

## Techniques et stratégie d'identification des défauts moléculaires des hémoglobinopathies en Tunisie

S. FATTOUM,  
A. BIBI,  
H. SIALA,  
T. MESSAOUD

**Résumé :** Les hémoglobinopathies sont les maladies monogéniques les plus répandues dans le monde. Les thalassémies et la drépanocytose en sont les manifestations les plus fréquentes en Tunisie.

Devant l'extrême hétérogénéité des défauts moléculaires responsables des hémoglobinopathies (plus de 400 mutations touchant les gènes  $\alpha$  et  $\beta$ -globine), une large batterie de techniques de biologie moléculaire a été développée pour l'identification et la caractérisation génotypique de ces maladies.

Les techniques sont basées sur l'amplification de l'ADN génomique par réaction de polymérisation en chaîne et incluent la digestion par les enzymes de restriction, le reverse dot blot et l'amplification allèle spécifique (ARMS) pour les mutations connues. L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant et le séquençage de l'ADN sont utilisés pour les mutations non connues. La Gap-PCR est utilisée essentiellement pour identifier les grandes délétions.

La stratégie utilisée dans la caractérisation moléculaire des mutations débute par un tri préalable basé sur les données phénotypiques du cas étudié. Le choix des mutations testées en priorité est dicté par le spectre des mutations préalablement dépeint dans la population tunisienne. C'est ainsi que les mutations cd 39 (C $\rightarrow$ T) et IVS1-110 (G $\rightarrow$ A) qui constituent près de 70% de l'ensemble des mutations  $\beta$ -thalassémiques sont recherchées en première intention chez les porteurs du trait  $\beta$ -thalassémique. De même la délétion -  $\alpha$ <sup>3.7</sup> est la première recherchée dans les  $\alpha$ -thalassémies.

Cette stratégie appliquée dans notre laboratoire nous a permis d'identifier près de 97.7% des défauts moléculaires responsables d'hémoglobinopathies. Elle offre ainsi la possibilité d'affiner le conseil génétique et de répondre d'une manière fiable et plus rapide aux demandes croissantes du diagnostic prénatal.

**Mots-clés :** *Hémoglobinopathies, techniques, stratégie, défauts moléculaires, Tunisie.*

**Abstract :** *The hemoglobinopathies are the most common monogenic diseases worldwide.*

Thalassemias and sickle cell disease are the most frequent hemoglobin disorders in Tunisia. According to the great heterogeneity of molecular defects that are responsible of hemoglobinopathies (more than 400 mutations affecting the  $\alpha$  and  $\beta$  globine genes), a large panel of techniques in molecular biology have been developed for the genotype identification and characterization of these diseases.

Different techniques using polymerase chain reaction (PCR)-based methodology are involved including the digestion by restriction enzymes, the reverse dot blot and the amplification refractory mutation system (ARMS) methods for

Laboratoire de Biochimie  
Clinique, hôpital d'enfants Tunis.

Known mutations. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and DNA sequencing are used whenever any mutations were found by the previous methods. Gap-PCR is mainly used to identify large deletions.

The strategy used in the molecular characterization of mutations begins by a preliminary tri based on phenotypic data of the studied case. Selection of mutations that should be tested in priority is based on the spectrum of mutations usually observed in the tunisian population. Thus, the cd39 (C $\rightarrow$ T) and IVSI-110 (G $\rightarrow$ A) mutations that constitute 70% approximately of the total  $\beta$ -thal mutations in the country, are searched firstly in the  $\beta$ -thalassemia carriers. The  $-\alpha^{3.7}$  deletion is also tested firstly concerning  $\alpha$ -thalassemia.

Application of such a strategy in our laboratory, allowed us to identify about 97.7% of molecular disorders responsible of hemoglobinopathies. This strategy offers the possibility to refine the genetic counsil and to answer in a reliable and more rapid way to the increasing demands of prenatal diagnosis.

**Key-words :** Hemoglobinopathies, techniques, strategy, molecular defects, Tunisia.

### Introduction

Les Hémoglobinopathies sont des maladies héréditaires dues à des anomalies génétiques de l'hémoglobine (Hb). La molécule d'Hb est un tétramère constitué de 4 chaînes de globine identiques 2 à 2 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ). Les gènes qui codent pour la globine appartiennent à 2 loci: le locus  $\alpha$ -globine situé sur le Chromosome 16 et le locus  $\beta$ -globine situé sur le Chromosome 11 [1]. Les anomalies de l'Hb appartiennent à 2 grands groupes :

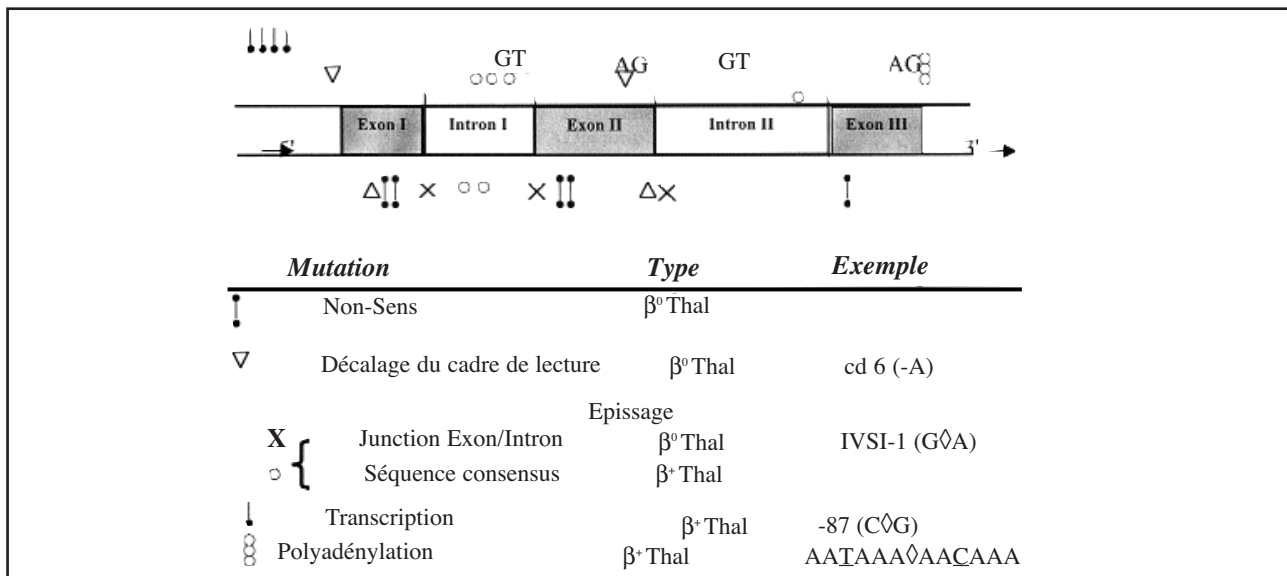
- Les anomalies de synthèse caractérisées par une réduction ou abolition de la production des chaînes de l'Hb à l'origine des  $\alpha$  et des  $\beta$ -thalassémies.
- Les anomalies de structure où l'une des chaînes de l'Hb est modifiée malgré une production normale, donnant des variants structuraux anormaux de l'Hb. L'exemple le plus courant est celui de l'HbS, responsable de la drépanocytose.

