpha et non alpha (Sangare A et al, 1991). Les chaînes non alpha excédentaires se combinent pour former des tétramères d'hémoglobine qui sont les stigmates biologiques de l'alpha thalassémie à l'électrophorèse :

- Le tétramère  $\beta_4$  ou HbH est surtout présent chez l'adulte et chez l'enfant après 6 mois.
- Le tétramère  $\gamma_4$  ou Hb Bart's est présent chez le nouveau-né et chez le nourrisson avant 6 mois.

### **3.1.Historique :**

Les thalassémies constituent un groupe hétérogène de maladies héréditaires. Elles se distinguent des autres anémies avec la description de COOLEY en 1925 qui a observé la présence d'une anémie avec une splénomégalie et atteintes osseuses chez 7 enfants tous du même origine Italienne. Il avait proposé que ce syndrome soit désigné comme anémie Méditerranéenne mais le nom retenu fut alors celui d'anémie de Cooley (Weatherall D J, Clegg J B, 2001).

Dans les années qui suivirent, d'autres enfants atteints du même syndrome ont été décrits aux Etats Unis et en Europe. En 1932, d'autres chercheurs ont inventés le terme de thalassémie utilisant la racine grecque « thalassa » qui signifie mer et « hémia » : sang, pour désigner cette affection.

Des études familiales, hématologiques, puis l'étude du phénotype d'expression de l'hémoglobine, ont permis d'établir une définition physiopathologique : la fonction anormale d'un gène se traduit par un déficit partiel ou total de la synthèse d'une ou plusieurs chaînes de l'hémoglobine dans la lignée érythroïde, et le démantèlement selon le gène déficient est fait en thalassémie  $\alpha$  et  $\beta$ . Et ce n'est qu'au milieu des années 1960 qu'est mis en évidence le déséquilibre de synthèse des chaînes de globines : le rapport  $\alpha/\beta$  ou  $\alpha/\text{non } \alpha$  chez le petit enfant est normalement voisin de 1 dans le cas normal c'est-à-dire que la synthèse est équilibrée. Des progrès décisifs dans la compréhension des syndromes thalassémiques

---

n'interviendront qu'au fur et à mesure de l'emploi des techniques du génie génétique au cours des années 1970.

### **3.2.Épidémiologie :**

Les thalassémies, de transmission généralement autosomique récessive, constituent un groupe de maladies héréditaires caractérisées par une diminution de la production de l'hémoglobine (Hb) normale. Elles figurent parmi les maladies génétiques les plus répandues dans le monde.

L'hémoglobine A adulte comportant quatre chaînes protéiques, deux chaînes alpha-globine et deux chaînes bêta-globine.

Les bêta-thalassémies résultent le plus souvent de mutations localisées dans le gène bêta-globine, responsables d'un défaut de synthèse des chaînes bêta-globine.

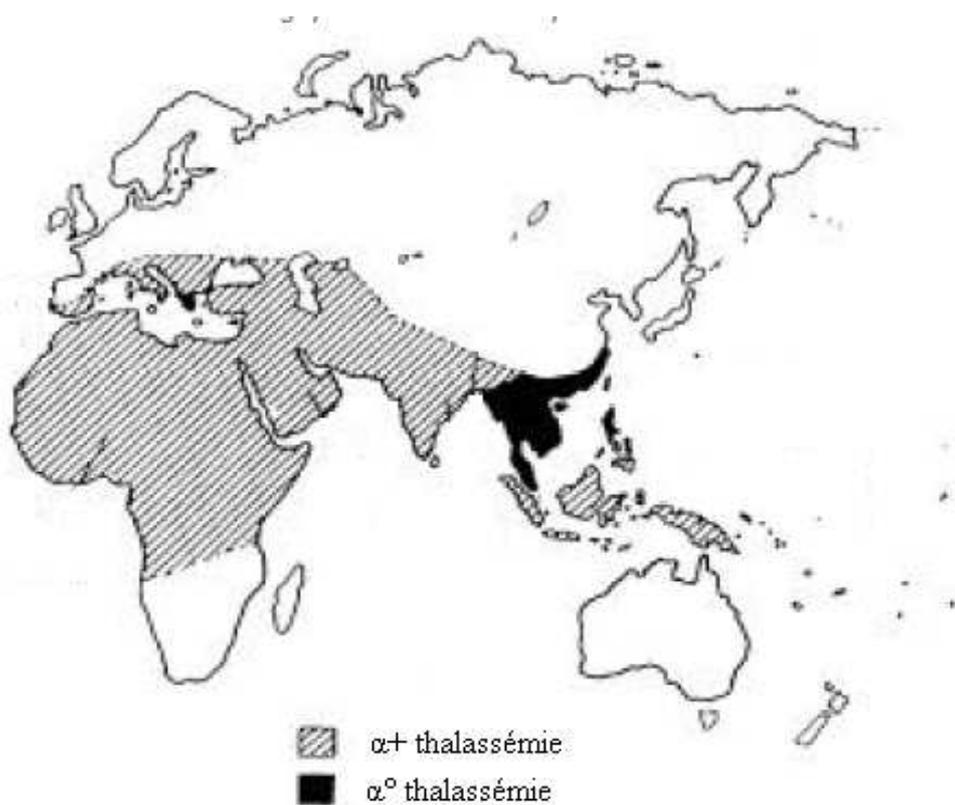
Les formes majeures de bêta-thalassémie, initialement décrites chez des enfants originaires de pays du pourtour méditerranéen, sont également très répandues en Asie du Sud-Est, en Chine, en Inde et au Moyen-Orient. Environ 10 000 patients atteints de forme sévère de bêta-thalassémie vivent actuellement en Europe et en Amérique du Nord, où le traitement transfusionnel au long cours associé au traitement chélateur du fer précoce et régulier a amélioré de plus de 30 ans leur espérance de vie. Les bêta-thalassémies sont exceptionnelles dans la population d'origine française, sauf en Corse, où l'on retrouve 3 % de sujets porteurs du trait bêta-thalassémique (hétérozygotes). Une enquête nationale récente a répertorié sur le territoire français plus de 350 patients atteints de formes de gravité majeure ou intermédiaire, principalement originaires d'Italie et d'Afrique du Nord.

Les formes mineures ou silencieuses d'alpha-thalassémies sont extrêmement fréquentes en Afrique et aux Antilles, en Asie du Sud-Est, en Inde, au Moyen-Orient et pays du pourtour méditerranéen. Les formes cliniquement symptomatiques (hémoglobinose H, *hydrops fetalis* de Bart) surviennent principalement chez des patients originaires du Sud-Est asiatique et sont très rarement rencontrées en Afrique. Elles sont exceptionnelles en France, où l'on ne dispose pas de données épidémiologiques précises (Figure 6).

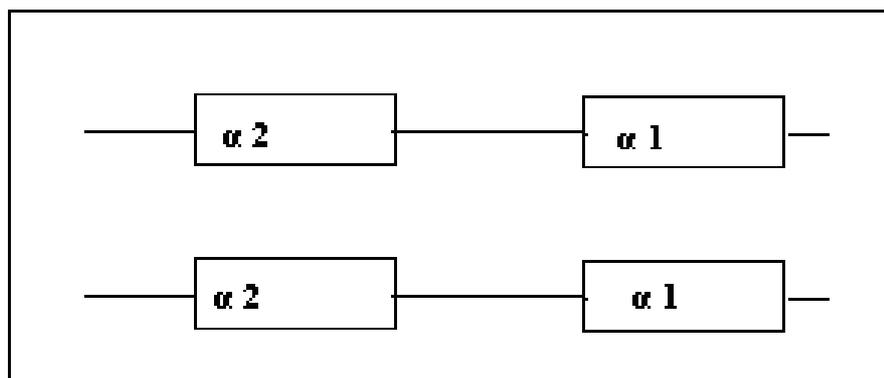
L'anomalie génétique en cause dans l'alpha-thalassémie confère une résistance naturelle au paludisme (maladie grave touchant les globules rouges, transmise par les

---

moustiques), ce qui explique qu'elle soit plus fréquente dans ces régions très exposées au paludisme.



**Figure 6** : Répartition géographique de l'alpha-thalassémie (d'après WEATHERHALL, 1996).



**Figure 7** : Organisation chromosomique des gènes de l' $\alpha$ -globine normale.

La prévalence (nombre de personnes atteintes dans une population donnée à un moment précis) de l'alpha-thalassémie varie énormément selon les régions du monde, avec

---

une prévalence allant de 1 personne atteinte par million d'habitants dans les pays du nord à 1 sur 10 000 dans les pays du sud. En France, environ 200 personnes sont atteintes de la forme intermédiaire (hémoglobine H), soit une prévalence de 1 personne sur 350 000 (Guide médecin de la HAS. 2008).

### **3.3.L' $\alpha$ -thalassémie et les génotypes associés :**

Le génome humain comporte quatre gènes alpha-globine, deux gènes (alpha-1 et alpha-2) sur chaque chromosome 16 (Figure 7). Les alpha-thalassémies résultent le plus souvent de délétions concernant, un ou deux gènes alpha (Figure 13) (Tableau 2). La région chromosomique qui porte les deux gènes  $\alpha$  contient plusieurs segments homologues, ce qui permet une recombinaison facile aboutissant à la délétion d'un gène  $\alpha$  et l'absence de la synthèse de la chaîne correspondante. La production de chaîne  $\alpha$  est plus ou moins bien compensée selon que le gène qui persiste est  $\alpha 1$  ou  $\alpha 2$ . Elles sont plus rarement la conséquence de mutations ponctuelles ou d'insertions dans un gène alpha, c'est par exemple le cas de la mutation *Constant Spring*, située dans le gène alpha-2. Le gène alpha-2 étant normalement exprimé deux à trois fois plus que le gène alpha-1, les mutations intéressant le gène alpha-2 entraînent des anémies plus sévères que les mutations du gène alpha-1 (Harteveld C.L et Higgs D.R. 2010).

La diminution de synthèse des chaînes alpha aboutit au stade fœtal à la formation de tétramères gamma-4 (Hb Bart), que l'on peut détecter à la naissance dans toutes les formes d'alpha-thalassémies. Au stade adulte (adulte et chez l'enfant après 6 mois), la formation de tétramères bêta-4 ou HbH n'est observée que dans les formes sévères (hémoglobine H) (Siala H et al, 2008).

Du point de vue génétique 4 types d'alpha thalassémie sont décrits classiquement :

#### *3.3.1. $\alpha$ - thalassémie silencieuse ou de type 2, $-\alpha/\alpha$ :*

L'alpha thalassémie silencieuse ou alpha 2 thalassémie ou  $\alpha$ -thalassémie hétérozygote inapparente désigne la délétion d'un seul gène  $\alpha$ -globine, laissant intact l'autre gène  $\alpha$ -globine de ce chromosome ( $\alpha$ -/ $\alpha$ ). Elle se définit à la naissance par un taux d'Hb Bart's variant de 1 à 4 %. Cette hémoglobine anormale disparaît après 6 mois de naissance.

Chez ces patients on estime que la synthèse de chaînes  $\alpha$  est diminuée de 10 -15%, ils sont connues sous le nom de « porteurs muets ». Ces personnes sont asymptomatiques et présentent généralement des résultats hématologiques normaux dans le cadre de l'analyse habituelle : hémogramme normal (parfois discrète

microcytose). Electrophorèse de l'hémoglobine normale chez l'adulte ; on peut mettre en évidence 1% d'hémoglobine Bart's à la naissance.

En général, le diagnostic d' $\alpha$ -thalassémie à délétion d'un seul gène ne peut être prouvé que par dépistage moléculaire (ADN).

### 3.3.2. $\alpha$ -thalassémie mineure ou de type 1 $--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$ :

L' $\alpha$ -thalassémie mineure ou alpha 1 thalassémie ou alpha thalassémie hétérozygote apparente désigne une délétion des deux gènes  $\alpha$ -globines sur le même chromosome : Deux gènes  $\alpha$  sont perdus :  $\alpha^0$  thalassémie hétérozygote ( $--/\alpha\alpha$ ) (figure 10), ou  $\alpha^+$  thalassémie homozygote ( $-\alpha/-\alpha$ ) (figure 9b) (hémogramme identique dans les 2 cas). Elle est caractérisée à la naissance par un taux d'Hb bart's variant de 5 à 10 %. Cette Hb Bart's disparaît après 6 mois faisant place à une formule électrophorétique normale (quelquefois diminution de A2 : < 2%, et hémoglobine F normale).

