

# PRÉVALENCE DE L'ALPHA-THALASSÉMIE AU SEIN D'UNE POPULATION DRÉPANOCYTAIRE SÉNÉGALAISE

GUEYE TALL F<sup>1</sup>, NDOUR EHM<sup>1</sup>, LY DÈME I<sup>2</sup>, NDIAYE DIALLO R<sup>1</sup>, GUEYE PM<sup>1</sup>, DIOP P A<sup>1</sup>, DIAGNE I<sup>2</sup>, CISSÉ A<sup>1</sup>, JOLY P<sup>3</sup>, LOPEZ SALL P<sup>1</sup>

## RESUME

**Introduction :** La drépanocytose est une affection monogénique résultant d'une mutation au niveau du gène  $\beta$ -globine (HBB), caractérisée par une symptomatologie clinique variable. Différents facteurs génétiques modulateurs ont été identifiés ou suspectés pour leur influence directe ou indirecte sur la sévérité clinique de la maladie. Parmi ces facteurs, l'alpha-thalassémie serait associée à une plus grande fréquence de crises douloureuses et de syndrome thoracique aigu, alors qu'elle protégerait partiellement contre la survenue d'accident vasculaire cérébral. Peu de données relatives à l'alpha-thalassémie étant disponibles au Sénégal, cette étude visait à en déterminer la prévalence au sein d'une population drépanocytaire sénégalaise.

**Méthodes :** Il s'agit d'une étude prospective portant sur 300 drépanocytaires âgés de 1 à 17 ans, régulièrement suivis à l'Hôpital d'Enfants Albert Royer. Une technique dédiée de gap-PCR Multiplex a été utilisée pour rechercher les délétions alpha-thalassémiques les plus communes, à savoir les délétions -3.7, MED, SEA, -20.5 et -4.2 kb. L'homogénéité de répartition des allèles alpha-thalassémiques a été vérifiée au moyen de l'équilibre de Hardy-Weinberg (seuil de significativité à  $p < 0,05$ ).

**Résultats :** Sur les 300 patients, le sex ratio H/F était de 1,29. Seule la délétion -3.7 kb a été retrouvée. Sa prévalence était de 21% avec 19 % pour la forme hétérozygote et 2% pour la forme homozygote. L'application de l'équilibre de Hardy-Weinberg a montré que cette délétion était répartie de façon homogène au sein de notre population d'étude ( $p = 0,72$ ).

**Conclusion :** Eu égard à la prévalence non négligeable de la délétion -3.7 kb, soit 21%, et de sa répartition homogène au sein de notre population d'étude, il serait intéressant de rechercher la délétion 3.7 chez tous les enfants de façon systématique et de proposer un doppler trans-crânien (DTC), en priorité aux 80% des patients avec un génotype alpha normal.

**Mots clés :** drépanocytose, gènes modificateurs, alpha-thalassémie

## ABSTRACT

### PREVALENCE OF ALPHA-THALASSEMIA AMONG A SENEGALESE POPULATION WITH SICKLE CELL DISEASE

**Introduction:** Sickle cell disease is a monogenic disorder resulting from a mutation in the  $\beta$ -globin gene (HBB), characterized by a diverse clinical symptomatology different between individuals. Different genetic modulators have been identified or suspected for their direct or indirect influence on the clinical severity of the disease. Among these factors, alpha-thalassemia is associated with a higher frequency of pain crisis and acute chest syndrome, while partially protective against the onset of stroke. Few data on the alpha-thalassemia are available in Senegal, so this study aimed to determine its prevalence in a Senegalese population with sickle cell disease.

**Methods:** This is a prospective study concerning 300 children with sickle cell disease from 1 to 17 years old, regularly monitored at the Hôpital d'Enfants Albert Royer. A dedicated technical gap Multiplex-PCR was used to seek for most common alpha-thalassemia deletions, namely -3.7, MED, SEA, -20.5 and --4.2 kb. The homogeneity of distribution of alpha-thalassemia alleles has been verified using the Hardy-Weinberg's equilibrium (significance level at  $p < 0.05$ ).

**Results:** Of the 300 patients, the sex ratio M/F was 1.29. Only the -3, 7 kb deletion was found. Its prevalence was 21% with 19% for the heterozygous form and 2% for the homozygous one. The application of Hardy-Weinberg's equilibrium showed that this deletion was equally distributed through the population under study ( $p = 0,72$ ).