La Drépanocytose est due à un changement structural dans la composition en acides aminés de la chaîne  $\beta$ -globine : en position 6 l'acide glutamique est remplacé par une valine aboutissant à une hémoglobine anormale : l'HbS. Sur le plan moléculaire la mutation apparaît sur le codon 6 du gène  $\beta$ -globine sous forme d'une substitution

d'une seule base : GAG  $\rightarrow$  GTG.

La  $\beta$ -thalassémie est due à un déficit de synthèse de la chaîne  $\beta$ -globine, ce déficit peut être total ( $\beta^0$ -thalassémie) ou partiel ( $\beta^+$  thalassémie). La  $\beta$ -thalassémie est due à une grande variété de mutations qui peuvent apparaître à des endroits différents du gène  $\beta$ -globine (Exons, Introns, régions régulatrices en 5' et en 3'). La grande majorité des lésions moléculaires sont des mutations ponctuelles de type substitution, insertion ou microdéletion [2]. Ces mutations peuvent conduire à l'apparition prématurée d'un codon stop (mutation non sens) ou le décalage du cadre de lecture (frameshift) arrêtant assez tôt la synthèse protéique conduisant à une  $\beta^0$ -thalassémie. Certaines mutations peuvent affecter le processus d'épissage et impliquer les jonctions Exon/Intron en touchant les dinucléotides invariants présents à l'extrémité 5' des introns (GT) ou en 3' (AG) à l'origine d'une  $\beta^0$ -thalassémie. Elles peuvent aussi impliquer les régions consensus au niveau de séquences éloignées des dinucléotides à l'origine d'une  $\beta^+$  thalassémie.

D'autres mutations peuvent affecter la transcription en impliquant la région du promoteur en 5' du gène  $\beta$ -globine ou encore la région de polyadénylation en 3' et



**Figure 1 : Exemples de défauts moléculaires du gène  $\beta$ -globine à l'origine des  $\beta$ -thalassémies**

entraîner une  $\beta^+$  thalassémie (figure 1).

L' $\alpha$ -thalassémie est due à un déficit de synthèse, total ou partiel de la chaîne  $\alpha$ -globine.

A l'opposé des  $\beta$ -thalassémies, l' $\alpha$ -thalassémie est plus fréquemment causée par des délétions impliquant un ou 2 gènes  $\alpha$ -globine [3]. La délétion d'un gène aboutit à une  $\alpha^+$ -thal dont la plus fréquente en Méditerranée est la  $-\alpha^{3.7}$  (délétion de 3.7 kb). La délétion de deux gènes sur le même chromosome aboutit à une  $\alpha^0$ -thal dont les plus fréquentes en Méditerranée sont la - - Med I (délétion de 17.5Kb) et la - ( $\alpha$ )<sup>20.5</sup> (délétion de 20.5 Kb).

De plus en plus de mutations  $\alpha$ -thal non délétionnelles sont décrites en région méditerranéenne, les plus courantes étant la -5nt ou  $\alpha^{\text{HphI}}$ , une microdélétion de 5 nucléotides (TGGAG) au tout début de l'IVS1 du gène  $\alpha_2$  et la PolyA<sub>1</sub> ou  $\alpha^{\text{Tsaudi}}$ , une substitution au signal de polyadénylation en 3' du gène  $\alpha_2$  (AATAAA  $\hat{\Delta}$  AATAAG).

### Techniques d'identification moléculaire

L'avènement de la PCR (polymerase chain reaction) a facilité le diagnostic génotypique des hémoglobinopathies qui repose actuellement sur plusieurs types de techniques.

**PCR-RFLP (RFLP : Restriction fragment length polymorphism) :**

Cette méthode est basée sur les propriétés des enzymes

de restriction qui sont capables de couper l'ADN double brin de manière spécifique et reproductible. Une mutation qui survient au niveau d'un site de reconnaissance de l'enzyme aura pour effet d'abolir ce site. A l'inverse une séquence qui n'était pas une cible peut le devenir à la suite d'une mutation ponctuelle.

Cette technique est souvent utilisée dans le diagnostic génotypique aussi bien des variants structuraux de l'Hb que de certaines mutations  $\beta$ -thalassémiques [4].

Pour mettre en évidence de telles modifications, une PCR est réalisée sur des fragments d'ADN couvrant la partie du gène où se trouve la mutation recherchée, suivie d'une digestion enzymatique (Tableau I).

Le fragment 1 d'ADN amplifié couvre la majorité des mutations  $\beta$ -thalassémiques recherchés dans notre laboratoire ainsi que la mutation drépanocytaire (HbS). Ce fragment est constitué de 743pb et s'étend de -129 par rapport au cap site jusqu'au nucléotide 115 de l'IVSII. Les amorces utilisées pour amplifier ce fragment sont :

**Amorce sens (China 1) :** 5'-GTA CGG CTG TCA TCA CTT AGA CCT CA-3'

**Amorce anti-sens (PCO6) :** 5'-TCA TTC GTC TGT TTC CCA TT-3'

**Tableau I : Variants d'Hb et mutations  $\beta$ -thalassémiques détectables par PCR-RFLP et observées en Tunisie**

Mutation	Enzyme de Restriction Création (+) ou abolition (-) d'1 site	Fragment d'ADN amplifié	Taille des fragments après digestion (en paire de base pb)	
-87 C $\rightarrow$ G	- Avr II	Fragment 1	49 694	Normal
			743	Muté
Cd5 (-CT)	Bsu36I	Fragment 1	201 201 88 253	Normal
			402 88 253	Muté
Cd6 (-A)	Bsu36I	Fragment 1	201 201 88 253	Normal
			402 88 253	Muté
HbS	Bsu36I	Fragment 1	201 201 88 253	Normal
			402 88 253	Muté
Cd30 (G $\rightarrow$ C)	+ Mae II	Fragment 1	244 364 135	Normal
			244 33 331 135	Muté
IVSI-1(G $\rightarrow$ A)	- BsaI	Fragment 1	743	Normal
			270 473	Muté
IVSI-2(T $\rightarrow$ A)	+ Fok I	Fragment 1	250 493	Normal
			250 35 458	Muté
IVSI-5(G $\rightarrow$ A)	EcoR V	Fragment 1	743	Normal
			283 460	Muté
IVSI-110 (G $\rightarrow$ A)	MboI	Fragment 1	130 156 457	Normal
			130 156 387 70	Muté
IVSI-116 (T $\rightarrow$ G)	+ Mae I	Fragment 1	50 114 579	Normal
			50 114 225 354	Muté
IVSI-130 (G $\rightarrow$ C)	Bsu36I	Fragment 1	201 201 88 253	Normal
			402 88 253	Muté
Cd39 (C $\rightarrow$ T)	+ Mae I	Fragment 1	50 114 579	Normal
			50 114 269 310	Muté
IVSII-1(G $\rightarrow$ A)	- Hph I	Fragment 1	24 215 22 234 45 90 113	Normal
			24 215 22 234 45 203	Muté
IVSII-745 (C $\rightarrow$ G)	RsaI	Fragment 2	423	Normal
			289 134	Muté
HbOArab	Eco RI	Fragment 3	271 96	Normal
			367	Muté
HbD Punjab	Eco RI	Fragment 3	271 96	Normal
			367	Muté