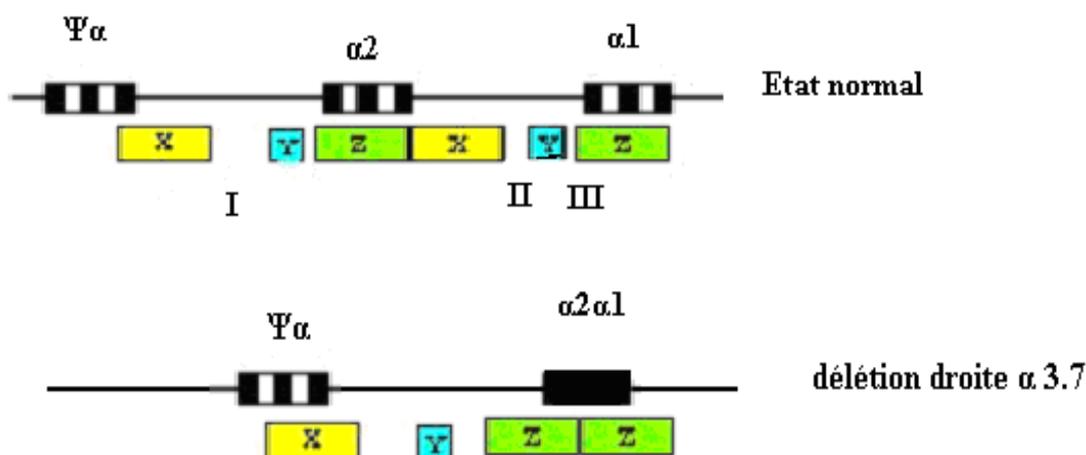
#### o $\alpha^+$ thalassémie :

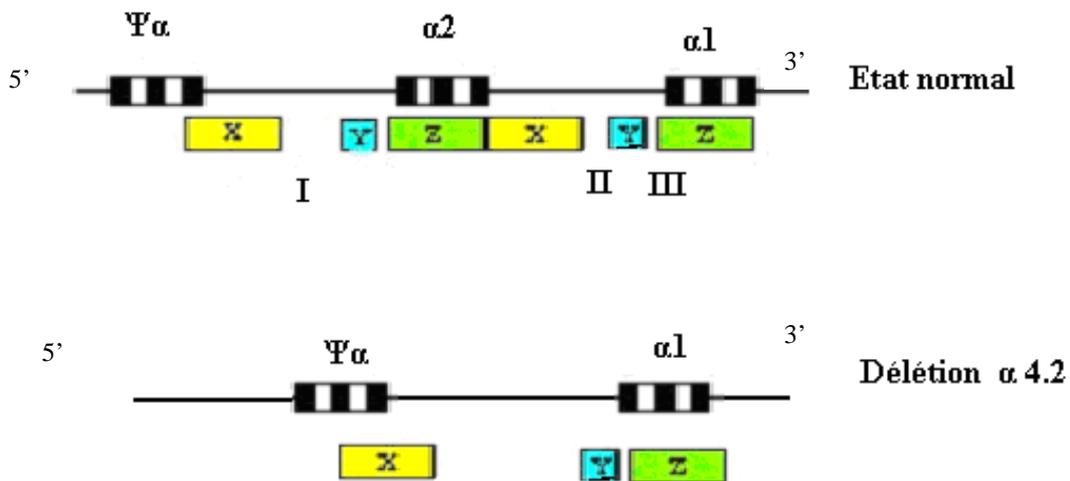
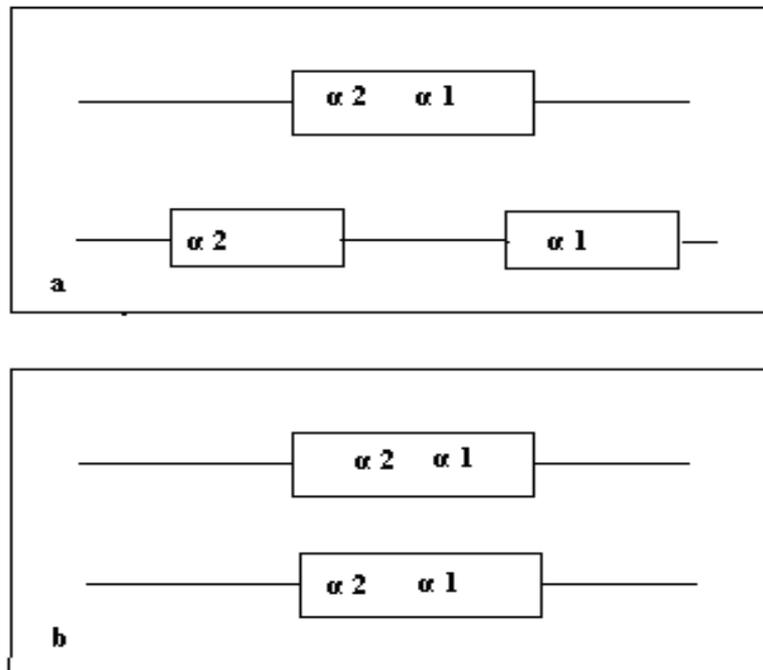
Les études du génome normal ont montré qu'il existe au niveau des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  des zones d'homologie débordant le gène lui-même et s'étendant sur environ 4 kb.

Un appariement non homologue au cours de la méiose est la meilleure explication de l' $\alpha^+$  thalassémie.

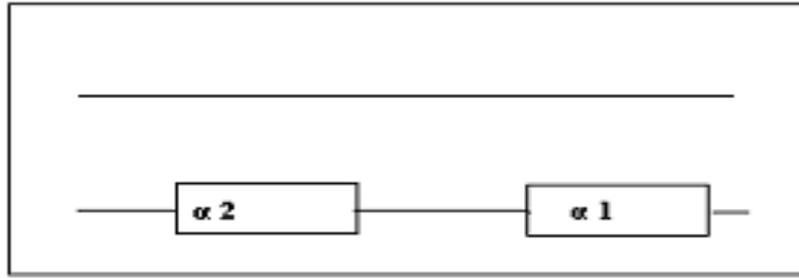
Des études cartographiques par plusieurs enzymes de restriction ont montré deux variantes principales résultant d'erreur d'alignement entre les zones X et Z :

- Une forme droite d'environ 3.7 kb, le gène restant est un gène recombinant résultant de la fusion des deux gènes consécutifs à la délétion d'un fragment de 3.7 kb limité par deux zones d'homologie. La partie 5' de ce gène provient du gène  $\alpha 2$  et sa région 3' du gène  $\alpha 1$ , c'est un glissement  $Z \rightarrow Z$  (Figure 8a) (Dodé C et al, 1992).
- Une forme gauche dans laquelle la région délaîtée recouvre 4.2 kb emportant le gène  $\alpha 2$  et seul subsiste le gène  $\alpha 1$  (glissement  $X \rightarrow X$ ) (Figure 8b) (E .Baysal et al, 1994).



**Figure 8 a** : Mécanisme de la délétion  $\alpha$  3.7**Figure 8b**: Mécanisme de la délétion  $\alpha$  4.2**Figure 9** : Forme délétionnelle responsable d'une  $\alpha$  + thalassémie.

- a. Forme hétérozygote.
- b. Forme homozygote.



**Figure 10** : Forme délétionnelle responsable d'une  $\alpha$ °thalassémie.

---

○ *l'α°thalassémie :*

Les formes délétionnelles responsables d'une α°thalassémie sont également hétérogènes (Figure 10). Plusieurs délétions ont été décrites qui toutes atteignent les deux gènes alpha en cis. Les délétions responsables d'α°thalassémie emportent donc un fragment du chromosome comportant les deux gènes α. Il en existe plusieurs types qui se caractérisent par des limites et des tailles différentes. Les trois plus fréquentes sont les délétions MED (Méditerranéenne), SEA (Sud Est Asiatique), et Thai (Thailand) (Badens C et al, 2000)

*3.3.3. Hémoglobine H : 3 gènes α atteints -α/- :*

La maladie à hémoglobine H correspond à la délétion de 3 gènes alpha (Figure 11), les manifestations sont le plus souvent modérées et, seulement dans de rares cas, sévères.

Les stigmates électrophorétiques sont identifiables à tout âge. Son diagnostic repose sur :

- À la naissance d'un taux d'Hb Bart's variant de 20 à 40 %,
- Après 6 mois et chez l'adulte sur un taux d'HbH variant de 10 à 30 %.

Chez ces patients on estime que la synthèse de chaînes α est diminuée de 40 - 80 %.

La synthèse excessive de chaîne β par rapport au défaut de chaîne α entraîne la formation de complexes β<sub>4</sub> (= Hb H) peu stables qui précipitent (Siala H et al, 2008).

*3.3.4. Hydrops foetalis -/- :*

L'hydrops foetalis correspond à la délétion des 4 gènes alpha (Figure 12). C'est une α°-**thalassémie homozygote dont aucun gène n'est fonctionnel** (incompatible avec la vie extra-utérine) conduit à une anémie et une hypoxie tissulaire majeure dès la période fœtale, entraînant en règle la mort *in utero* ou à la naissance dans un tableau d'anasarque fœto-placentaire. Il se définit à la naissance par une anémie majeure avec hémoglobine = 3 - 8 g/dl et VGM < 80 - 90 fl, et une proportion d'Hb Bart's de l'ordre de 80 à 90 %. Le fœtus ne peut produire ni Hb F ni Hb A, et l'Hb Bart γ<sub>4</sub> ne fixe pas l'O<sub>2</sub>, ce qui explique l'incompatibilité avec la vie extra utérine (Weatherall D J, 2001).

**Tableau 2:** Classification des mutations délétionnelles responsable de l' $\alpha$ -thalassémie (d'après Bain BJ, 2006).

(d'après Bain BJ, 2006).

Type de délétion		Phénotype	Nombre d'exemples reconnus	Exemples
<b>Délétion <math>\alpha</math> impliquant un ou deux gènes</b>	Délétion de tout ou d'une partie du gène $\alpha$	$\alpha^+$ thalassémie	7	$-\alpha 4.2, -\alpha 3.71, -\alpha 3.7H, -\alpha 3.7III, -\alpha 3.5, -\alpha 5.3, -\alpha 2.7$
	Délétion de tout ou une partie des deux gènes $\alpha$ , mais sans délétion de HS-40	$\alpha^\circ$ thalassémie	20	$-\text{SEA}, -\text{THAI}, -\text{MED}, -\text{FIL}, -\text{BRIT}, -\text{SPAN}, -(\alpha)20.5, -(\alpha)5.2$
	Délétion des deux gènes $\alpha$ et de HS-40 (100-250 kb)	$\alpha^\circ$ thalassémie	8, sans autres anomalies phénotypique	$-\text{DUTCH11}$
	Une perte importante de 16p13.3 inclus les deux gènes $\alpha$ et HS-40	$\alpha^\circ$ thalassémie	17, avec un retard mental et une dysmorphie	$-\text{BO}$
	Délétion du gène $\alpha 1$ et 18-20 ko en aval du gène $\alpha 1$	$\alpha^\circ$ thalassémie	1	$(\alpha)-\text{ZF}$
<b>Délétion laissant les gènes <math>\alpha</math> intacts</b>	<b>Délétion de grand élément de régulation en amont (HS-40), sans délétion des gènes</b>	<b><math>\alpha^\circ</math> ou très grave <math>\alpha^+</math> thalassémie</b>	<b>12</b>	<b><math>(\alpha\alpha)\text{RA}, (\alpha\alpha)\text{TAT}, (\alpha\alpha)\text{MM}, (\alpha\alpha)\text{IJ}</math></b>

### 3.3.5. Mutations non délétionnelles :

Il existe de rares mutations non délétionnelles qui affectent la production d' $\alpha$ -globine, telles que l'Hb Quong Sze et l'Hb Constant Spring. En gros, ces mutations sont semblables aux formes délétionnelles

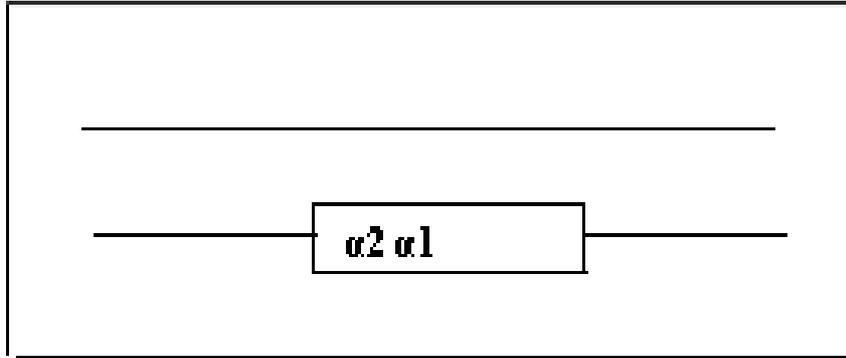
---

plus courantes de l' $\alpha$ -thalassémie; cependant, certaines d'entre elles sont plus graves sur le plan clinique : par exemple, une patiente présentant une délétion de deux gènes  $\alpha$ -globine et une mutation d' $\alpha$ -globine Constant Spring concomitante (et, donc, un génotype  $\alpha$ -/ $\alpha$ CS- ou  $\alpha\alpha$ CS/—) sera habituellement plus gravement affectée et nécessitera plus de soutien transfusionnel qu'une patiente présentant une maladie. Les lésions identifiées ne touchent qu'un seul des deux gènes  $\alpha$ , et même à l'état homozygote elles ne peuvent produire qu'un seul syndrome de types  $\alpha 2$  thalassémique.

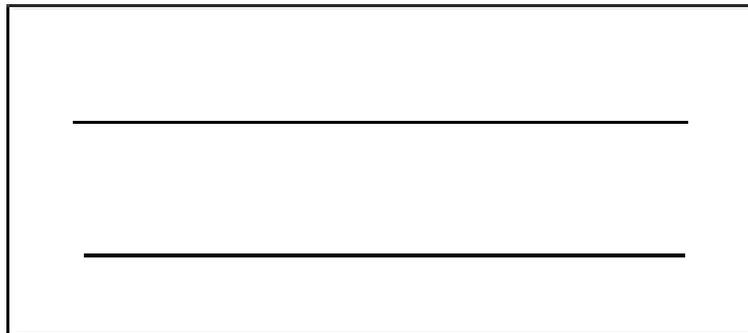
L'hémoglobine *Constant Spring* résulte d'une mutation du codon non sens terminal normalement présent en position 142. Celui-ci est remplacé par un codon traductible, et la chaîne  $\alpha$  se trouve allongée de 31 résidus par lecture de la séquence 3' de l'ARN jusqu'au codon stop non sens suivant. Cette chaîne allongée est produite à très faible taux et se traduit au niveau phénotypique comme la délétion d'un gène (Vichinsky E.P, 2009).