**Conclusion:** Taking into account the significant prevalence of -3.7 Kb deletion (21%), and its homogeneous distribution in our study population, it would be interesting to have a systematic screening for the -3.7 Kb deletion in all children and to propose a trans-cranial Doppler in priority for 80% of patients with a normal alpha genotype.

**Keywords:** Sickle cell disease, modifiers genes, alpha-thalassemia

1 Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique- Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie-Université Cheikh Anta Diop-Dakar (Sénégal).

2 Hôpital d'Enfants Albert Royer de Dakar (Sénégal)

3 Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Unité de Pathologie Moléculaire du Globule Rouge. Groupement Hospitalier Edouard Herriot. Université Claude Bernard Lyon1.

**Auteur correspondant :** Fatou Gueye Tall : email: fatougueye82@yahoo.fr, Téléphone : 775550334/ 00 33 6 64 72 58 40

## INTRODUCTION

La drépanocytose, maladie génétique la plus fréquente dans le monde, est surtout observée chez les sujets de race noire. Elle constitue ainsi un véritable problème de santé publique en Afrique où sa prévalence varie de 10 à 40% des porteurs de gènes, selon les régions. Au Sénégal, la prévalence est estimée entre 8 et 10% dans la population générale [1]. Au plan moléculaire, elle est due au remplacement d'un acide glutamique par une valine. Ce remplacement résulte d'une mutation ponctuelle transformant une seule base du codon GAG en GTG. L'hémoglobine qui en résulte est appelée HbS. Cette HbS, sous forme homozygote, est responsable du syndrome drépanocytaire majeur (SDM). Ce syndrome drépanocytaire majeur est également observé lorsque l'allèle  $\beta$ S coexiste avec un allèle  $\beta$ -thalassémique ou un allèle  $\beta$ x (X = HbC, Hb D-Punjab, Hb O-Arab ou Hb Lepore) ; cela a pour conséquence l'absence ou la réduction de la synthèse des chaînes  $\beta$ -globine normales. Dans ce cas on parle d'hétérozygotie composite. La forme homozygote et les hétérozygoties composites constituent les formes les plus graves de la maladie drépanocytaire.

Bien que la drépanocytose soit génétiquement caractérisée par une mutation ponctuelle unique, il existe divers gènes modulateurs qui peuvent influencer sur le phénotype de cette maladie. Parmi ces gènes, nous avons l'alpha-thalassémie qui serait associée à la survenue des crises douloureuses et du syndrome thoracique aigu, alors qu'elle protégerait contre la survenue d'accident vasculaire cérébral [2, 3]. Au plan clinique, la maladie peut se manifester à divers degrés de gravité clinique, d'un patient à un autre. En effet, certains patients vont développer peu de complications et peuvent atteindre l'âge de 60 à 70 ans, d'autres vont faire de nombreuses crises vaso-occlusives et de nombreux syndromes thoraciques aigus très précocement. Une troisième catégorie de patients présentera une vasculopathie cérébrale pouvant aller jusqu'à l'accident vasculaire cérébral, pendant l'enfance ou l'adolescence [2]. On distingue deux classes d'alpha-thalassémies : les alpha-thalassémies délétionnelles plus fréquentes [4,5] et les alpha-thalassémies non délétionnelles dues à des mutations dans le locus  $\alpha$  [6]. Dans la population noire, la délétion -3.7 kb ( $-\alpha$ 3.7) est plus fréquente [7, 8, 9] alors que la délétion -4.2 kb ( $-\alpha$ 4.2) est plus retrouvée en Asie [8]. La délétion d'un ou de plusieurs gènes conduit à une synthèse déséquilibrée des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ -globines. En conséquence, les chaînes  $\gamma$  et  $\beta$  forment alors des homotétramères solubles appelés Hb Bart's ( $\gamma$ 4) et Hb H ( $\beta$ 4). On distingue les  $\alpha$ thalassémies des  $\alpha$ 0 selon que, au niveau du locus  $\alpha$ , la thalassémie affecte l'expression de l'un ou des deux gènes. Les génotypes  $-\alpha/\alpha$ ,  $-\alpha/\alpha$  et  $--/\alpha$  entraînent des défauts de synthèse de