IVSII-745 (C $\rightarrow$ G). Il est constitué de 423pb et s'étend de l'IVSII-459 jusqu'au nucléotide 30 de l'exon 3. Les amorces utilisées pour amplifier ce fragment sont :  
*Amorce sens (China 3) : 5'-GTG TAC ACA TAT TGA CCA AA-3'*  
*Amorce anti-sens (China 4) : 5'-AGC ACA CAG ACC*

AGC ACG TT-3'

Le fragment 3 permet de détecter les mutations génératrices de l'HbOArab et de l'HbD Punjab. Il est constitué de 367pb et s'étend de l'IVSII-809 jusqu'au nucléotide 1666 par rapport au cap site. Les amorces utilisées pour amplifier ce fragment sont :

## Techniques et stratégie d'identification des défauts moléculaires des hémoglobinopathies

*Amorce sens (E3) : 5' -AAGGCCCTTTTGCTAATCATG-3'.*

*Amorce anti-sens (PS2) : 5' - CACTGACCTCCCA-CATTCCC-3'.*

*Reverse Dot Blot (RDB) [5]:*

C'est la deuxième technique utilisée dans notre laboratoire pour la recherche des mutations connues. Elle est basée sur l'hybridation des oligonucléotides allèle-spécifiques (ASO : Allele Specific Oligonucleotide) aux séquences d'ADN cibles amplifiées par PCR.

En pratique, pour chaque mutation testée, deux sondes aminées sont synthétisées : l'une spécifique de l'allèle normal, l'autre spécifique de l'allèle muté. Les sondes sont ensuite fixées de façon covalente à une membrane de nylon chargée avec un groupement carboxyle libre.

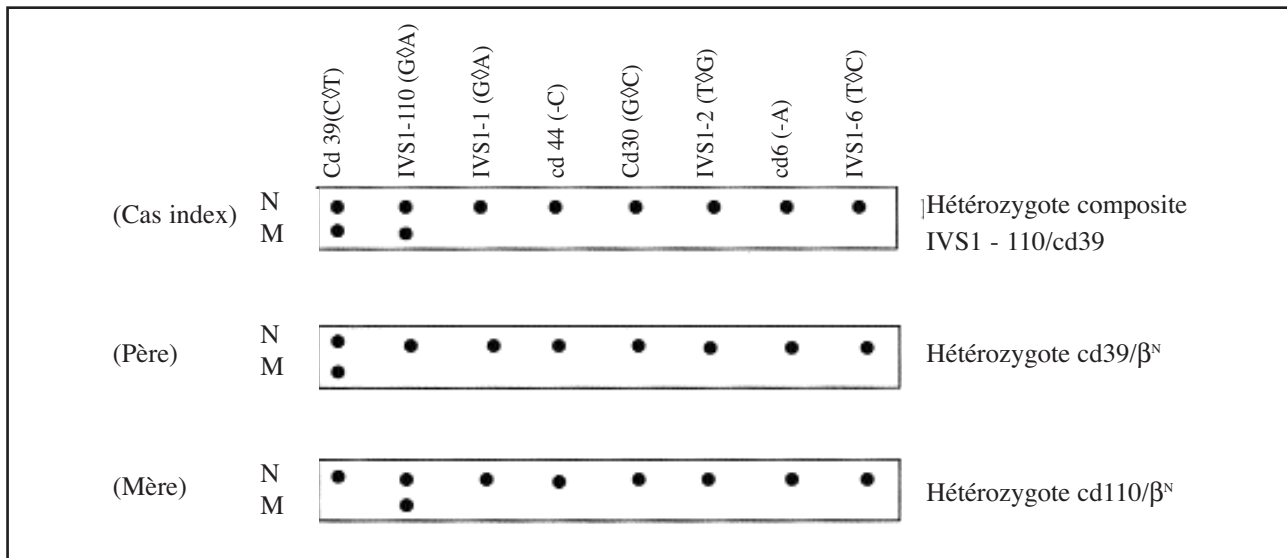
L'ADN à tester est amplifié avec des amorces marquées à la biotine. Le produit est hybridé à la batterie de sondes fixée et révélé par une réaction enzymatique au moyen d'un substrat chromogène. Les séquences des différentes sondes aminées relatives aux mutations tunisiennes ont été préalablement rapportées [6].

La méthode est applicable pour la majorité des muta-

Elle constitue une autre approche de recherche des mutations connues sur les gènes de globine. L'amplification de l'ADN à tester se fait à l'aide de deux couples d'amorces : le premier couple est spécifique de l'allèle normal (amorce sens ou amorce commune et amorce anti-sens complémentaire de l'allèle normal) ; le deuxième couple est spécifique de l'allèle portant la mutation (amorce commune et amorce anti-sens complémentaire de l'allèle muté ; cette dernière amorce porte la mutation recherchée en son extrémité 3'). Ces amorces n'amplifient que si leur extrémité 3' possède une parfaite complémentarité avec l'ADN.

Ainsi, le premier couple n'amplifie qu'en présence de l'allèle normal et le second qu'en présence de l'allèle muté. En pratique, les deux amplifications sont menées en parallèle dans deux tubes différents. Les bandes obtenues sont de même taille. Un troisième couple d'amorces est introduit dans les deux tubes et sert de contrôle interne.

Le tableau II regroupe les séquences des amorces utilisées dans notre laboratoire pour la recherche de la drépanocytose et de quelques mutations  $\alpha$  et  $\beta$ -thalassémiques par



**Figure 2 : Cas de RDB effectué à l'occasion d'un diagnostic prénatal**

tions ponctuelles ( $\beta$ -thal., variants structuraux) et convient aussi pour le diagnostic prénatal (figure 2).

*Amplification PCR-Allele spécifique (ARMS :*

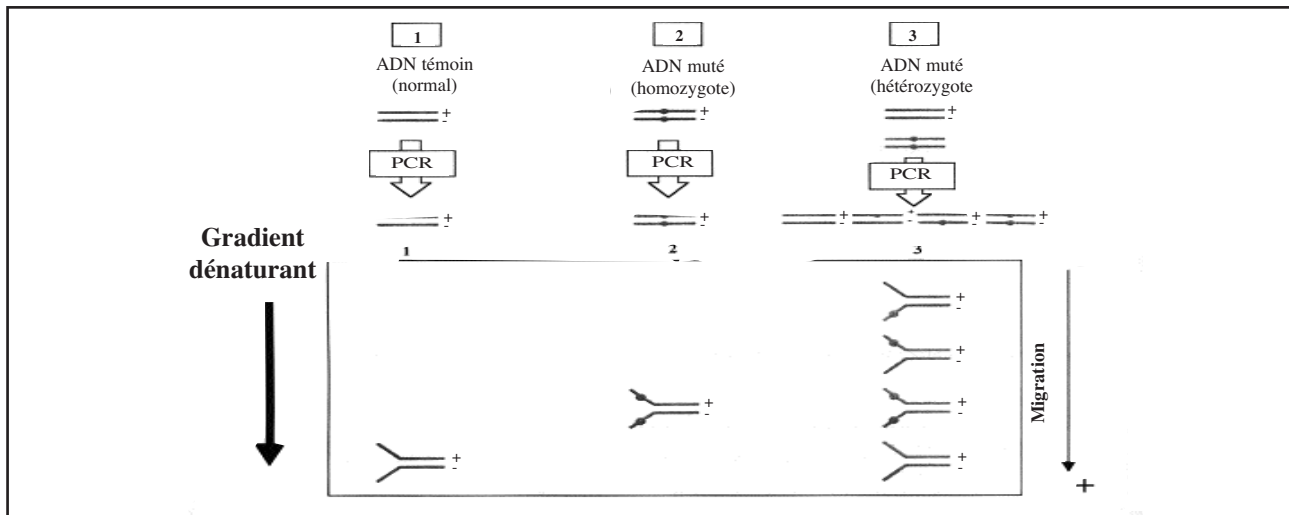
*Amplification Refractory Mutation System) [7,8].*

cette technique.