D'autres formes d' $\alpha$  thalassémie non délétionnelles ont été décrites et elles sont dues soit à un :

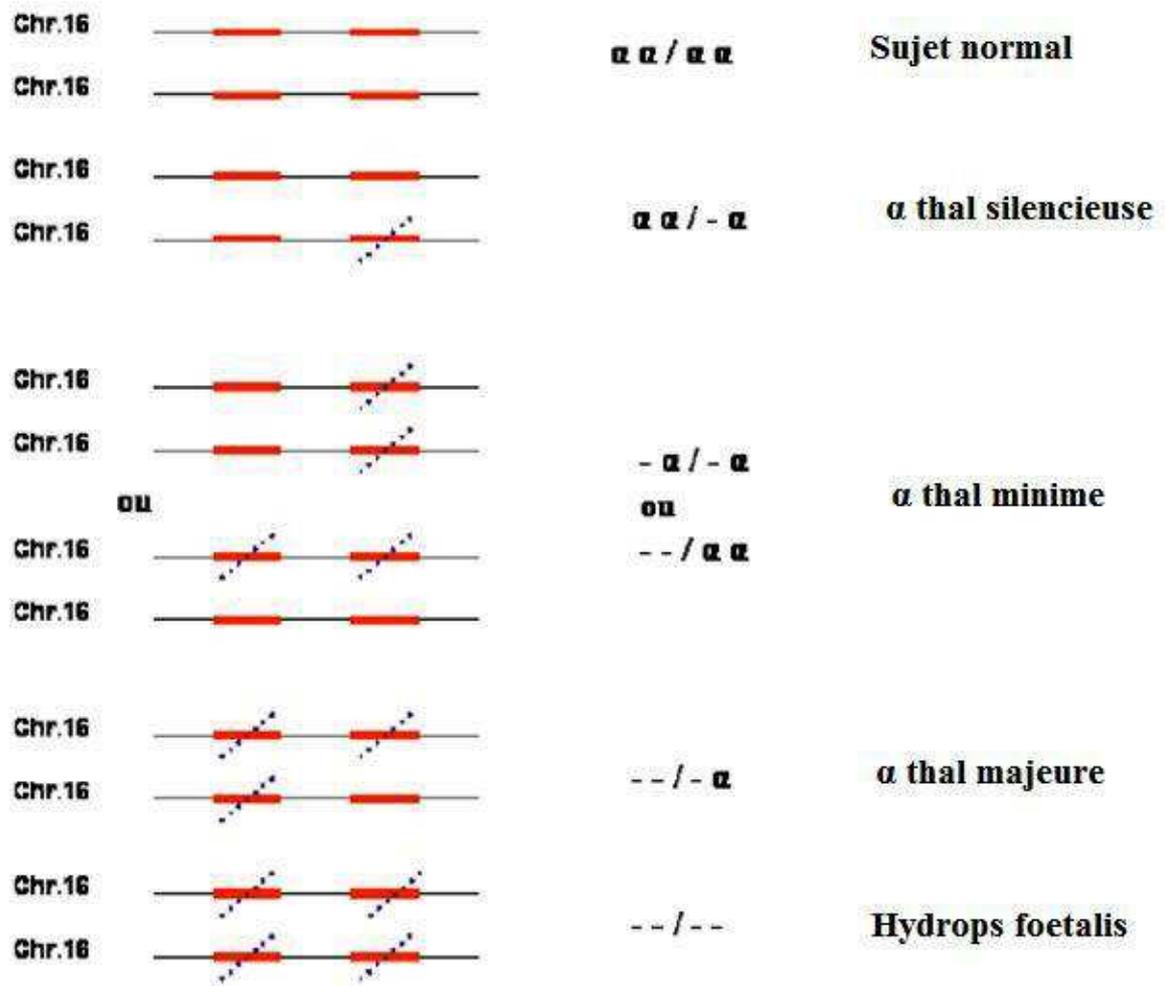
- RNA messenger non fonctionnel, par mutation décalante dans le codon 14 du gène  $\alpha 1$  (Arabie Saoudite) ou par mutation ATG---AGG dans le codon d'initiation du gène  $\alpha 2$  (Méditerranée).
- Epissage alternatif, par délétion de 5 nucléotides au début du premier intron du gène  $\alpha 2$ .
- Perturbation de la maturation de l'extrémité 3' du messenger, par mutation AATAAA-----AATAAG dans le signal de polyadénylation du gène  $\alpha 2$ .



**Figure 11** : Forme délétionnelle responsable d'une Hémoglobinose H.



**Figure 12** : Forme délétionnelle responsable d'un Hydrops foetalis.



**Figure 13 :** La délétion d'un ou plusieurs gènes  $\alpha$  aboutit à divers phénotypes.

---

### 3.4. Description clinique et Diagnostic :

Le diagnostic de l'alpha-thalassémie peut être pratiqué à la naissance : ce diagnostic néonatal utilise 3 types d'analyse :

- l'*hémogramme* (appelé aussi Numération Formule Sanguine ou NFS) qui permet d'étudier le nombre et l'aspect des globules rouges, ainsi que la quantité d'hémoglobine totale dans le sang.
- les *analyses biochimiques* de l'hémoglobine qui renseignent sur la forme de l'hémoglobine (techniques d'électrophorèse, de chromatographie liquide).
- les *analyses génétiques* qui permettent de rechercher les anomalies des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ .

Dans le cas de l'alpha-thalassémie silencieuse, l'hémogramme est normal (pas d'anémie, globules rouges de taille et de coloration normales) et les analyses ne montrent aucune anomalie de l'hémoglobine. Elle ne peut donc être diagnostiquée que par les analyses génétiques.

L'alpha-thalassémie mineure présente un hémogramme avec des globules rouges petits (microcytaires) et peu colorés (hypochromes). Le taux d'hémoglobine est normal ou très légèrement abaissé (anémie très modérée). Les analyses biochimiques ne révèlent pas la présence d'une hémoglobine anormale et la confirmation du diagnostic peut faire appel aux analyses génétiques.

Dans l'hémoglobinosose H, l'hémogramme montre que la quantité de globules rouges et d'hémoglobine est généralement diminuée. Dans ce cas, le taux d'hémoglobine est généralement voisin de 70 à 90 grammes par litre (g/l) alors que, chez une personne saine, il est compris entre 110 et 180 g/l (les valeurs sont plus faibles chez l'enfant que chez l'adulte (Fucharoenl S and Viprakasit V. 2009).

Une étude au microscope d'un échantillon de sang permet de voir que les globules rouges sont plus petits (microcytose) et peu colorés (hypochromes). Les analyses biochimiques révèlent la présence de l'hémoglobine anormale H, dont la proportion peut atteindre 30% de l'hémoglobine totale (Fucharoenl S and Viprakasit V. 2009).

Le diagnostic dans la forme majeur de l'alpha thalassémie ou Hydrops fetalis est souvent fait pendant le dernier trimestre de la grossesse. On détecte l'anasarque (œdème du fœtus) par échographie : le fœtus ou certains de ses organes sont « gonflés », en raison de l'accumulation de liquide. Enfin, les mouvements du bébé peuvent diminuer fortement, voire s'arrêter, ce qui peut alerter la mère et provoque un décès fœtale ou néonatal, le risque d'avortement apparaît dès la deuxième moitié de la grossesse.

Le diagnostic peut être prénatal si le couple a un risque de donner naissance à un enfant atteint d'une forme sévère d'alpha-thalassémie (risque d'hydrops fetalis ou si les parents ont eu un premier enfant atteint d'une forme sévère d'hémoglobinosose H), il est possible de réaliser un diagnostic prénatal à chaque grossesse. Le but du diagnostic prénatal est de déterminer au cours de la grossesse si l'enfant à naître est porteur ou non de la maladie.

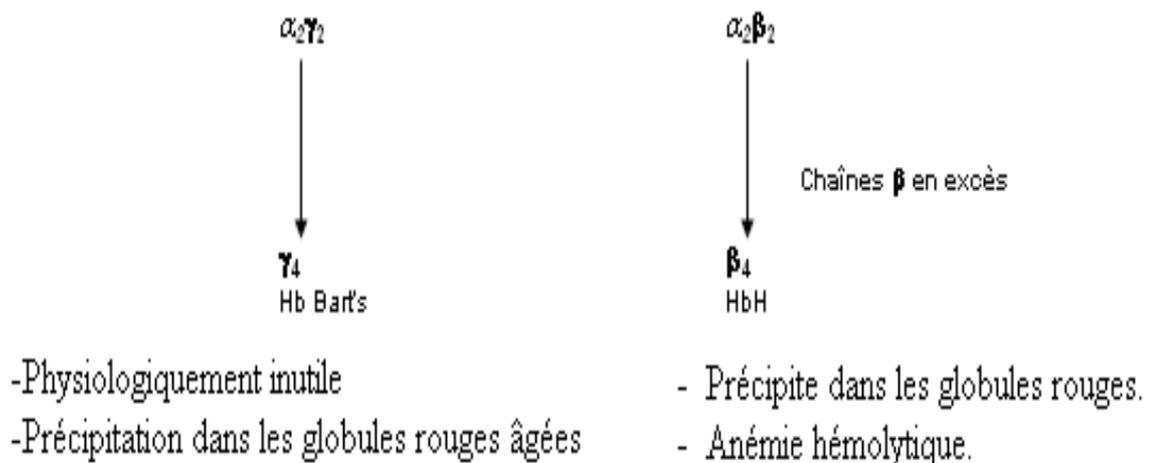
Il consiste à rechercher les anomalies génétiques (mutations des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  chez le foetus), à l'aide d'un prélèvement de villosités choriales ou d'une amniocentèse. Si le foetus est porteur de la forme sévère de la maladie, l'interruption de grossesse est recommandée.

Les techniques plus récentes de diagnostic pré-implantatoire (DPI) ont déjà été appliquées à la thalassémie, dans des cas très particuliers. Le DPI consiste à rechercher l'anomalie génétique responsable de la

maladie sur des embryons obtenus par fécondation in vitro. Cette technique permet de sélectionner les embryons qui n'ont pas l'anomalie génétique pour les implanter dans l'utérus et éviter ainsi aux parents d'avoir recours à un diagnostic prénatal, suivi éventuellement d'une interruption médicale de grossesse (Eleftheriou A. 2007).

### 3.5. Physiopathologie :

Plusieurs défauts moléculaires ont été décrits à l'origine de syndromes thalassémiques. Si les chaînes alpha ou bêta de l'hémoglobine sont synthétisées de manière inefficace, il sera impossible de produire des quantités suffisantes d'hémoglobine adulte ou fœtale ou les deux : ainsi tous les syndromes thalassémiques sont caractérisés par une anémie hypochrome. Dans l'alpha-thalassémie, il y a un excès de production de chaînes gamma ou bêta (Figure14). Une alpha-thalassémie est caractérisée par un rapport alpha/non alpha inférieur à 1. Les chaînes gamma ou bêta produites en excès dans l'alpha-thalassémie forment des tétramères anormaux, les hémoglobines Bart's et H. Ainsi, le degré d'érythropoïèse inefficace est moindre dans l'alpha-thalassémie même si les hémoglobines Bart's et H sont peu utiles et tendent à précipiter dans les populations de globules rouges les plus âgées. Ceci explique les différences de physiopathologie entre les thalassémies alpha et bêta.



**Figure14** : Physiopathologie des alpha-thalassémies.

---

L'anémie va s'accompagner d'une hypersécrétion d'érythropoïétine et d'une expansion érythroblastique responsable des déformations osseuses.

L'expression clinique est variable allant d'une anémie hémolytique chronique modérée (pâleur, ictère, hépatosplénomégalie) dans la plupart des cas à une anémie plus sévère nécessitant des transfusions répétées (Weatherall D.J, 2001).

### **3.6.Le traitement, la prise en charge et la prévention :**

Les enfants atteints de thalassémie sont souvent en bonne santé à la naissance, mais présentent une anémie entre six mois et deux ans. Sans diagnostic et sans traitement, la plupart meurent d'une anémie ou d'infections contractées dans les premières années de la vie. Les malades atteints de la thalassémie ont régulièrement besoin de transfusions de globules rouges (une ou deux fois par mois) pour maintenir une concentration d'hémoglobine moyenne d'environ 9,0 à 10,5 g/dl. Ce traitement permet d'améliorer leur santé, mais malheureusement uniquement à court terme. Du fait des nombreuses transfusions qu'ils reçoivent au cours des années, divers organes présentent une importante surcharge en fer et, si l'on veut éviter le décès au cours de l'adolescence, il est indispensable de pratiquer régulièrement des perfusions sous-cutanées d'un agent chélateur du fer. Lorsqu'on démarre précocement un traitement associant transfusions et agent chélateur du fer et qu'on le poursuit, la qualité de vie du malade peut être très bonne et le pronostic optimiste. De nombreux malades recevant ce traitement associé ont aujourd'hui atteint la trentaine ou la quarantaine et, dans les pays à revenu élevé, leur espérance de vie augmente régulièrement pour rattraper les valeurs normales.

Le traitement de la thalassémie pose encore de nombreux problèmes. La mise au point d'un agent chélateur du fer pour voie orale, plus largement accessible et acceptable, pourrait permettre de résoudre le problème de l'observance du traitement dans les pays disposant de ressources limitées où la morbidité et la mortalité sont principalement dues à un accès limité aux soins médicaux appropriés.

Ces patients nécessitent une supplémentation régulière en acide folique, une prise quotidienne d'acide folique (vitamine B9) permet d'éviter l'aggravation de l'anémie. L'acide folique est une vitamine nécessaire à la fabrication des globules rouges par la moelle osseuse. Chez la personne thalassémique, leur fabrication est accrue et les besoins en acide folique sont donc plus importants.

Par ailleurs, une prise en charge clinique rigoureuse améliore grandement la qualité de vie des malades atteints de thalassémie et augmente leur espérance de vie. Toutefois, les sujets plus âgés sont aux prises avec de multiples affections, notamment une ostéoporose précoce, une cardiopathie, une hypertension pulmonaire et un diabète, dont certaines résultent d'un dépôt accru de fer dans les glandes endocriniennes et les cellules du myocarde. A cause des complications associées aux maladies chroniques de l'hémoglobine et des années d'incapacité qui en résultent, les hémoglobinopathies sont en passe de devenir un problème de soins de santé grandissant dans toutes les régions touchées mais plus particulièrement dans le monde en développement.

Les modalités d'une prévention efficace de la thalassémie ont désormais été mises en évidence dans de nombreux pays à l'aide de divers programmes de dépistage des porteurs en plus de l'acceptation de l'interruption de grossesses dont on a montré que le fœtus était porteurs d'une maladie génétique grave. Par exemple, à

---

Chypre, en Grèce, en Italie et en République islamique d'Iran, le dépistage prénuptial de la thalassémie est une pratique courante et l'on dispose des données d'audits nationaux; la plupart des couples à risque sont identifiés à temps pour se voir offrir un diagnostic précoce au cours de la première grossesse. La majorité d'entre eux ont recours à ce service et ont des enfants en bonne santé. Au Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord et dans les autres pays du nord-ouest de l'Europe où le diagnostic prénatal est en général disponible, un dépistage est offert au cours de la grossesse. Les programmes de dépistage doivent être appuyés par des campagnes de sensibilisation de grand public et par des structures réglementaires de façon que chaque individu puisse prendre des décisions éclairées et que les personnes puissent être protégées contre toute discrimination qui résulterait des résultats de leur test (Rapport de l'OMS, 2001).

#### **4. But du travail :**

Les thalassémies sont des anémies hémolytiques héréditaires les plus répandues dans le monde et dont la distribution tend à devenir mondiale, et a une présentation clinique assez variable allant de l'absence de manifestations à l'anémie profonde et létale dans la première année de vie.