Si la mutation reste inconnue, nous procédons à une recherche d'une anomalie de séquence dans le fragment d'ADN par la technique DGGE.

**Tableau II : Séquences des amorces utilisées pour la recherche de la drépanocytose et de quelques mutations  $\alpha$  et  $\beta$ -thalassémiques par ARMS [9].**

	Gène $\beta$ globine	Taille du fragment (pb)
Amorces de contrôle	<b>CT1</b> : 5'- gAA gAT CTA gAC AgT ggA TAC ATA ACA AAT gCA Tg - 3' <b>CT2</b> : 5'- TTC TCC gAA ggT AAT TgC CTC CCA gAT CTg AgT CC -3'	
Amorces communes	<b>CP1</b> : 5'- TAC ggC TgT CAT CAC TTA gAC CTC ACC CTg - 3' <b>CP2</b> : 5'- ATg CAC TgA CCT CCC ACA TTC CCT TTT TAg - 3' <b>CP3</b> : 5'- TTA AAC CTg TCT TgT AAC CTT gAT ACg AAC - 3'	
Amorces spécifiques Cd39 (C $\Delta$ T)	<b>N1</b> : 5'- CAg ATC CCC AAA ggA CTC AAA gAA CCT gTg - 3' <b>M1</b> : 5'- CAg ATC CCC AAA ggA CTC AAA gAA CCT gTA - 3'	455
IVSI-110 (G $\Delta$ A)	<b>N2</b> : 5'- ACC AgC AgC CTA Agg gTg ggA AAA TAC ACC - 3' <b>M2</b> : 5'- ACC AgC AgC CTA Agg gTg ggA AAA TAC ACT - 3'	409
IVSI-6 (T $\Delta$ C)	<b>N3</b> : 5'- TCT CCT TAA ACC TgT CTT gTA ACC TTC ATA - 3' <b>M3</b> : 5'- TCT CCT TAA ACC TgT CTT gTA ACC TTC ATg - 3'	305
IVSI-1 (G $\Delta$ A)	<b>N4</b> : 5'- TTA AAC CTg TCT TgT AAC CTT gAT ACg AAC - 3' <b>M4</b> : 5'- TTA AAC CTg TCT TgT AAC CTT gAT ACg AAT - 3'	300
IVSII-745 (C $\Delta$ G)	<b>N5</b> : 5'- TCA TAT TgC TAA TAg CAg CTA CAA TCg AgC - 3' <b>M5</b> : 5'- TCA TAT TgC TAA TAg CAg CTA CAA TCg Agg - 3'	458
-87 (C $\Delta$ G)	<b>N6</b> : 5'- CAC TTA gAC CTC ACC CTg Tgg AgC CAC CCC - 3' <b>M6</b> : 5'- CAC TTA gAC CTC ACC CTg Tgg AgC CAC CCg - 3'	287
IVSII-1 (G $\Delta$ A)	<b>N7</b> : 5'- AAg AAA ACA TCA Agg gTC CCA TAg ACT gAg - 3' <b>M7</b> : 5'- AAg AAA ACA TCA Agg gTC CCA TAg ACT gAT - 3'	653
HbS	<b>N8</b> : 5'- TAC ggC TgT CAT CAC TTA gAC CTC ACC CTg - 3' <b>M8</b> : 5'- TCT CCT TAA ACC TgT CTT gTA ACC TTC ATA - 3'	305
<b>Gène <math>\alpha</math> globine</b>		
Amorce commune $\alpha^{HphI}$	5' - CCA TTG TTG GCA CAT TCC GGG ACA - 3'	
Amorces spécifiques $\alpha^{HphI}$	<b>N9</b> : 5' - GTG CGG AGG CCC TGG AGA GGT GAG GCT - 3' <b>M9</b> : 5' - GTG CGG AGG CCC TGG AGA GTC T - 3'	769 764
N : amorce spécifique de l'allèle normal ; M : amorce spécifique de l'allèle muté.		



**Figure 3 : Principe de la détection d'une mutation ponctuelle par la méthode DGGE [12]**

## Techniques et stratégie d'identification des défauts moléculaires des hémoglobinopathies

La DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) [10, 11] : Cette méthode permet de séparer des fragments qui diffèrent d'une seule paire de base. La méthode est basée sur la mobilité électrophorétique de l'ADN double brin dans un gradient linéaire croissant d'agents dénaturants en l'occurrence l'urée et le formamide. Un seul changement dans les régions à haute température de fusion permet de créer une fourche dont la conséquence est la retardation sur le gel séparant ainsi le fragment muté du fragment normal.

Au cours de la réaction PCR, les fragments mutés et normaux peuvent s'associer en Hétéroduplex. Ainsi un homozygote normal présentera une seule bande, un homozygote muté présentera aussi une seule bande mais différente de la première. Un hétérozygote présentera 4 bandes : 2 homoduplex et 2 hétéroduplex (figure 3) [12].

Les meilleures conditions d'utilisation de la technique DGGE sont réunies lorsque le fragment analysé présente un domaine de haute Tm et un domaine de faible Tm. Ces domaines peuvent être créés artificiellement par incorporation lors de la PCR d'un "clamp" riche en GC ou d'une molécule de psoralène (l'amorce sens utilisée dans la PCR porte en son extrémité 5' le clamp GC ou le psoralène).

Dans notre laboratoire, nous avons opté pour l'usage des amorces clampées au psoralène (agent intercalant photoactivable) [13]. Ce type de clamping présente l'avantage d'être moins coûteux que le clamp GC.

En pratique, trois fragments couvrant la majorité du gène  $\beta$ -globine sont générés par PCR et soumis à une DGGE. (figure 4). Ces fragments sont étudiés directement et après digestion enzymatique pour une exploration complémentaire du gène. (Tableau III).

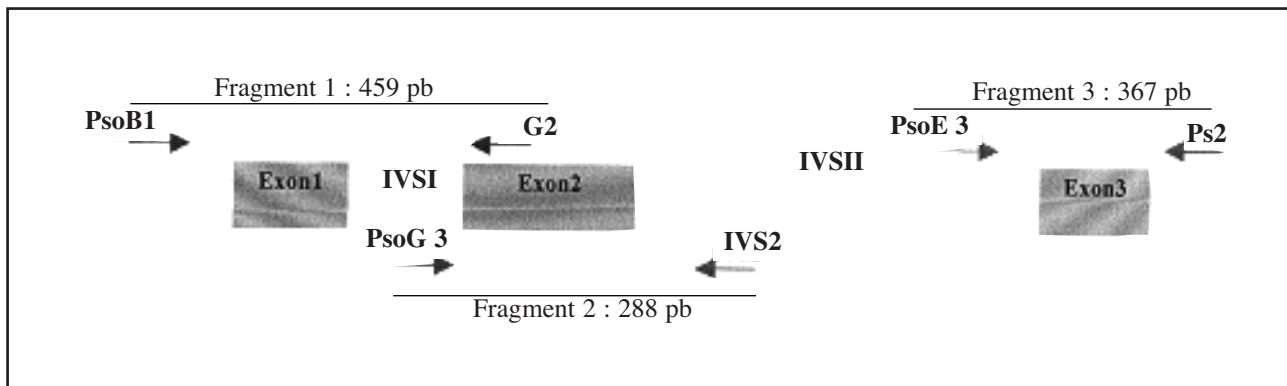


Figure 4 : Fragments du gène  $\beta$ -globine étudiés par DGGE

PsoB1: 5'-Psoralène AATCATCACTTAGACCTCACCC-3' ; G2 : 5'-ATCAGGAGTGGACAGATCCC-3' ;  
 PsoG1: 5'-PsoralèneTATGACTCTCTCTGCCTATTGG-3' ; IVS2: 5'-AAAACATCAAGGGTCCCATA-3' ;  
 PsoE3: 5'-Psoralène-AAGGCCCTTTTGCTAATCATG-3' ; PS2: 5'-CACTGACCTCCCACATTCCC-3'.

Tableau III : Conditions expérimentales de l'analyse du gène  $\beta$ -globine par DGGE

Fragment	Digestion	Gradient	Température °C	Voltage-Heures (VH)
PSOB1-G2	-	30-80%	60	2200
PSOB1-G2	Nla III	30-70%	60	1000
PSOB1-G2	Mbo II	30-80%	60	2200
PsoG1-IVS2	-	30-70%	60	1000
PsoE3-PS2	-	10-60%	60	1900
PsoE3-PS2	Nla IV	30-70%	60	1000

## revue générale

*Gap-PCR* [14,15] : Le principe de cette réaction est d'amplifier chaque échantillon avec 2 couples d'amorces : le premier permettant de détecter l'allèle normal (couple N) et le second permettant de détecter l'allèle comportant la délétion (couple M). Ces deux couples ont en commun l'amorce sens ( $A_s$ ). L'amorce anti-sens du couple N ( $A_{asN}$ ) est située dans la zone de la délétion et ne donne pas de signal d'amplification en présence de la délétion. Celle du couple M ( $A_{asM}$ ) étant située en aval de la région délétée, la distance entre les amorces étant trop grande pour permettre l'amplification qui n'a lieu qu'en présence de la délétion (figure 5).

Cette technique est applicable surtout pour détecter les

grandes délétions responsables d' $\alpha$ -thalassémie (Tableau IV).

*Le séquençage* [16,17] : C'est le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher une séquence anormale dans un locus donné.

La technique de séquençage actuellement la plus utilisée est le séquençage automatique sur des analyseurs génétiques tel que l'ABI prism 310 (Applied Biosystem, Forster city, CA, USA). Le principe général est celui de l'arrêt de la synthèse de la chaîne nucléotidique lors de l'incorporation de didésoxynucléosides triphosphates (ddNTPs). Ces derniers présentent la particularité d'être marqués chacun par un fluorochrome différent (C : bleu ;

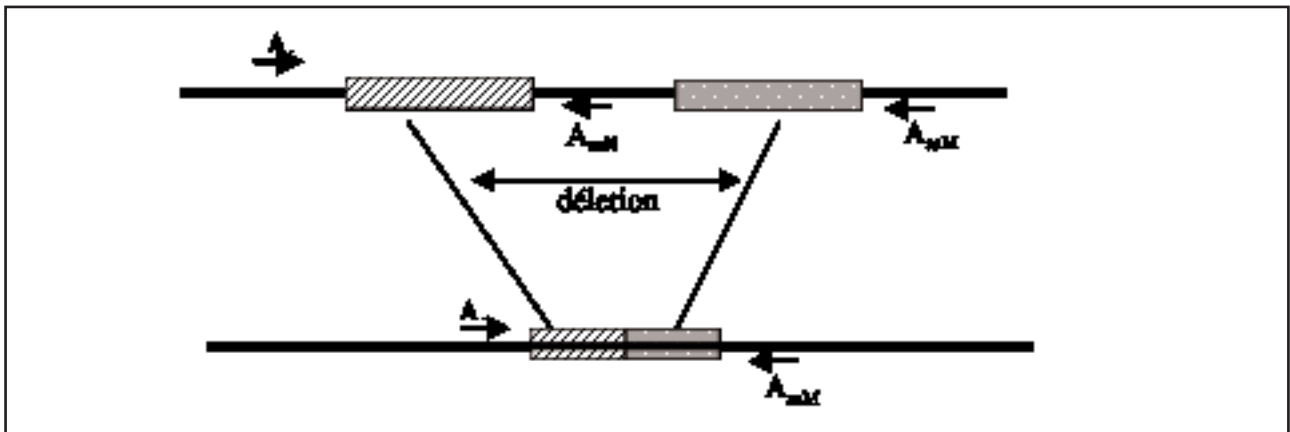


Figure 5 : Schéma général d'une Gap-PCR à la recherche d'une large délétion sur le locus  $\alpha$ -globine

Tableau IV : Séquences des amorces utilisées dans la recherche de certaines délétions  $\alpha$ -thal

Mutation	Séquences des amorces
$-\alpha^{3,7}$	As : 5'-CTT TCC CTA CCC AGA GCC AGG TT-3' AasN : 5'-CCA TTG TTG GCA CAT TCC GGG ACA-3' AasM: 5'-GCC CAT GCT GGC ACG TTT CTGAGG-3'
--MEDI	As: 5'-GGA GAA GTA GGT CTT CGT GGC-3' AasN: 5'-TAC AGC AGA GTG AGT GCT GCA T-3' AasM: 5'-ACA GTC ACT CCT GAG GCC AGT C-3'
$-(\alpha)^{20,5}$	As: 5'-CCA TGC TGG CAC GTT TCT GAG G-3' AasN: 5'-TGG AGG GTG GAG ACG TCC TG-3' AasM: 5'-GGC AAG CTG GTG GTG TTA CAC A-3'

T : rouge ; G : jaune ; A : vert). Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse capillaire et passent devant une source laser qui excite les fluorochromes portés par les ddNTPs incorporés. Ces derniers vont émettre à leur tour une lumière de longueur d'onde spécifique. Une analyse informatique des différents signaux permet d'établir la séquence d'ADN analysée (figure 6). Le séquençage de l'ADN peut être direct (par petits fragments) ou orienté par d'autres techniques telle que la DGGE pour cibler la séquence suspectée.

### Stratégie

La stratégie de diagnostic moléculaire est orientée par les données phénotypiques.