Le Maroc fait partie des principaux pays méditerranéens touchés par la thalassémie. Il est classé comme le 28ème pays dans le monde. La prévalence des porteurs du trait bêta-thalassémiques est de 3% et le nombre de porteurs de la bêta-thalassémie atteint 445 (Agouzal M et al, 2010).

Jusqu'à présent nous ne disposons d'aucune information contenant la prévalence et les données moléculaires de l'alpha-thalassémie. Notre travail s'inscrit dans ce contexte il a pour but de déterminer la prévalence dans la région Tanger –Tétouan-Larache de deux types de délétions  $\alpha 3.7$  et  $\alpha 4.2$  qui sont fréquentes dans le bassin méditerranéen. Notre étude concerne des échantillons prélevés à partir du sang du cordon ombilical des nouveaux-nés et comporte deux volets principaux :

- Etude phénotypique des nouveaux-nés ou Examen hématologique et biochimique permettant le tri des sujets soupçonnés d'être alpha-thalassémiques.
- Recherche de deux types de délétion responsable de l' $\alpha$ -thalassémie  $\alpha 3.7$  et  $\alpha 4.2$ .

# **MATERIEL ET METHODES**

---

## 1. Sujets étudiés :

Cette étude a été réalisée sur une période de 7 mois (du 01 Juin au 30 Août 2009 et du 01 Février au 30 Mai 2010) à partir de 450 échantillons de sang de cordon ombilical des nouveaux-nés provenant de différentes sources hospitaliers :

- Hôpital Mohamed V de Tanger,
- Hôpital Mohamed VI de Tanger,
- La clinique mutualiste de Tanger,
- La clinique Tingis de Tanger,
- La clinique de Croissant Rouge de Tanger et Tétouan,
- L'hôpital civil de Tétouan,
- Hôpital Princesse Lalla Meriem de Larache,

Le prélèvement a été réalisé par des sages femmes à partir du cordon ombilical des nouveaux-nés. Le sang de cordon est issu du placenta et prélevé au niveau du cordon ombilical immédiatement après la naissance de l'enfant après que la maman est donnée son consentement. Il est recueilli sur un anticoagulant, l'EDTA. Le volume prélevé varie entre 5 et 10 ml.

L'examen hématologique nécessite un prélèvement de sang frais ou conservé à +4 °C, le délai de conservation ne doit pas dépasser une semaine (Vaubourdolle M, 2007 ).

L'extraction d'ADN a été effectuée sur du sang frais ou conservé à -20°C et concerne les échantillons suspects de porter un trait thalassémique.

## 2. Méthodes :

### 2.1. Etude phénotypique ou Examen hématologique :

#### 2.1.1. La numération formule sanguine (NFS) :

La numération formule sanguine ou hémogramme est un examen essentiel qui apporte des renseignements sur les cellules sanguines, sur les processus de défense immunitaire, sur l'hémostase et qui révèle des modifications évocatrices d'un grand nombre de maladies.

---

Elle comprend la numération (calcul du nombre absolu de ces différentes cellules dans un certain volume de sang) des différents éléments figurés du sang: les globules rouges ou hématies, les globules blancs ou leucocytes et les plaquettes.

Différents paramètres très utiles au diagnostic d'une anémie sont également mesurés ou calculés à savoir le taux d'hémoglobine, le volume globulaire moyen (VGM), l'hématocrite, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH).

Dans ce travail la numération formule sanguine a été réalisée par deux méthodes :

**a. METHODE MANUELLE : COMPTAGE DES GLOBULES ROUGES**

La méthode manuelle repose sur le comptage des globules rouges d'un sang dilué dans un liquide isotonique, le comptage des hématies se fait au microscope, dans une cellule hématimètre qui est sous forme d'une cellule en verre calibrée, et on calcule le nombre par litre de sang.

Il existe différents types d'hématimètres. Ils diffèrent par leur quadrillage, mais tous permettent de compter, dans un volume précis et connu, les globules blancs, les globules rouges et les thrombocytes. Lors de notre travail nous avons utilisé la cellule dite « Thoma » qui est formée de 16 grands carrés, composés chacun de 16 petits carrés (figure15).

Le comptage est réalisé en aspirant le sang à l'aide d'une micropipette; la plus utilisée est la micropipette Potan (figure16); jusqu'à la marque 0,5 de la pipette, en suite en aspirant le liquide de dilution qui doit être neutre et isotonique pour éviter tout type d'hémolyse.

Le mélange est ensuite homogénéisé par retournement de la pipette, les 4 à 5 premières gouttes sont rejetées, en suite une goutte de l'échantillon dilué est rentré par capillarité entre l'hématimètre et la lamelle. La goutte ne doit pas déborder dans les rigoles de l'hématimètre et elle doit recouvrir complètement et d'un seul coup toute la surface quadrillée de l'hématimètre.

Après 5 à 10 minutes le comptage des globules rouges est effectué à l'objectif 40 X dans quatre ou cinq rectangles opposés. Le nombre de globules rouge est donné par la relation suivante :

$$N \times 1/D \times V$$

N : la moyenne des GR dans les 5 rectangles

D : la dilution effectuée

V : le volume d'un grand carré

---

Les nouveaux nés normaux présentent une valeur des hématies entre  $4,1$  et  $6,1 \cdot 10^{12}$  hématies par litre de sang.

Cet examen isolé oriente vers une anémie (pas assez de globules) ou une polyglobulie (trop de globules). Il permet aussi de voir s'il y a des formes anormales (poïkilocytes, schizocytes, hématies falciformes).

#### **b. HEMOGRAMME PAR AUTOMATE :**

Auparavant, la numération s'effectuait par une technique au microscope en utilisant des cellules quadrillées et graduées: cellules de Malassez ou cellules de Thoma. Actuellement, la numération est effectuée à l'aide d'automates qui utilisent des principes divers, mais sont d'une grande précision puisqu'ils comptent pour la plupart environ  $10\ 000$  cellules. Les examens sont effectués à partir d'un prélèvement sanguin, le plus souvent sur EDTA qui est un chélateur du calcium. Ceci évite la formation de caillot dans le tube. La présence d'un caillot induit des résultats erronés.

##### *2.1.2. Dosage d'hémoglobine :*

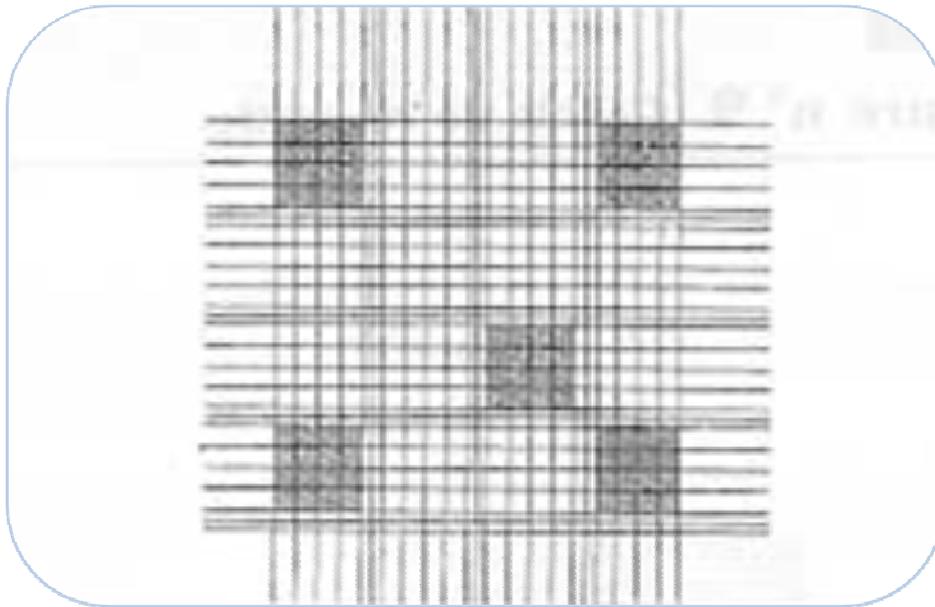
L'hémoglobine est le pigment rouge des hématies. Elle est formée de chaînes protéiniques et de molécules enfermant du fer. Elle apporte l'oxygène aux cellules tissulaires du corps.

Plusieurs méthodes colorimétriques sont utilisées pour déterminer la concentration de l'hémoglobine dans le sang. Nous avons utilisé la méthode du cyanméthémoglobine (ou méthode de Drabkin) car elle est facile à réaliser et permet de doser l'hémoglobine sous toutes ses formes.

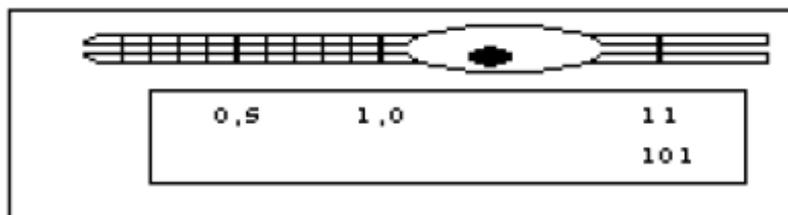
Sous l'action de Ferricyanure de Potassium, le fer ferreux de l'hémoglobine est transformé en fer ferrique (méthémoglobine) qui se combine avec le cyanure pour former la cyanméthémoglobine, pigment stable à une longueur d'onde de  $540\text{ nm}$ .

Dans un tube à  $50\text{ ml}$ ,  $20\ \mu\text{l}$  de sang est additionné à  $5\text{ ml}$  de la solution de Drabkin. Un volume de  $3\text{ ml}$  de ce mélange est ensuite renversé dans une cuve et dosé à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde égale  $540\text{ nm}$ .

La valeur normale de l'hémoglobine chez les nouveaux nés est comprise entre  $13,5$  et  $19,5\text{ g/dl}$ .



**Figure 15:** Cellule « Thoma » pour la numération des globules rouges



**Figure 16:** Micropipette Potan

### 2.1.3. Teneur Globulaire Moyenne en Hémoglobine (TGMH) :

Cette teneur se calcule par la division du taux de l'hémoglobine par le nombre des globules rouges et elle est exprimé en Pg/ cellule. Les sujets présentant une valeur comprise entre 16 et 30 pg/ cellule, ont fait l'objet de l'étude moléculaire.

### 2.1.4. Electrophorèse de l'hémoglobine :

L'électrophorèse de l'hémoglobine est l'examen de base du diagnostic des hémoglobinopathies.

---

Au cours de ce travail, l'électrophorèse de l'hémoglobine a été réalisée par deux méthodes :

**a. ÉLECTROPHORESE CAPILLAIRE :**

L'électrophorèse capillaire est une technique traditionnellement utilisée pour la détection des variants les plus courants et /ou des anomalies quantitatives (thalassémies) de l'hémoglobine. Ce test a été récemment adapté sur le système d'électrophorèses capillaires CAPILLARYS. (figure 17)

L'analyse est totalement automatisée depuis le tube primaire : préparation de l'hémolysat à partir des globules rouges sédiments non lavés, injection, migration, détection directe, quantification et identification des fractions de l'hémoglobine.

Principe du test :

La structure spatiale de l'hémoglobine et ses propriétés moléculaires dépendent de la séquence en acides aminés des chaînes polypeptidiques. Des mutations qui affectent cette séquence génèrent l'apparition de variants. Ceux-ci présentent des charges de surface différentes et donc des mobilités spécifiques dans un système électrophorétique à pH et force ionique donnés. Les anomalies qualitatives et structurales résultantes sont appelées Hemoglobinoses.

La diminution de synthèse de l'une des chaînes de globines donne des anomalies quantitatives appelées Thalassémies.

Le système CAPPILARYS utilise le principe de l'électrophorèse capillaire en solution libre. Avec cette technique, les molécules chargées sont séparées en fonction de leur mobilité électrophorétique dans un tampon alcalin.

Technique :

L'analyse est réalisée sur les globules rouges sédimentés ou centrifugés après avoir éliminé le plasma. Sur CAPILLARYS, les capillaires étant montés en parallèle, 7 analyses simultanées de sang sont possibles. Toutes les étapes sont entièrement automatisées.

Le système CAPILLARYS commence à préparer les hémolysats des échantillons contenant les globules rouges sédimentés et leurs dilutions à partir des tubes primaires dans la barrette, puis les échantillons hémolysés sont injectés dans les capillaires pour la séparation

---

des hémoglobines à 10 000 V pendant 8 minutes, sous température stabilisée à 34°C, en suite la détection directe des hémoglobines séparées se fait à 415 nm.

**b. ÉLECTROPHORESE SUR PLAQUE D'ACÉTATE DE CELLULOSE :**

Cette technique repose sur le principe que les hémoglobines, grâce à leur caractère amphotère, se chargent négativement à pH alcalin (pH 8,6 du tampon est supérieur à leur pH isoélectrique) et migrent plus ou moins rapidement vers l'anode, (Fabritius H and Cabannes. R, 1986).

Elle comprend les étapes ci-dessous :

▪ **Préparation des culots de globules rouges :**

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml on met 1ml de NaCl à 0,9% puis on ajoute 200µl d'échantillon de sang total. Le mélange est agité par retournement, puis centrifugé à 13200 rpm pendant 2 minutes (centrifugeuse Eppendorf de paillasse).

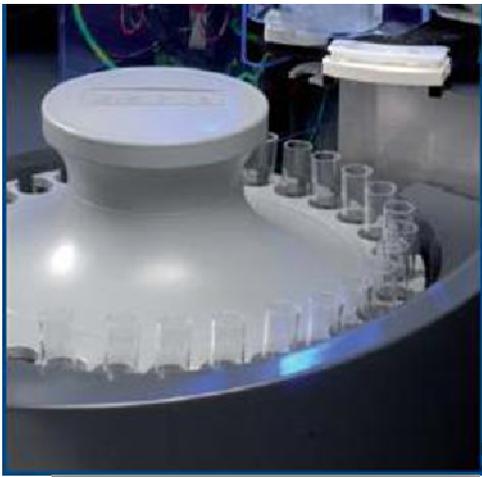
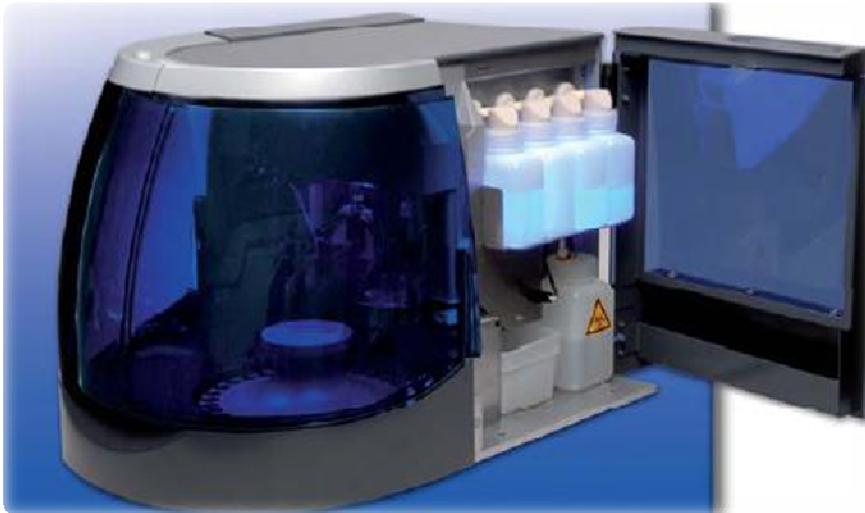
Le surnageant obtenu est éliminé à l'aide d'une pipette à pointe fine installée sur la trompe à vide et ce en enlevant la couche cellulaire supérieure afin d'éliminer les globules blanches.