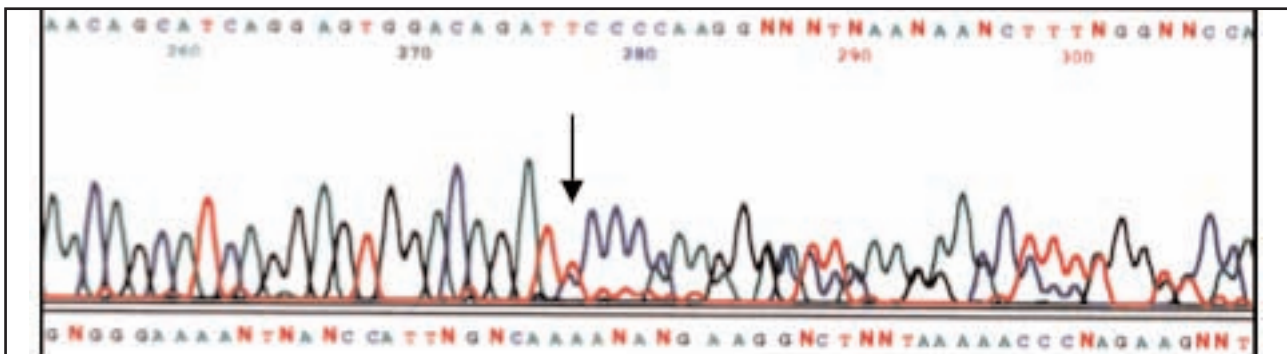


Figure 6 : Exemple de séquence anti-sens d'une mutation hétérozygote créant un décalage du cadre de lecture (frameshift) au niveau de l'exon 2 du gène  $\beta$ -globine : Codon 47 (+A)

Tableau V : Fréquences des mutations  $\beta$ -thalassémiques observées en Tunisie [6, 21, 22, 23]

Mutations	Type	Fréquence (%) [18]	Fréquence (%) [19]	Fréquence (%) [20]	Fréquence (%) [6]
<i>Mutations plus fréquentes</i>					
Cd39 (C $\rightarrow$ T)	$\beta^0$	19.00	48.76	43.78	49.00
IVS1-110 (G $\rightarrow$ A)	$\beta^+$	7.50	15.70	10.81	21.00
<i>Mutations moins fréquentes</i>					
IVS1-1 (G $\rightarrow$ A)	$\beta^0$	1.50	3.31	4.32	4.50
Cd44 (-C)	$b^0$		1.65	1.62	3.80
Cd30 (G $\rightarrow$ C)	$\beta^+$		2.48	3.24	3.20
IVS1-2 (T $\rightarrow$ G)	$\beta^0$		19.83	0.54	3.00
IVSII-745 (C $\rightarrow$ G)	$\beta^+$	7.50		2.16	2.60
Cd6 (-A)	$b^0$	16.00	1.65	7.02	2.60
-87 (C $\rightarrow$ G)	$\beta^+$				1.70
IVS1-5 (G $\rightarrow$ A)	$\beta^+$		3.31		1.50
<i>Mutations rares</i>					
IVS1-5 (G $\rightarrow$ C)	$\beta^+$			3.24	1.00
-30 (T $\rightarrow$ A)	$\beta^+$				0.80
Cd25/26 (+T)	$\beta^0$				0.60
IVSI-6 (T $\rightarrow$ C)	$\beta^+$	10.50	2.48	0.54	0.60
IVSII-1 (G $\rightarrow$ A)	$\beta^0$			1.62	0.60
Cd5 (-CT)	$\beta^0$				0.40
IVSII-848 (C $\rightarrow$ A)	$\beta^+$		0.83		0.40
IVSII-849 (A $\rightarrow$ C)	$\beta^+$			4.32	0.40
Cd8 (-AA)	$\beta^0$			0.54	0.20
IVSI-5 (G $\rightarrow$ T)	$\beta^+$			2.16	
Cd 37 (G $\rightarrow$ A)	$\beta^0$			1.08	
-29 (A $\rightarrow$ G)	$\beta^+$			1.08	
IVSI-2 (T $\rightarrow$ C)	$\beta^0$			0.54	
IVSI-116 (T $\rightarrow$ C)	$\beta^0$			0.54	
NI		38.00		10.81	2.30
<b>Nombre total de chromosomes étudiés</b>		68	121	185	475

Pour la  $\beta$ -thalassémie, la PCR et la PCR-RFLP sont les principales techniques utilisées dans la recherche des mutations connues. Au vue des données épidémiologiques, 2 mutations qui justifient près de 70% des

défauts  $\beta$ -thal (cd 39 C $\rightarrow$ T et IVSI-110 G $\rightarrow$ A) sont les premières testées. Dans une seconde étape ce sont les mutations communes mais moins fréquentes qui sont testées par RDB sur la même membrane. Les cas posi-

tifs sont confirmés par une seconde technique (ARMS ou PCR/RFLP). Notons que pour la mutation IVSII-745 (C $\hat{\Delta}$ G) qui nécessite une amplification par un couple d'amorces différent est testée séparément. Les mutations rares sont testées en dernier lieu.

Une réponse négative par ces méthodes oriente vers l'utilisation des techniques de recherche des mutations inconnues. Dans ce contexte la DGGE est la technique la plus souvent employée ; elle permet de sélectionner le fragment porteur de la mutation qui sera soumis au séquençage pour l'identification définitive du défaut nucléotidique.

L' $\alpha$ -thalassémie dans ses formes majeures ne semble pas être fréquente dans notre pays. Elle n'est détectable qu'à la naissance par la présence d'Hb Bart's ou chez l'adulte porteur d'une hémoglobinosé H (forme majeure d' $\alpha$ -thalassémie la plus sévère et compatible avec la vie). Dans ce type d'hémoglobinopathies, la stratégie d'identification du défaut moléculaire tient compte encore une fois des données phénotypiques et épidémiologiques. C'est la délétion - $\alpha^{3,7}$  qui est toujours recherchée en premier lieu par GAP/PCR. En cas d'hémoglobinosé H, la recherche de mutations ponctuelles est envisagée. Ce sont les mutations  $\alpha^{\text{Tsaudi}}$  et la - 5nt ( $\alpha^{\text{HphI}}$ ) qui sont les plus fréquemment recherchées, la première par PCR/RFLP avec amorce dégénérée [18] et la deuxième par PCR/allèle spécifique (Tableau II).

Les mutations inconnues sont recherchées par séquençage des gènes  $\alpha 2$  et  $\alpha 1$  globine [19,20].

La recherche de la drépanocytose est effectuée par une PCR suivie d'une digestion enzymatique (PCR-RFLP); c'est le moyen le plus simple, le plus rapide et le moins coûteux pour caractériser cette mutation.

### Discussion

L'identification des porteurs d'hémoglobinopathies et le diagnostic prénatal de la drépanocytose et de la  $\beta$ -thalassémie à travers une stratégie rapide et fiable a été l'objectif majeur des recherches menées dans notre pays depuis quelques années. Cette stratégie est basée sur la PCR et combine plusieurs techniques à la fois : la RDB et/ou l'ARMS, la digestion par les Enzymes de restric-

tion, la DGGE et le séquençage des produits amplifiés. Elle nous a permis d'assurer le diagnostic génotypique dans 97.7% des cas ce qui a facilité son application dans le diagnostic prénatal chez les couples à risque qui nous ont été adressés.

La stratégie adoptée peut toutefois varier d'un laboratoire à un autre selon la population étudiée [6, 21, 22, 23, 24] mais aussi selon les fréquences observées des allèles dans une région donnée ou encore des moyens techniques disponibles (Tableau V).

A ce jour, un total de 28 mutations  $\beta$ -thalassémiques ont été rapportées en Tunisie dont 4 nouvellement décrites. Il s'agit des mutations codon 9 (+TA) et PolyA (T $\hat{\Delta}$ A) [25] et codon 47 (+A) et codon 106/107 (+G) [26].

Actuellement, nous remarquons qu'un grand nombre de techniques de biologie moléculaire, souvent complémentaires, sont utilisées pour caractériser les variations de séquence des gènes  $\alpha$  ou  $\beta$ -globine. Les améliorations apportées au niveau des techniques ont pour objectif essentiel de réduire le coût et le temps des analyses. Au départ, la recherche des mutations  $\beta$ -thalassémiques se basait sur le déséquilibre de liaison existant entre la mutation et l'haplotype chromosomique. Cette stratégie longue et onéreuse ne permettant d'identifier que 62% des mutations [21].

La stratégie diagnostique utilisée à ce jour dans notre laboratoire fait appel pour la recherche des allèles habituellement rencontrés dans le pourtour méditerranéen et dans notre pays, à l'analyse de restriction, au RDB et à l'ARMS. La PCR-RFLP et le RDB présentent l'avantage de pouvoir rechercher plusieurs mutations ponctuelles à la fois à partir d'un même produit amplifié. Par ailleurs ces deux techniques nécessitent un temps de manipulation réduit par rapport au Southern-Blot et surtout ne font pas usage de radioactivité.

L'ARMS fait appel à deux simples PCR et se prête parfaitement à la recherche des mutations les plus fréquentes (codon 39 (C $\hat{\Delta}$ T) et IVSI-110 (G $\hat{\Delta}$ A)) lors d'un dépistage de masse et présente l'avantage de fournir un diagnostic rapide appliqué à des situations urgentes comme le diagnostic prénatal, particulièrement pour les familles répertoriées. En effet, cette technique comparée

au RDB ou à la PCR-RFLP réduit le temps d'analyse de 48 ou 24 heures à environ 3 heures et ne nécessite pas l'usage d'enzymes de restriction, ni de sondes ou d'amorces marquées et offre par conséquent une réduction du temps d'analyse. D'autre part, les techniques de PCR-RFLP et d'ARMS présentent l'avantage d'être plus simples à réaliser et d'avoir une meilleure reproductibilité que le RDB. Cette dernière technique est en effet très sensible aux variations de pH et de température et nécessite des conditions opérationnelles difficilement maîtrisables. Toutefois, devant l'hétérogénéité des mutations  $\beta$ -thalassémiques dans notre pays, la technique d'ARMS ne se prête pas à une recherche de première intention en raison du prix de revient relativement élevé des amorces.

Si la mutation reste toujours non identifiée par les techniques précédentes, nous procédons à une analyse des gènes par DGGE. Cette technique présente l'avantage de distinguer des fragments d'ADN de même taille, différant par une simple base pouvant être une mutation ou un simple polymorphisme neutre. La taille des fragments analysés peut aller jusqu'à 700pb [10]. La DGGE présente en plus l'avantage d'être de réalisation simple et d'éviter l'usage de la radioactivité. Elle est bien adaptée à l'analyse individuelle ainsi qu'au dépistage de masse. En effet, la quasi-totalité du gène  $\beta$ -globine peut être explorée en analysant par DGGE trois fragments d'ADN amplifiés. Le premier fragment (PSOB1/G2) permet à lui seul d'explorer 80% des mutations décrites dans notre pays. D'autre part, la reproductibilité des profils obtenus en DGGE permet une identification directe des mutations connues en présence de témoins. Une confirmation peut toujours être faite après mélange de l'ADN à tester avec un témoin connu. Cependant, la DGGE reste une technique assez lourde dans sa mise au point puisqu'elle nécessite une étude préalable des fragments explorés afin de choisir les amorces, de déterminer les conditions d'électrophorèse et de tracer les cartes de fusion. A noter également que cette technique n'est pas adaptée pour les régions riches en GC.

La technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) est un autre moyen de détection des variations de séquence au niveau des gènes de globine. La sen-

sibilité de détection des mutations par cette technique peut atteindre 80 à 90% [27]. Elle est simple et reproductible, son usage est d'autant plus facilité par la disponibilité de gels "pré-coulés" dans le commerce.

L'apparition récente d'une nouvelle technique automatisée, la D-HPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), constitue une avancée dans les techniques de criblage de gènes à la recherche de variations nucléotidiques. Il s'agit en effet d'une HPLC de produits de PCR dans des conditions dénaturantes.

Les profils atypiques détectés sont par la suite séquencés. Cette technique permet la détection des mutations ponctuelles, des microdélétions et des micro-insertions. Malgré une mise au point parfois délicate, elle permet un criblage rapide et automatisable des gènes. Des études ont rapporté une sensibilité maximale (100%) de détection des mutations par cette technique [28]. Elle peut donc être d'un apport considérable dans la recherche des mutations  $\alpha$  et  $\beta$  thalassémiques.

Les techniques de criblage des gènes (DGGE, SSCP et DHPLC) présentent l'avantage d'éviter un séquençage systématique des gènes. Le séquençage reste encore l'apanage de laboratoires spécialisés bien que son automatisation a facilité énormément le quotidien des manipulations techniques.

Un autre volet important tenant une place importante dans le diagnostic et l'évaluation du pronostic des hémoglobinopathies est l'établissement de corrélations phénotype-génotype, l'étude fonctionnelle des mutations et la recherche des facteurs de modération phénotypique. Dans ce contexte, la PCR en temps réel récemment introduite dans les laboratoires de recherche peut être d'une grande utilité.

### Conclusion

Les hémoglobinopathies sont fréquentes en Tunisie. Les plus connues sont la drépanocytose et les  $\beta$ -thalassémies, de gravité certaine malgré une hétérogénéité génotypique considérable (28 mutations  $\beta$ -thalassémiques répertoriées). Plusieurs techniques de biologie moléculaire sont actuellement disponibles pour caractériser, dans la grande majorité des cas les défauts génétiques responsables

des anomalies de l'hémoglobine. Chacune de ces techniques présente ses avantages et ses limites. Leur combinaison donne une grande fiabilité au diagnostic. Les recherches sont actuellement orientées vers l'étude de l'expression clinique des diverses anomalies dans le but d'étayer les corrélations entre phénotype et génotype.