▪ **Préparation des hémolysats :**

Dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml, on met 50 µl de réactif hémolysant Hélène sans KCN, puis on ajoute 10 µl de culot globulaire d'un prélèvement. Le mélange est vortexé pendant 30 à 60 secondes afin de bien dissoudre les stromas globulaires.

Les hémolysats sont centrifugés à 13000 rpm pendant 2 minutes et sont ainsi prêts pour la migration.

Les hémolysats peuvent être gardés quelques semaines à - 20°C ou quelques mois à -80°C (Vaubourdolle M, 2007).



**Figure 17:** Système MINICAP Hémoglobine

▪ **Dépôt et migration électrophorétique des hémolysats :**

Dans une plaque à 8 puits super Z, 9  $\mu\text{l}$  de chaque hémolysat est transféré dans chaque puits. A l'aide du peigne applicateur, une série d'échantillons est prélevé en abaissant et relevant plusieurs fois les dents du peigne dans les puits, puis déposé sur la plaque d'acétate préalablement trempé dans le tampon « super hème ».

---

La plaque d'acétate est disposée dans la cuve de migration, en mettant le dépôt du côté de la cathode. La migration se fait dans le tampon « super Hème », à 235 V pendant 35 minutes.

▪ **Fixation et coloration des plaques :**

Elle doit être faite immédiatement après arrêt de la migration afin d'éviter la diffusion des bandes d'électrophorèse.

Après migration, les plaques d'acétate de cellulose sont placées dans un rack qui est placé initialement dans le colorant rouge ponceau pendant 6 minutes. La décoloration se fait par trois bains successifs d'acide acétique à 5 % pendant 3 minutes chacun. Le rack est ensuite placé pendant 3 minutes dans le méthanol pour la déshydratation. La dernière étape est la transparence se fait en transférant le rack dans le transparent pendant 10 minutes. Les plaques sont ensuite séchées sous la hotte.

▪ **Lecture des plaques :**

La détermination du taux des différentes fractions de l'hémoglobine se fait automatiquement par lecture au densitomètre à 750 nm.

L'électrophorèse réalisée sur acétate de cellulose (Hélène pH 8,4 en tampon TEB Tris - EDTA – Acide borique), à 450 volts pendant 20 minutes montre que l'Hb Bart's migre très en avant de l'Hb F vers l'anode.

Il s'agit donc d'une hémoglobine très rapide qui se confond avec l'Hb I à pH alcalin.

Etude génotypique :

## **2.2. Etude génotypique :**

### *2.2.1. Extraction de l'ADN à partir du sang total :*

Au cours de ces dernières années, la biologie moléculaire a modifié considérablement le diagnostic de routine des maladies infectieuses, génétiques et néoplasmes.

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillons d'acides nucléiques. Les applications médicales (diagnostic moléculaire et anténatal de maladies héréditaires et de maladies infectieuses, identification génétique en cas de recherche de paternité...) concernent en général l'étude du génome lui-même, c'est-à-dire de l'ADN.

Dans la plupart des études de routine en médecine, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. Dans la grande majorité des cas, la technique

---

d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon biologique, à la nature du génome (cellulaire, exogène), au nombre de copies dans l'échantillon et aux méthodes de biologie moléculaire utilisées ultérieurement (Polymérase Chain Reaction (PCR), Southern-blot, électrophorèse en champ pulsé...).

Au cours de ces vingt dernières années, de très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels.

L'objectif de ces méthodes de purification est notamment d'éliminer les contaminants qui pourraient perturber les techniques ou réactions effectuées par la suite. Par exemple, l'hème est un puissant inhibiteur de la Taq polymérase, qu'il est nécessaire d'éliminer au cours de l'extraction. Il en est de même de l'héparine. C'est la raison pour laquelle il est préférable de prélever stérilement le sang frais sur un anticoagulant du type EDTA, qui, de plus, est un inhibiteur des nucléases.

De préférence, l'extraction de l'ADN doit être réalisée sur du sang frais, voire, en cas d'impossibilité technique, sur du sang stocké au maximum 1-2 j à 25 °C ou 7 j à 4°C, sous peine notamment de réduire le rendement de l'extraction d'au moins 15%. En effet, la cristallisation lors de la congélation suivie de la décongélation provoque des contraintes mécaniques qui se traduisent par de nombreuses cassures de la molécule d'ADN (Bienvenu T et al, 1999).

Au cours de ce travail, l'extraction de l'ADN a été réalisée par la méthode des sels qui se déroule en deux jours suivant les étapes suivantes :

### LE PREMIER JOUR :

Un volume entre 2 et 10 ml du sang frais ou décongelé est versé dans un tube Falcon de 50 ml après l'avoir mélangé par retournement, ce volume est complété à 50 ml avec la solution BLB 1X.

Le tube est maintenu dans la glace ou à +4°C pendant 30 min, puis centrifugé à 2500 rpm pendant 10 min.

Le surnageant est éliminé, le culot maintenu au fond du tube est soumis à un coup de vortex pour le resuspendre, le tube est complété à nouveau jusqu'à 50 ml par la solution BLB 1X, puis centrifugé à 2500 rpm pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé par la suite.

---

Ensuite, sont rajoutés au culot 3ml de la solution WLB 1X, 100 µl de la protéinase K (20 mg/ml) et 150 µl du SDS 20%. Enfin le mélange réactionnel relatif à chaque échantillon est vortexé et incubé à 37°C pendant toute la nuit.

### LE DEUXIEME JOUR :

Un volume de 1ml du NaCl 6M est additionné à chaque échantillon. Le mélange est vortexé fortement jusqu'à ce qu'il prenne un aspect mousseux, puis centrifugé à nouveau pendant 15 min à 3600 rpm.

Le surnageant est transvasé avec une pipette pasteur stérile dans un tube Falcon propre puis centrifugé à 3600 rpm pendant 10 min, de nouveau le surnageant est récupéré dans un autre tube stérile.

La méduse est récupérée à l'aide d'une micropipette stérile, après avoir ajouté deux volumes d'éthanol 100% conservé à - 20°C. La méduse est lavée par ajout d'un peu d'éthanol 70% puis séchée à l'air libre.

Enfin la méduse est resuspendue dans un volume adéquat du TE (0,1-10) qui dépend de la quantité de la méduse récupérée. Les tubes sont ensuite placés sur un agitateur rotatif pendant 3 jours, afin de faciliter la solubilisation de l'ADN.

#### *2.2.2. Contrôle de l'ADN extrait :*

Deux types de contrôle sont nécessaires :

#### CONTROLE QUALITATIF :

Afin de vérifier l'intégrité de l'ADN, On réalise une migration d'un aliquote de 2 µl de l'échantillon sur un gel d'agarose à 0,8%. Il faut obtenir une bande intense pour dire que l'ADN n'est pas dégradé.

#### CONTROLE QUANTITATIF :

Afin de vérifier la pureté et évaluer la concentration des échantillons on mesure la densité optique de l'échantillon à 260 nm (1 unité de DO correspond à 50µg/ml d'ADN). Le

---

rapport de ces deux densités optiques 260/280 supérieur à 1,7 traduit une faible teneur en protéine.

### 2.2.3. Amplification enzymatique in vitro de l'ADN génomique (PCR):

La PCR est une méthode permettant la multiplication d'une séquence d'ADN appelée séquence cible, à partir d'une infime quantité d'ADN génomique. Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante permet d'obtenir, sans clonage, une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN.

Elle a révolutionné le diagnostic moléculaire des maladies génétiques comme bien d'autres domaines.

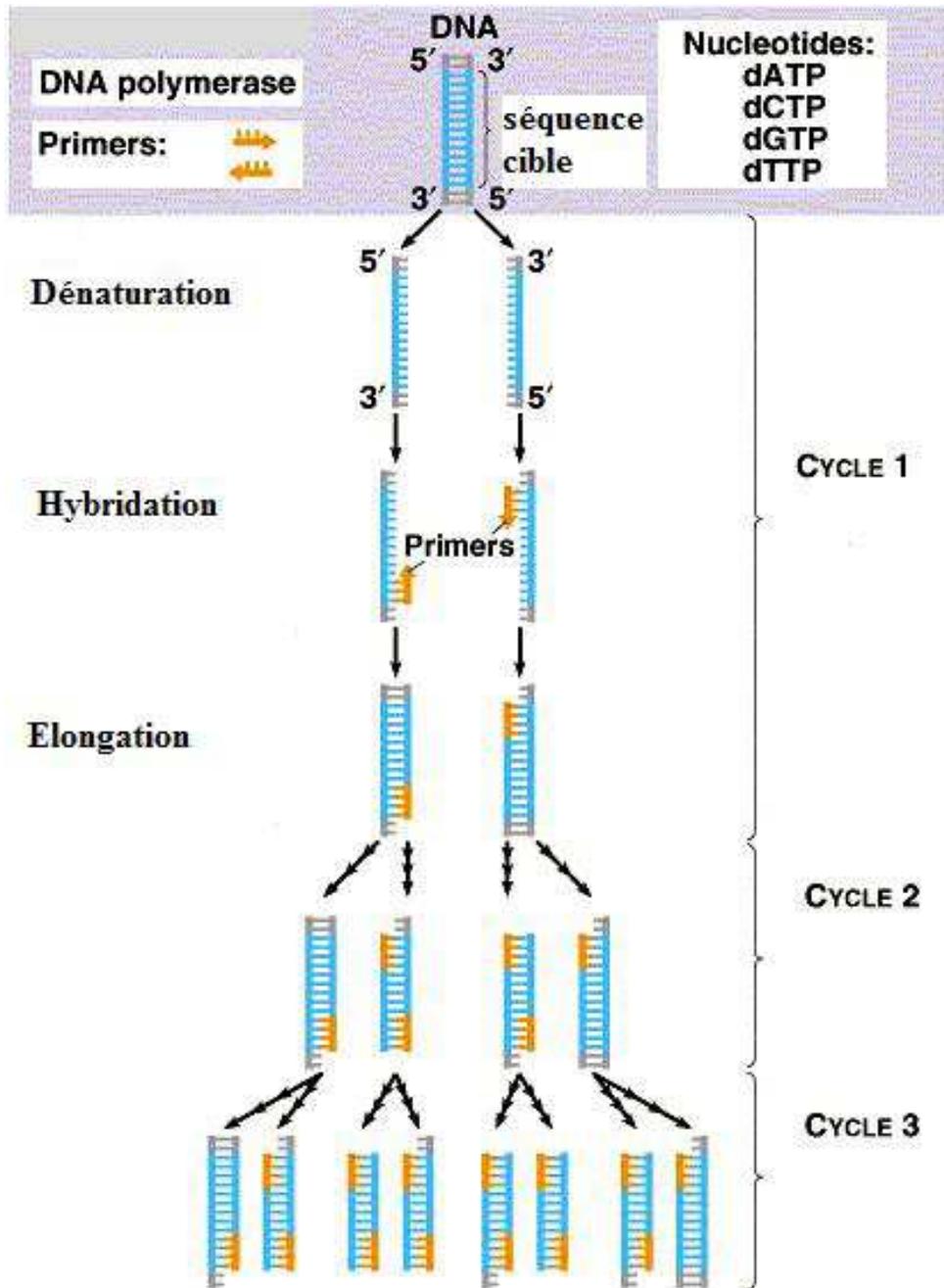
#### a. PRINCIPE :

La PCR est l'acronyme anglais de "*Polymerase Chain Reaction*", ou réaction de **polymérisation** en chaîne. C'est une technique d'amplification enzymatique utilise une enzyme ADN polymérase (**Taq polymérase**), capable de répliquer rapidement, in vitro, un fragment d'ADN quelconque, pourvu qu'y soient fixées des amorces et permet d'obtenir un grand nombre de copies identiques de ce même fragment.

Chaque cycle de PCR s'effectue en trois étapes qui sont indispensables pour toute synthèse d'ADN et qui sont répétées plusieurs fois : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Ces étapes sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique (Figure 18).

Pour effectuer ces transitions de températures, Les microtubes contenant le mélange réactionnel : des oligonucléotides (ou amorces), de l'enzyme (Taq polymérase), un mélange des 4 désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN et l'ADN à amplifier, sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur.

Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. la réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures.



**Figure 18 :** la réaction de polypérisation en chaîne (PCR).

**b. AMORCES :**

---

Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles vont avoir un double rôle : en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier (étape 2 du cycle) et avec leur extrémité 3' OH libre servir d'amorce pour l'ADN polymérase (étape 3 du cycle).

Les amorces s'hybrident aux extrémités de la séquence qui va être amplifiée, il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région ADN amplifiée. C'est en effet au niveau de ces extrémités que les oligonucléotides amorces vont s'hybrider. Pour faciliter le choix des séquences des deux amorces, des logiciels d'analyse de séquences permettent de vérifier les points suivants :

- des  $T_m$  comparables. Les oligonucléotides amorces doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température,
- des séquences qui ne soient pas complémentaires entre elles (en particulier dans la région 3'),
- des séquences qui ne contiennent pas de séquences répétées inversées (pas de repliement intramoléculaire).

### **c. TEMPERATURES :**

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique :

l'étape de **dénaturation**, est réalisée à environ 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.

l'étape **d'hybridation** se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.

Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces. Pour calculer le  $T_m$  d'un oligonucléotide inférieur à 40 nucléotides, on utilise la relation suivante :

$$T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

(où A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide).

---

l'étape de l'**élongation** ou **extension** est à environ 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée (Taq polymérase extraite de la bactérie *Thermophilus aquaticus*). Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées. Et les 4 nucléotides appelés dNTPs (DésoxyNucléotidesTri-Phosphate) sont les éléments de base utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaire.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes, seule la température d'hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Ces trois étapes représentent un cycle qu'on peut répéter autant de fois que nécessaire.

Au fil des cycles la quantité d'ADN amplifié va augmenter de façon exponentielle. Et la quantité d'ADN est multipliée par deux à chaque cycle. On obtient  $2^n$  pour  $n$  cycle.

#### **d. LE TAMPON :**

Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (TrisHCl à pH basique 8,5).

#### **e. MgCl<sub>2</sub> :**

Les cations bivalents Mg<sup>2+</sup>, sont des cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg<sup>2+</sup> et des cations monovalents (K<sup>+</sup>) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN.

#### **f. L'ADN POLYMERASE :**

Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), comme par exemple *Thermus aquaticus* (Taq polymérase). De nos jours, les enzymes utilisées sont dites **recombinantes**, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces et plus fidèles.

Une ADN polymérase est un complexe enzymatique intervenant dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire, mais aussi dans des processus de réparation et de recombinaison de l'ADN. Il existe différentes familles de polymérases qui diffèrent selon leurs séquences en acide aminé et leurs propriétés catalytiques.

L'ADN polymérase utilisé lors de notre étude est la taq polymérase extraite de bactéries appelées *Thermophilus aquaticus*, présentent dans les sources chaudes. Elle permet

---

de travailler à des températures plus élevées que les températures usuelles (ambiante ou 37°C). la Taq polymérase est capable de synthétiser le nouveau brin dans le sens 5' → 3'. Cette synthèse s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle. Elle nécessite la présence de désoxynucléosides triphosphates (dNTPs).

#### 2.2.4. Recherche des délétions $\alpha$ 3.7 et $\alpha$ 4.2 :

##### **a. REACTION :**

Des conditions expérimentales, des critères, et des limites s'imposent dans la réalisation d'une amplification sélective du fragment recherché c'est-à-dire des deux gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ .

Le mélange réactionnel est constitué de :

ADN génomique double brin.....	0,5 $\mu$ g
Tampon 10X sans MgCl <sub>2</sub> .....	5 $\mu$ l
Amorce sens, 25 pmol.....	0,5 $\mu$ l
Amorce anti-sens, 25 pmol.....	0,5 $\mu$ l
Mg Cl <sub>2</sub> , 25 mM.....	5 $\mu$ l
dNTP (dATP , d GTP, dCTP, dTTP) 100mM.....	0,5 $\mu$ l
Taq polymérase (5U/ $\mu$ l).....	0,25 $\mu$ l
Eau distillée.....	qsp 50 $\mu$ l

La réalisation de toute PCR, nécessite l'optimisation des conditions de la réaction. Lors de notre travail :

- Les amorces utilisées pour la réalisation de la PCR sont :

Pour la délétion alpha 3 .7 :

TS1 : 5' AGTCCACCCTTCCTTCCTCACCC 3'

TS2 : 5' CCATTGTTGGCACATTCCGGG 3'

TS3 : 5' CCATGCTGCCACGTTTCTGAG 3'

Pour la délétion 4.2 :

QD1 : 5' TAGGAACAGACCCTCCCACGCGTTCA 3'

QD2 : 5' TGCACGCCTCCCTGGACAAGTT 3'

QD3 : 5' TGTCCA GGA GCA AGC CAG GGT AAG 3'

##### **b. REACTION D'AMPLIFICATION**

###### **Dénaturation :**

Premier cycle : 96°C pendant 4 minutes  
2<sup>ème</sup> au 30<sup>ème</sup> cycle : 96°C pendant 30 secondes

###### **Hybridation :**

Premier cycle : 59°C pendant 2 minutes  
2<sup>ème</sup> au 30<sup>ème</sup> cycle : 59°C pendant 20 secondes

###### **Extension :**

Premier au 29<sup>ème</sup> cycle : 72°C pendant 2 minutes

---

30 <sup>ème</sup> cycle	: 72°C pendant 7 minutes
<u>Pour la délétion 4.2 :</u>	
<b>Dénaturation :</b>	
Premier cycle	: 96°C pendant 4 minutes
2 <sup>ème</sup> au 30 <sup>ème</sup> cycle	: 96°C pendant 30 secondes
<b>Hybridation :</b>	
Premier cycle	: 60°C pendant 1 minute
2 <sup>ème</sup> au 30 <sup>ème</sup> cycle	: 60°C pendant 20 secondes
<b>Extension :</b>	
Premier au 29 <sup>ème</sup> cycle	: 72°C pendant 1 minutes 30 secondes
30 <sup>ème</sup> cycle	: 72°C pendant 10 minutes

### 2.2.5. Analyse des produits amplifiés :

#### a) PREPARATION DU GEL D'AGAROSE A 0,8% :

Un volume de 33ml du tampon TAE 1X est additionné à un erlen contenant 0,264 g d'agarose. Le mélange est porté à ébullition jusqu'à ce que le gel devienne transparent.

Il faut attendre que la température baisse pour ajouter un volume de 1,5 du bromure d'éthidium (BET), équivalent à une concentration finale de 10 mg/ml. Le gel est ensuite versé dans un moule contenant un peigne. Le gel se solidifie entre 15 à 20 minutes.

#### b) PREPARATION DES ECHANTILLONS :

On dépose dans les puits un mélange d'un volume de 7 µl d'ADN, avec 3 µl de la solution de dépôt (c'est une solution qui permet de suivre et de repérer le niveau de migration de l'ADN et évite son échappement des puits). La première piste est réservée pour le dépôt du marqueur de taille, le marqueur utilisé lors de notre étude est **EUROLADDER XL.EUROBIO.**

#### c) MIGRATION ELECTROPHORETIQUE :

La migration est effectuée à 50 V pendant une heure. L'ADN est visualisé sur un transilluminateur UV (312 nm) sous forme de bandes orange.

---

# Tampons et Solutions

## **T.A.E 50 X :**

-TRIS 121.135 g/mol.....2M  
-Acide acétique 60 g/ mol..... 2M  
EDTA 292,24 g.mol.....0,05 M  
Dans un volume final de 1 L.

## **T.B.E 10 X:**

- Tris 121. 135 g/mol..... 0, 89 M  
-Borate .....0, 89 M  
-EDTA (pH 8) 292, 24 g.mol..... 0,02 M  
Dans un volume final de 1 L.

## **5 M NaCl :**

-NaCl.....292,5g  
-H<sub>2</sub>O..... 800ml

Dissoudre parfaitement et ajuster le volume à 1 L.

## **B.L.B 20 X :**

-NH<sub>4</sub> Cl .....165,8 g  
- KHCO<sub>3</sub>..... 20 g  
- EDTA.....0,5 M, pH 7.4 , 40 ml

Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.

## **W .L.B 1X:**

-EDTA.....0, 5 M, 2ml  
-NaCl.....5M, 40 ml  
-Tris .....1 M, pH 8, 5 ml

Compléter à 500 ml avec de l'eau distillée.

## **Solution de dépôt :**

-Ficol 400..... 2 g  
- Bleu de Bromophénol.....0 ,3 mg  
- Xylène cyanol.....0,3 mg

Dans un volume de 10 ml du T.A.E 50 X.





# RESULTATS ET DISCUSSION

## 1. Résultats phénotypiques :

### 1.1. Les sujets étudiés :

Afin de déterminer la prévalence de l'alpha-thalassémie dans la région du Nord du Maroc, nous avons étudié 450 échantillons du sang prélevés à partir du cordon ombilical des nouveaux nés durant 7 mois (du 01 Juin au 30 Août 2009 et du 01 Février au 30 Mai 2010).

Le prélèvement a été réalisé par des sages femmes qualifiées à partir du cordon ombilical des nouveaux nés. Le sang est recueilli immédiatement après l'accouchement sur des tubes à EDTA.



---

Chaque prélèvement est accompagné d'un consentement préalable de la maman.

Ces échantillons provenaient de divers Hôpitaux de la région Tanger-Tétouan-Larache avec un accord du ministère de la santé.

## 1.2. Résultats hématologiques :

L'analyse néonatal de certains paramètres érythrocytaires a permis de fixer le profil hématologique de l'alpha thalassémie chez la population du Nord du Maroc: l'hypochromie, la microcytose et la présence de l'hémoglobine Bart's sont les critères constamment rencontrés. Il est performant quand il est pratiqué sur des échantillons du sang frais.

La détermination des paramètres hématologiques : nombre de globule rouge, teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH), permet de différencier entre les nouveaux-nés normaux et les nouveau-nés anémiques. Les moyennes des valeurs hématologiques obtenues pour chaque groupe sont résumées dans le tableau 1.



**Tableau 1** : Comparaison de la moyenne des paramètres érythrocytaires entre nouveau-nés normaux et nouveau-nés anémiques.

	Nombre de sujet	Paramètres érythrocytaires		
		Hb (g/dl)	GR (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	TGMH (pg)
<b>Nouveaux-nés normaux</b>	384	15,95 ±3,06	4,21±0,55	36,63±4,99
<b>Nouveaux-nés anémiques</b>	66	11,69±1,82	5,03±0,21	23,23±3,20

L

'ana  
lyse  
des  
par  
am  
ète

Une analyse hématologique a été effectuée sur 450 échantillons. Parmi ces échantillons, 384 présentent un bilan hématologique normale, et 66 présentent un bilan hématologique anémique.

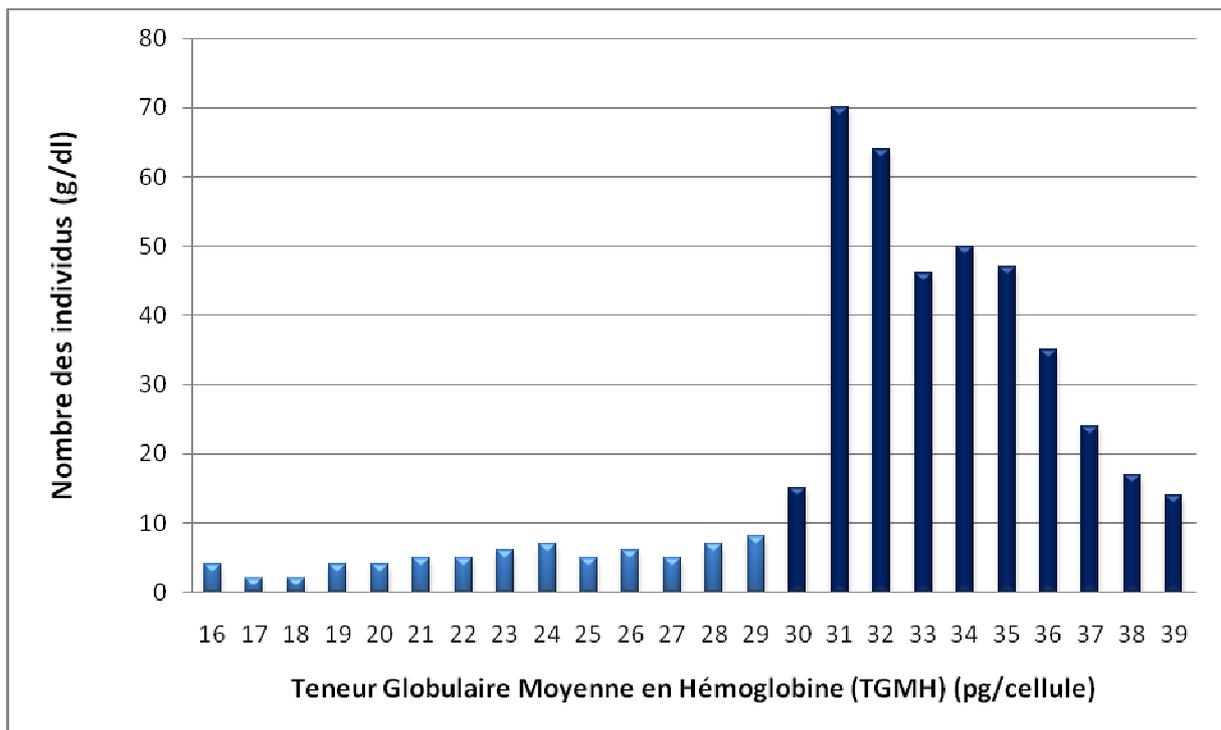
L'étude comparative de la moyenne des paramètres érythrocytaires entre nouveau-nés normaux et nouveau-nés anémiques représentée par le tableau 1 permet les remarques suivantes :

- Le nombre des globules rouges est significativement plus élevé dans les cas anémiques par rapport aux valeurs des nouveau-nés normaux (5,03±0,21 contre 4,21±0,55 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup> hématies).
- Un taux d'hémoglobine inférieur à la normale chez les nouveaux-nés anémiques, avec une moyenne de 11,69±1,82 pg/ cellule contre 15,95 ±3,06 chez les nouveaux-nés normaux.
- La T.G.M.H (Teneur globulaire Moyenne en Hémoglobine) est significativement plus basses chez les nouveau-nés anémiques que les nouveau-nés normaux.
- en utilisant le Logiciel du statistique « STATISTICA », les différences de moyennes trouvés entre les nouveaux-nés anémiques et normaux sont hautement significatives avec un seuil de significativité supérieur à 0,001 (valeur p égale à 0,001).



Cette constatation atteste l'existence d'une microcytose hypochrome chez les sujets anémiques.

Le tri des cas soupçonnés d'être  $\alpha$ -thalassémiques est fait selon la présence d'une anémie microcytaire qui se traduit par une TGMH comprise entre 16 et 30 pg/cellule. Parmi les 450 cas étudiés, 66 nouveaux-nés présentent une TGMH anormale comprise entre 16 et 30 pg/cellule. Soit 15% des cas. Le profil de distribution des valeurs du TGMH est représenté dans la figure.



**Figure 19:** Distribution des valeurs de la TGMH des 450 nouveau-nés étudiés.

### 1.3.Résultats électrophorétiques :

#### 1.3.1. *Electrophorétiques sur plaque d'acétate de cellulose :*

Pour chacun des 66 nouveau-nés anémique étudiés nous avons réalisé une électrophorèse de l'hémoglobine sur acétate de cellulose. Le tableau 2 résume la distribution et les différentes fractions d'hémoglobines obtenues pour chaque cas.