### Références

1. Weatherall D.J., Clegg J.B. The Thalassaemia syndromes. Oxford 2001 Blackwell Science.
2. Huisman T.H.J., Carver MFH. The beta-and delta-thalassaemia repository. Hemoglobin 1998, 2: 169-95.
3. Higgs D.R.  $\alpha$ -thalassemia. In "the hemoglobinopathies". Bailliere's clinical Haematology 1993 ; 6 (1) : 117-150.
4. Old J.M., Petrou M., Modell B., et al. Feasibility of antenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia by DNA polymorphisms in Asian Indians and Cypriot populations. British Journal of Haematology 1984, 57 : 255-263.
5. Maggio A., Giambona A., Cai SP, Wall J., Kan YW., Chehab FF. Rapid and simultaneous typing of Hemoglobin S, Hemoglobin C and seven Mediterranean mutations by covalent reverse dot-blot analysis : application to prenatal diagnosis in Sicily. Blood 1993, 81(1) : 239-242.
6. Fattoum S., Messaoud T., Bibi A. Molecular Basis of  $\beta$  thalassaemia in the population of Tunisia. Hemoglobin 2004, 28 (3) : 177-187.
7. Old J., Khan S., Verma I., Fucharoen S., Kleanthous M., Ioannou P., Kotea N., Fisher C., Riazuddin S., Saxena R., Winichagoon P., Kyriacou K., Al-Quobaili F., Khan B. A multi-center study in order to define further the molecular basis of  $\beta$ -thalassaemia in Thailand, Pakistan, Sri Lanka, Mauritius, Syria, and India, and to development a simple molecular diagnostic strategy by ARMS-PCR. Hemoglobin 2001, 25 (4) : 397-407.
8. Newton C.R., Graham A., Heptinstall LE. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research 1989, 17 : 2503-2516.
9. Kyriacou K., Al Quobaili F., Pavlou E., Christopoulos G., Ioannou P., Kleanthous M. Molecular characterization of  $\beta$ -thalassaemia in Syria. Hemoglobin 2000 ; 24 (1) : 1-13.
10. Ghanem N., Girodon E., Vidaud M., Martin J., Fanen P., Plassa F., Goossens M. A comprehensive scanning method for rapid detection of beta-globin gene mutations and polymorphisms. Hum Mutat 1992, 1(3) : 229
11. Hartevelde K.L., Heister A., Giordano P.C., Losekoot M., Bernini L.F. Rapid detection of point mutations and polymorphisms of  $\alpha$ -globin genes by DGGE and SSCA. Human Mutat 1996, 7 (2) : 114-122.
12. Kaplan JC ; Delpech M. Le diagnostic génotypique. Dans Kaplan JC ; Delpech M (Eds). Biologie moléculaire et médecine, 2<sup>ème</sup> édition 1993 ; Médecine Sciences, Flammarion, Paris.pp 314-350.
13. Fernandez E, Bienvenu T, Desclaux Arramond F, Beldjord K, Kaplan JC, Beldjord C. Use of chemical clamps in denaturing gradient gel electrophoresis : application in the detection of the most frequent Mediterranean  $\beta$ -thalassemic mutations. PCR Methods Appl. 1993 ; 3 (2) :122-124.
14. Bowden D.K., Vickers M.A., Higgs D.R. A PCR-based strategy to detect the common severe determinant of  $\alpha$  Thalassaemia. Br J Haematol 1992, 84 (1) : 104-108.
15. Baysal E., Huisman T.H.J. Detection of Common Deletional  $\alpha$ Thalassaemia 2 Determinants by PCR. Am J Hematol 1994, 46 : 208-213.
16. Losekoot M., Fodde R., Hartevelde C.L., et al. Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA : a rapid and reliable diagnostic approach to  $\beta$ -thalassaemia. British Journal of Haematology 1991, 76 : 269-274.
17. Wong C., Dowling C.E., Saiki R., Hiuchi R.G., Erlich H.A., Kazazian HHJ. Characterisation of  $\beta$ -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature 1987, 330 : 384-386.
18. Jassim N., Al-Arrayed S., Gerard N., Al-Mukharraq H., Al-Ajami A., Ramasawmy R., Krishnamoorthy R. A mismatch-primer polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism strategy for rapid screening of the polyadenylation signal mutation  $\alpha$ T-Saudi (AATAAA-AATAAG) in the  $\alpha$  2-globin gene. Hemoglobin 1999 ; 23 (3) : 213-220.
19. Siala H., Fattoum S., Messaoud T., Ouali F., Gerard N. and Krishnamoorthy R. A novel  $\alpha$ -thalassaemia non sense mutation in codon 23 of the  $\alpha$ 2-globin gene (GAG $\rightarrow$ TAG) in a Tunisian Family. Hemoglobin 2004 ; 28 (3) : 249-254.

- 20.** Siala H., Ouali F., Messaoud T., Sfar R., Fattoum S. First description of a point mutation in the  $\alpha 1$  globin gene ( $\alpha 1$ , codon 119, CCT $\rightarrow$ TCT) : Hb Groene Hart associated with  $\alpha 3.7$ . *Hemoglobin* 2005 ; 29 (4) : 263-268.
- 21.** Chibani J., Vidaud M., Duquesnoy P., Berge-Lefranc J.L., Pirastu M., Ellouze F., Rosa J., Goossens M. The peculiar spectrum of beta-thalassemia genes in Tunisia. *Hum Genet* 1988 Feb ; 78 (2) : 190-2.
- 22.** Laradi S., Hadj Khelil A., Omri H., Chaieb A., Mahjoub T., Benliman H., Amri F., Saad A., Miled A., Leturq F., Ben Chibani J., Beldjord C. Analyse moléculaire et diagnostic prénatal de la  $\beta$ -thalassémie : a propos de notre expérience en Tunisie centrale. *Ann Biol Clin* 2000, 58 : 453-60.
- 23.** Chouk I., Ben Daoud B., Mellouli F., Bejaoui M., Gérard N., Dellagi K., and Abbes S. Contribution to the description of the  $\beta$ -thalassemia spectrum in Tunisia and the origin of mutation diversity. *Hemoglobin* 2004 ; 28 (3) : 189-195.
- 24.** Hadj Khelil A., Laradi S., Ferchichi S., Carion N., Béjaoui M., Saad A., Chaieb A., Miled A., Ben Chibani J., Perrin P. Stratégie diagnostique des mutations  $\beta$ -thalassémiques dans une famille Tunisienne, application au diagnostic prénatal. *Ann Biol Clin (Paris)* 2003, 61 (2) : 229-33
- 25.** Jacquette A., Le Roux G., Lacombe C., Goossens M., Pissard S. Compound heterozygosity for New Mutations in the  $\beta$ -globin gene [codon 9 (+TA) and Polyadenylation Site (AATAAA $\rightarrow$ AAAAAA)] Leads to Thalassemia Intermedia in a Tunisian Patient. *Hemoglobin* 2004, 28 (3) : 243-248.
- 26.** Bibi A., Messaoud T., Beldjord C., Fattoum S. Detection of two rare  $\beta$ -thalassemia alleles found in Tunisian population : codon 47 (+A) and codons 106/107 (+G). *Hemoglobin* 2006, 30 (4) : 1-11.
- 27.** Bogard M., Lamoril J., Analyse quantitative des acides nucléiques. In : *Biologie moléculaire en biologie clinique. I. Méthodes.* Collection Option Bio. Elsevier, 1998 : 119-226.
- 28.** Lefebvre S., Bourdin C.A., Borson-Chazot F., Penfornis A., Caron J., Ringeard I., Pinson S., Gimenez-Roqueplot AP., Calender A., Giraud S. Criblage par dHPLC des gènes SDHD, SDHB et SDHC chez 43 patient atteints de paragangliomes. 5<sup>e</sup> Rencontres des utilisateurs francophones du système WAVE D-HPLC. 25 Janvier 2006.