Quelques exemples des profils obtenus sont représentés dans les figures 20a et 20b.

**Tableau2** : Résultats des analyses électrophorétiques des 66 cas étudiés suspects

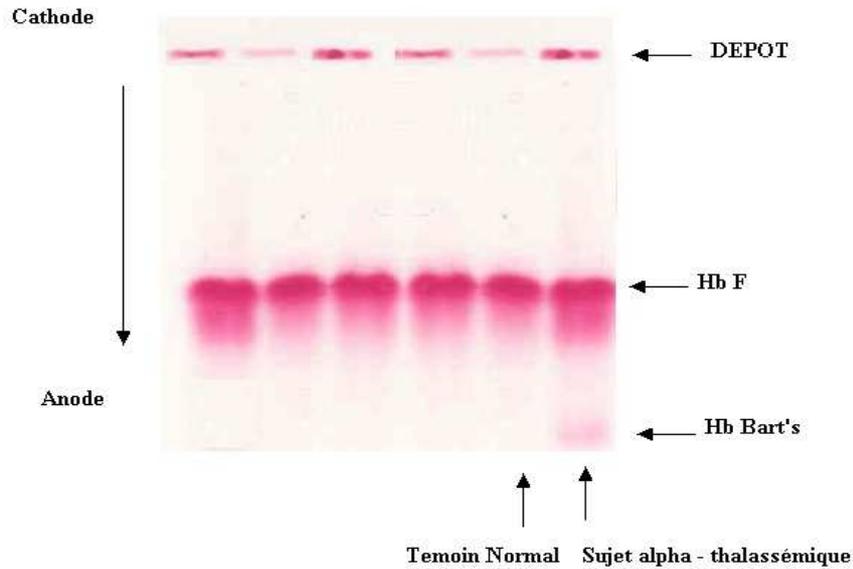
Nombre de nouveaux-nés	Type d'hémoglobine présent
2	<b>Hb F + Hb S</b>
1	<b>Hb F + Hb Bart's</b>
63	<b>Hb F</b>

63 nouveau-nés parmi les 66 cas étudiés ont révélé la présence d'un seul type d'hémoglobine correspondant à l'hémoglobine fœtale. C'est le profil hémoglobinique d'un nouveau-né normal.

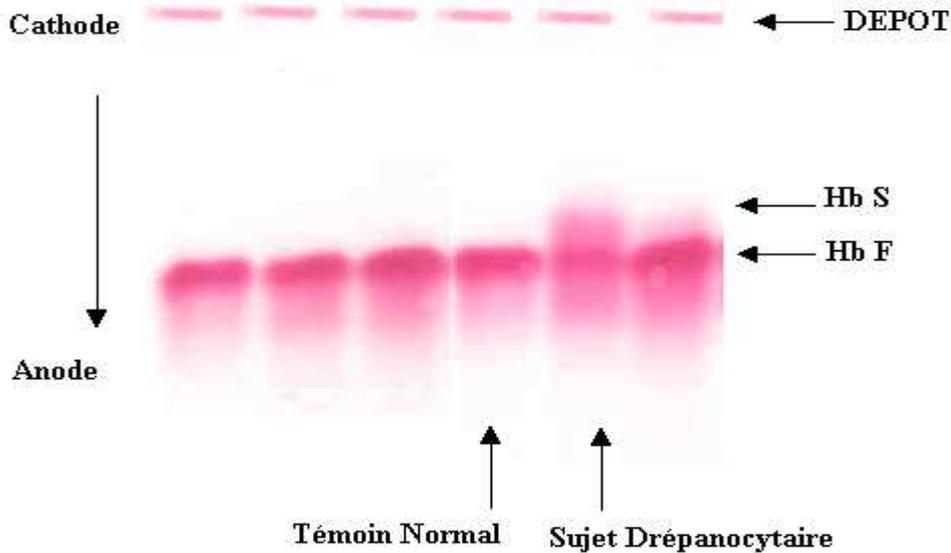
Un parmi les 66 nouveau-nés anémiques a révélé la présence de l'hémoglobine Bart's, c'est une hémoglobine anormale formée d'un tétramère de la chaîne  $\gamma$  ( $\gamma_4$ ). Sa présence témoigne d'une délétion de trois gènes  $\alpha$ . La détection de l'hémoglobine Bart's à la naissance est un moyen de diagnostic précoce de la présence d'un cas  $\alpha$ -thalassémique, mais son absence n'est pas corrélé à l'absence du trait thalassémique.

Deux nouveau-nés ont révélé la présence de l'hémoglobine S responsable d'une hémoglobinopathie : la drépanocytose : lors du comptage nous avons observé des globules rouges sous forme de faucilles ce qui confirme leur présence. Cette hémoglobine anormale Hb S résulte d'une mutation sur la chaîne  $\beta$  de la globine la mutation du 6<sup>ème</sup> (GAG6GTG) entraîne le remplacement de l'acide glutamique 6 par de la valine (Glu6Val).

Il est à signaler qu'en plus des 66 cas anémiques nous avons réalisé une électrophorèse d'hémoglobine pour 12 cas non anémiques mais dont le TGMH est égale à 30 pg/cellule, et aucune hémoglobine anormale n'a été détectée.



**Figure 20 a** : Electrophorèse de l'hémoglobine sur acétate de cellulose à pH alcalin (pH= 8,6), révélant la présence de l'hémoglobine Bart's.



**Figure 20 b** : Electrophorèse de l'hémoglobine sur acétate de cellulose à pH alcalin (pH= 8,6), révélant la présence d'une hémoglobine anormale Hb S.



1.3.2. *Electrophorèse capillaire* :

L'électrophorèse capillaire a été réalisée chez 11 nouveau-nés. Les résultats de l'étude comparative du taux des hémoglobines entre nouveau-né alpha thalassémiques et nouveaux-nés normaux, figurent dans le tableau 3 :

Quelques exemples des profils obtenus sont représentés dans les figures 21a et 21b.

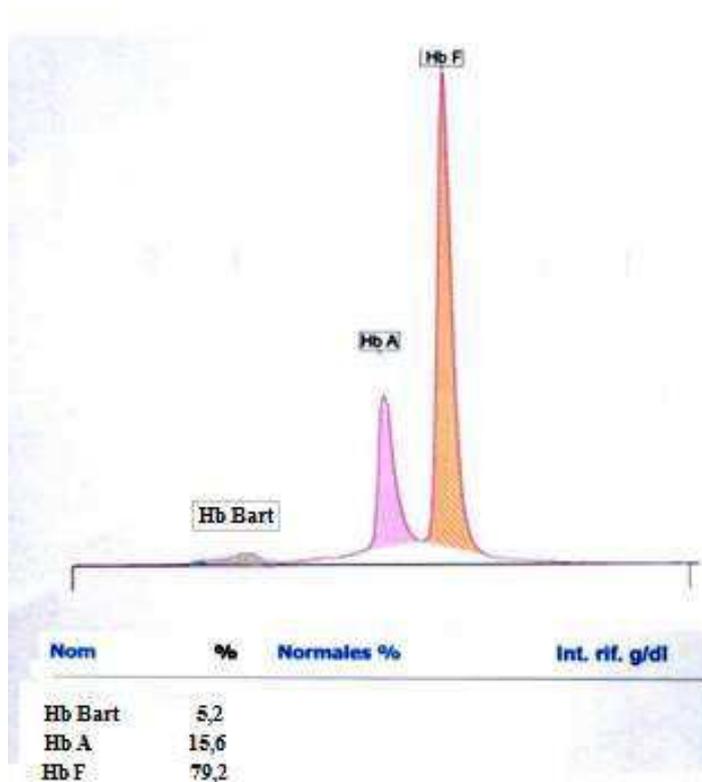
**Tableau 3** : Comparaison du taux des hémoglobines A, F, A2 entre nouveau-né alpha-thalassémique et nouveau-nés normaux.

Type d'hémoglobine	Nouveau-nés normaux (%)	Nouveau-né $\alpha$ -thalassémique (%)
Hb A	16,66	15.6
Hb F	83,27	79 .2
Hb A2	0,07	0
Hb Bart's	0	5.2

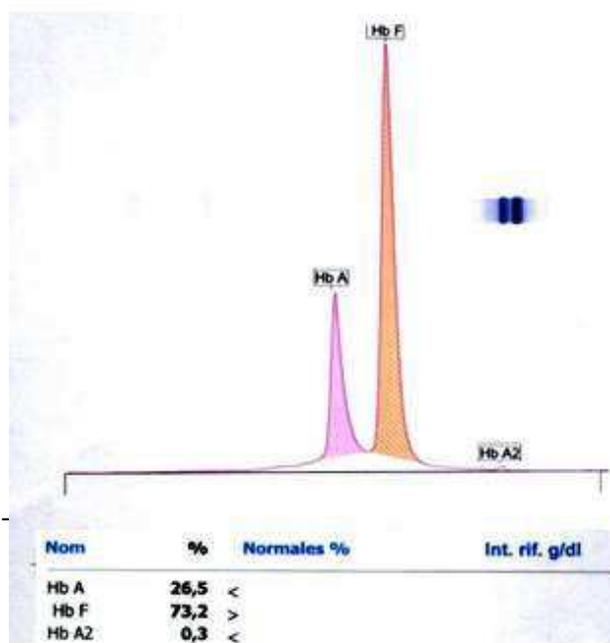
L'analyse de ce tableau permet les constatations suivantes :

- La comparaison du taux des deux hémoglobines (A et F) ne montre pas de différence significative entre les deux populations,
- Absence de l'hémoglobine A2 chez le nouveau-né thalassémique, ceci est en accord avec les résultats des auteurs (SANGARE A. et al, ALVIN et al) qui ont montré qu'il y a une diminution significative du taux d'HbA2 dans les alpha-thalassémies,

- le taux d'hémoglobine Bart's chez le nouveau-né  $\alpha$ -thalassémique est entre 5 et 10 % cela indique qu'il s'agit de  $\alpha$ -thalassémie mineure de type 1.



**Figure 21a** : profil de l'électrophorèse capillaire du nouveau-né alpha thalassémiques.





**Figure 21a** : profil de l'électrophorèse capillaire d'un nouveau-né normal

## 2. Résultats génotypiques :

### 2.1. Recherche de la délétion $\alpha$ 3.7 :

Les deux gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont constitués de 3 régions X, Y et Z de très fortes ressemblance, séparés par des séquences non homologues appelés I, II et III. Cette homologie facilite les crossing over durant la méiose (Figure 8a).

La délétion  $\alpha$  3.7 dite forme droite, résulte d'une erreur d'alignement suite à une recombinaison entre les deux zones Z, ce qui produit un chromosome avec un seul gène  $\alpha$  et entraîne la perte d'un segment de 3,7 kb. Cette délétion est la plus répandue des formes  $\alpha$  + thalassémies.

Pour démontrer la présence de cette délétion nous avons utilisé une technique simple se basant sur la réaction PCR qui représente un outil de diagnostic très important, pour différents types de défauts moléculaire : mutation, délétion ou autre. Cette technique permet la détermination rapide des désordres génétiques responsable de diverses maladies.

Pour rechercher cette délétion deux réactions PCR sont lancées simultanément mais séparément, dont chacune contient les amorces spécifiques à l'amplification d'un gène alpha. Chaque tube contient une paire d'amorce : une paire d'amorce spécifique pour le gène  $\alpha 1$  et une autre paire spécifique pour le gène  $\alpha 2$ , en plus d'une amorce commune aux deux réactions.

A la suite de cette amplification le profil électrophorétique obtenu est représenté dans la figure 22.

Lors de notre étude nous avons trouvé 3 cas  $\alpha$ -thalassémiques, parmi les 66 nouveaux-nés suspects. Le tableau 4 résume les caractéristiques génotypiques et hématologiques de ces trois cas :

**Tableau 4** : Caractéristiques génotypiques et hématologiques des trois cas  $\alpha$ -thalassémiques.

Génotype	Hb Bart's	Hb (g/dl)	Nb de GR.10 <sup>6</sup>	TGMH pg/cellule
$\alpha\alpha/\alpha\alpha 3.7$	Non détecté	12,5	4,5	27,7
$\alpha\alpha/\alpha\alpha 3.7$	Non détecté	13,5	4,7	28,72
$\alpha 3.7/\alpha\alpha 3.7$	20%	10,6	4,4	23,86

L'électrophorèse des produits amplifiés sur gel d'agarose à 0,8% donne suivant les cas, différents résultats (Figure22) :



M: Marqueur de taille EUROLADDER XL, la taille de ses différents fragments est respectivement : 2.1kb, 2kb, 1,9kb, 1,8kb, 1,7kb, 1,6kb et 1.5kb.

La piste 1 : amplification avec la paire d'amorce TS1- TS3 pour le gène  $\alpha 1$  : obtention d'un seul fragment de 1,9 kb.

La piste 2 : amplification avec la paire d'amorce TS1- TS2 pour le gène  $\alpha 2$  : obtention d'un seul fragment de 2,1 kb.

Les pistes 1 et 2 représentent le profil électrophorétique obtenu dans le cas normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ )

La piste 3: amplification avec la paire d'amorce TS1- TS3 pour le gène  $\alpha 1$  : obtention de deux fragments un fragment de 1,9 et un fragment de 2,1 kb.

La piste 4 : amplification avec la paire d'amorce TS1- TS2 pour le gène  $\alpha 2$  : obtention d'un seul fragment de 1,9 kb.

Les pistes 3 et 4 représentent le profil électrophorétique pour un cas hétérozygote portant la mutation ( $\alpha\alpha/\alpha 3.7$ ).

La piste 5 : amplification avec la paire d'amorce TS1- TS3 pour le gène  $\alpha 1$ , obtention d'un seul fragment de 1,9 kb.

La piste 6 : pas d'amplification avec la paire d'amorce TS1- TS2 pour le gène  $\alpha 2$

Les pistes 5 et 6 représentent le profil électrophorétique pour un nouveau-né homozygote ( $\alpha 3.7/\alpha 3.7$ ).

La délétion  $\alpha 3.7$  représente une prévalence de 0,93% de la population étudiée. Elle est moins fréquente en comparaison avec les autres pays du bassin méditerranéen comme en Tunisie (4,5%) et en Sicile 4,1% (Zorai A et al, 2002).

Dans certaines régions du monde ce type de délétion représente 78,2% des délétions responsables d'une  $\alpha$ -thalassémie comme à Chypre par exemple (Kyriacou K et al, 2000).

La présence de l'hémoglobine Bart's associée ou non à une anémie microcytaire hypochrome atteste la présence du syndrome alpha thalassémique chez les nouveaux-nés. Cependant, certains cas demeurent asymptomatiques (sujet sans signes cliniques et avec un taux normal d'hémoglobine), rendant le diagnostic plus délicat. C'est le cas d'un nouveau-né chez qui nous avons trouvé un taux d'hémoglobine normal avec une TGMH proche de la normale (28,72 pg/ cellule) mais qui présente une délétion  $\alpha 3.7$  sous la forme hétérozygote.

## 2.2. Recherche de la délétion $\alpha 4.2$ :

La délétion  $\alpha 4.2$ , dite forme gauche, c'est une délétion qui entraîne la perte d'un segment de 4,2kb contenant le gène  $\alpha 2$ , c'est un glissement entre les zones X X (Figure 8b).  $\rightarrow$

L'amplification se fait en se basant sur la même stratégie que pour la délétion  $\alpha 3.7$ , deux réactions PCR sont lancées simultanément mais séparément.

L'amplification de la région résultante de la délétion nécessite le choix des amorces spécifiques aux régions X et qui ne représentent que 4% de différence ce qui rend l'amplification un peu délicate (Dodé C et al, 1992).

A la suite de l'amplification par PCR, le profil de migration électrophorétique obtenu est représenté sur la figure 23.



Aucune délétion de ce type n'a été détectée parmi les 66 nouveau-nés étudiés suspects de notre échantillonnage, ce qui est en corrélation avec les résultats qui étaient décrit précédemment dans les pays voisins et les pays du bassin méditerranéen où cette délétion est rare.

L'électrophorèse des produits amplifiés sur gel d'agarose à 0,8% donne suivant les cas, différents résultats (Figure 23):

**M:** Marqueur de taille EUROLADDER XL, la taille de ses différents fragments est respectivement : 2.1kb, 2kb, 1,9kb, 1,8kb, 1,7kb, 1,6kb et 1.5kb.

La piste 1 : pas d'amplification avec la paire d'amorce QD1- QD3 pour le gène  $\alpha 1$

La piste 2 : amplification avec la paire d'amorce QD1- QD2 pour le gène  $\alpha 2$ , obtention d'un seul fragment de 1,7 kb

Les pistes 1 et 2 présentent le profil électrophorétique obtenu dans le cas normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ).

La piste 3 : amplification avec la paire d'amorce QD1- QD3 pour le gène  $\alpha 1$ , obtention d'un seul fragment de 1,9 kb.

La piste 4 : amplification avec la paire d'amorce QD1- QD2 pour le gène  $\alpha 2$ , obtention d'un seul fragment de 1,7 kb

Les pistes 3 et 4 représentent le profil électrophorétique obtenu dans le cas hétérozygote ( $\alpha 4.2/\alpha\alpha$ )

La piste 5 : amplification avec la paire d'amorce QD1- QD3 pour le gène  $\alpha 1$ , obtention d'un seul fragment de 1,9 kb

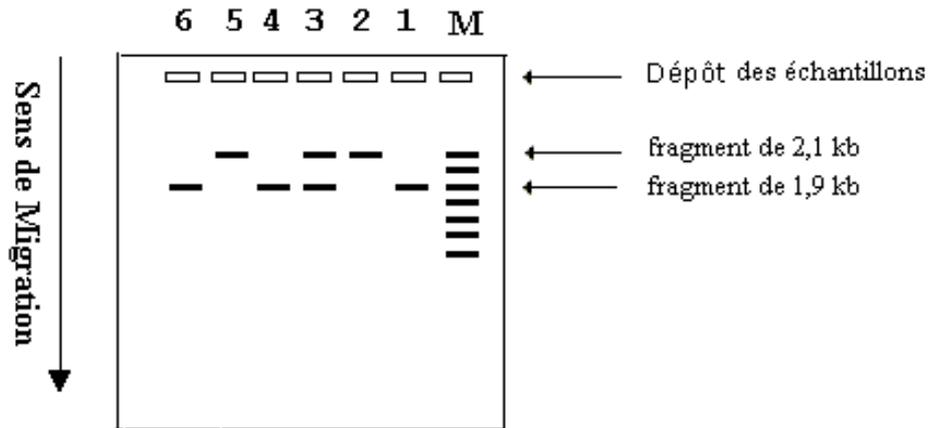
La piste 6 : pas d'amplification avec la paire d'amorce QD1- QD2 pour le gène  $\alpha 2$

Les pistes 5 et 6 représentent le profil électrophorétique obtenu dans le cas homozygote ( $\alpha 4.2/\alpha 4.2$ ).

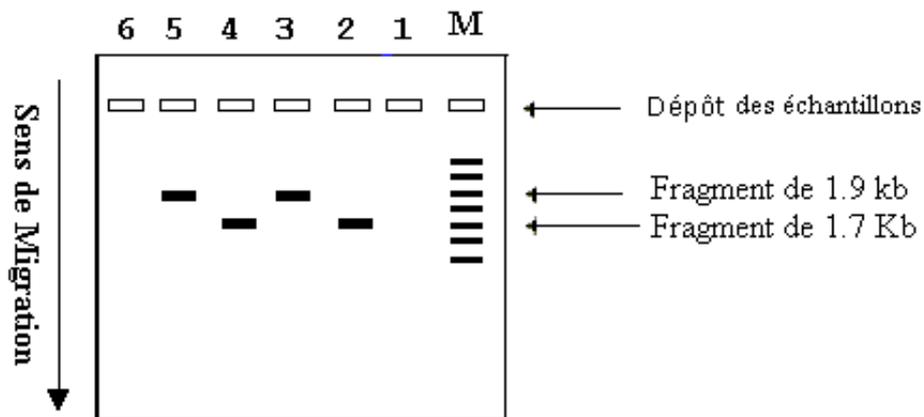
En Tunisie par exemple on trouve que ce type de délétion représente un pourcentage inférieur à 0,9% (Zorai A et al, 2002). En outre même dans certains pays où la fréquence de l' $\alpha$  thalassémie est importante, cette forme ne représente que 0,6% comme en Malisie (Wee, Yong-Chui et al, 2005).

L'absence de délétion  $\alpha 4.2$  dans notre échantillonnage n'implique pas son absence dans le Nord du Maroc. En conséquence, il faut élargir et augmenter notre échantillonnage pour que nos résultats soient plus significatifs.

Les 63 nouveau-nés anémiques qui n'ont révélé aucune de ces deux délétions ( $\alpha 4.2$  et  $\alpha 3.7$ ) pourraient être soit porteurs d'autres types de délétion comme la délétion CAL, MED ou une triplication  $\alpha\alpha^{3.7}$  fréquentes dans le bassin méditerranéen.



**Figure 22** : Identification moléculaire par PCR de la délétion  $\alpha 3.7$



**Figure 23** : Identification moléculaire par PCR de la délétion  $\alpha 4.2$

## *Conclusion et Perspectives*



La répartition des syndromes thalassémiques tend à devenir mondiale et risque de présenter un problème de santé majeur dans les pays en développement. Leurs conséquences sur la santé de la personne atteinte varient entre absence de signes cliniques et présence d'anémie grave et létale. Le diagnostic néonatal permet une meilleure prise en charge des sujets atteints et une amélioration de leur qualité de vie.

Au Maroc aucune étude n'a été effectuée, jusqu'à présent, pour déterminer la prévalence des alpha-thalassémies. Notre travail s'inscrit dans ce contexte. Il consiste à déterminer, dans la population du Nord du Maroc, la prévalence de deux délétions fréquentes dans le bassin méditerranéen :  $\alpha 3.7$  et  $\alpha 4.2$ .

Notre étude a révélé la présence de 3 cas alpha-thalassémiques, résultant du même défaut moléculaire : la délétion  $\alpha 3.7$  hétérozygote pour deux cas et la présence d'une délétion  $\alpha 3.7$  homozygote pour un seul cas. Ce dernier a été caractérisé par la présence d'une hémoglobine anormale détectée lors de l'examen biochimique. Ainsi la prévalence de la délétion  $\alpha 3.7$  est de 0,96 %. Cependant la délétion  $\alpha 4.2$  n'a été révélée pour aucun cas, d'où la nécessité d'élargir notre échantillonnage afin de pouvoir déterminer la prévalence exacte de ces deux types de délétion chez la population marocaine et par conséquent de pouvoir la comparer avec celle des pays méditerranéens voisins.

En plus de ces deux délétions explorées lors de notre étude, on peut dénombrer une multitude de délétions qui sont fréquentes dans le bassin méditerranéen tel que la délétion MED et CAL, et des mutations ponctuelles ou d'insertions dans un gène alpha, c'est par exemple le cas de la mutation *Constant Spring*, située dans le gène alpha-2. La prévalence de ces délétions peut être déterminée en appliquant la même approche suivie lors de notre étude, et avec des échantillons prélevés à partir du sang du cordon ombilical.



## Références Bibliographiques

**Alvin H., Schmaier B.A, Harold M, Maurer M.D, Charles L, Johnston M.D, Robert B, Scott M.D.** Alpha thalassemia screening in neonates by mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin determination. *J. Pediat.* vol 83(5), pp 794-797. 1973

**Badensa C, Thuretb I and Lena-Russo D.** Les syndromes thalassémiques. *Revue Française des Laboratoires*, [Vol 2000](#), pp 23-27. 2000.

**Bain BJ.** Haemoglobinopathy Diagnosis. 2nd ed. Malden, Mass: Blackwell Publishing, 2006.

**Baysal E and Huisman T. H. J..** Detection of common deletional  $\alpha$ -thalassemia-2 determinants by PCR. *American Journal of Hematology*, vol 46, pp 208-213. 1994.

**Bienvenu T, Meunier.C, Chiron S, Richard L, Gauthert-Dejean A, Rouselle J.F and Fzldmann D.** les techniques d'extraction d'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annales de biologie Clinique*. Vol 57, N° 1, pp 77-84. 1999

**CHARMOT-BENSIMON D.** Human globin genes: what can we learn from their polymorphism?. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, vol. 92, n°4, pp 242-248. 1999.

**Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J and Rochette J.** Rapid analysis of  $\alpha 3.7$  thalassaemia and  $\alpha\alpha\alpha$  anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis, *journal of hematology*, vol 83, pp 105-111. 1993.

**Eleftheriou A.** A propos de la thalassémie. Chapitre 4. Fédération International de la Thalassémie, 2007.

**Elliott P. Vichinsky.** Alpha thalassemia major—new mutations, intrauterine management, and outcomes. *1Children's Hospital & Research Center Oakland, Oakland, CA*, vol 2009, pp 35-41. 2009.

**Fucharoen S and Viprakasit V.** Hb H disease: clinical course and disease modifiers. vol 2009, pp 26-34.2009.

**Gganong W, Jobin M.** Physiologie médicale. Édition: 2, 2005.

**Guide médecin élaboré par la Haute Autorité de Santé HAS.** Syndromes thalassémiques majeurs et intermédiaires, Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare.*revue Bio Tribume Magazine*, vol 31, pp 25-43. 2008.



**Hanscombe O, Whyatt D, Fraser P, Yannoutsos N, Greaves D, Dillon N and Grosveld F.** Importance of globin gene order for correct developmental expression, *GENES & DEVELOPMENT*, vol 5(8), pp 94-1387. 1991.

**Harteveld C.L and Higgs D.R.** Alpha-thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol 5, pp 13. 2010.

**Kalpan J.C, Delpech M.** Biologie moléculaire et médecine. Editions Flammarion Médecine-science, 1989.

**Kyriacou K, Kyrii A, Kalogirou E, Vasiliades P, Angastiniotis M, Ioannou PA and Kleanthous M,** Hb Bart's levels in cord blood and alpha-thalassemia mutations in Cyprus. *HEMOGLOBIN*, vol 24, pp 171–180. 2000.

**M. Agouzal , A. Arfaoui1, A. Quayou et M. Khattab.** Beta thalassemia major: The Moroccan experience, *Journal of Public Health and Epidemiology*, Vol 2(2), pp 25-28 February 2010.

**Rapport de l'OMS, Organisation Mondiale de la santé,** Thalassémie et autres hémoglobinopathies, Mai 2006.

**Sangare A, Sanogo I, Meite M, Ambofo Y, Abe Sopié V, Segben A.** Contribution a l'étude du profil hématologique de l'alpha thalassémie chez le nouveau-né en cote d'ivoire, *médecine d'Afrique noire*, vol 38 (8/9), pp 551-557, 1991.

**Siala H, Ouali F, Messaoud T, Bibi A And Fattoum S.**  $\alpha$ -Thalassaemia In Tunisia: some epidemiological and molecular data, *Journal of Genetics*, vol 87, pp 229–234. 2008.

**Souza A.E.S, Cardoso G.L, Takanashi S.Y.L and Guerreiro J.F.**  $\alpha$ -Thalassaemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarém, Pará State, vol 8 (2), pp 477-481. 2009.

**Vaubourdolle M.** Biochimie Hématologie, Tome 2, Édition 3. 2007

**Weatherhall. DJ.** Host genetics and infectious disease. *Para-sitology*, vol 112, pp S23-S29. 1996.

**Weatherall D J, Clegg J B.** The thalassaemia syndromes, 4<sup>ème</sup> édition. Oxford: Blackwell Science, 2001.

**Wee Y.C, Tan K.L, Wai-Ping Chow T, Yap S.F and Mary Anne Tan J.A.** Heterogeneity in  $\alpha$ -thalassaemia interactions in Malays, Chinese and Indians in Malaysia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. Vol 31, pp 540 – 546. 2005

**Zhenning He and Eric Russell J.** Expression, purification, and characterization of human hemoglobins Gower-1 (z2e2), Gower-2 (a2e2), and Portland-2 (z2b2) assembled in complex transgenic–knockout mice, *BLOOD*, vol 97, pp 1099–1105. 2001.



---

**Zorai A, Harteveld CL, Bakir A, Van Delft P, Falfoul A, Dellagi K, Abbas S, Giordano PC.**  
Molecular spectrum of alpha-thalassemia in Tunisia: epidemiology and detection at birth.  
HEMOGLOBIN, vol 26, pp 353-62. 2002.