globine respectivement de 20%, 40% et 50% et se manifestent simplement par une microcytose et une hypochromie sans perturbation du taux d'HbA2. Le génotype  $-\alpha/--$  encore appelé hémoglobinose H se manifeste dès la vie fœtale et elle est responsable d'une anémie hémolytique chronique, hypochrome avec hyper réticulocytose. Le défaut  $--/--$ , incompatible avec la vie, conduit à une mort in utero dès le 5<sup>ème</sup> mois de gestation. Pour le cas particulier de la délétion -3.7 kb, il y a une disparition de la fin du gène  $\alpha$ 2 et du début du gène  $\alpha$ 1, créant un gène de fusion  $\alpha$ 2 $\alpha$ 1. Ainsi, au lieu de quatre gènes fonctionnels, il y en aura trois donnant l'alpha-thalassémie mineure. Au plan clinique, l'alpha-thalassémie protégerait contre les complications hémolytiques telles que les accidents vasculaires cérébraux, l'hypertension artérielle pulmonaire [3]. Par contre, elle favoriserait les complications vaso-occlusives telles que les crises douloureuses, le syndrome thoracique aigu [10]. La délétion -3.7 kb a été observée dans le monde entier, avec des fréquences plus élevées dans certaines populations africaines et méditerranéennes [11, 12,13]. C'est ainsi qu'une prévalence élevée a été retrouvée chez les patients drépanocytaires homozygotes en Inde (32%) [14], au Royaume-Uni, chez les afro-britanniques (34%) [15], en Guadeloupe (36%) [16], en Arabie Saoudite (40%) [17], aux Etats Unis, chez les afro-américains (41%) [18], en Oman (43%) [19], en France chez les africains (48%) [20], en Tanzanie (58%) [21], au Cameroun (37%) [22]. Par contre des prévalences de 20,8% et 17% ont été retrouvées respectivement en Guinée Conakry [23] et au Brésil [13,24].

Au Sénégal, très peu de données ont été rapportées sur l'alpha-thalassémie. C'est ainsi que cette étude visait à en déterminer la prévalence au sein de la population drépanocytaire sénégalaise.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES :

### - Population d'étude

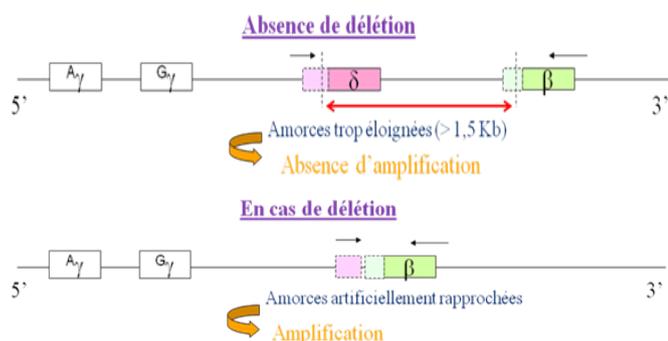
Il s'agit d'une étude prospective (janvier 2015 – décembre 2015). La population d'étude est constituée de 300 drépanocytaires homozygotes (SS et s $\beta$ -thalassémie), tous suivis à l'Hôpital d'Enfants Albert Royer de Dakar. Le consentement éclairé a été obtenu des parents /tuteurs avant l'inclusion. Les informations suivantes figuraient dans les dossiers des malades : profil phénotypique drépanocytaire (SS et S $\beta$ -thalassémie) et les paramètres anthropologiques (âge et sexe).

### - Techniques génétiques

L'ADN a été extrait à partir de sang total recueilli sur tube EDTA, à l'aide du kit QIAmp® DSP DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne). La PCR a été réalisée dans un thermocycleur TProfessional Basic (Biometra, Göttingen, Allemagne) et les produits PCR ont

été visualisés à l'aide de l'appareil Gel doc XR (Bio-rad, Paris, France).

La technique GAP PCR MULTIPLEX a été utilisée pour rechercher les délétions alpha-thalassémiques les plus communes, notamment, les délétions -3.7 kb, MED, SEA, -20.5, -4.2 kb [4]. La GAP PCR est une variante de la PCR classique, couramment utilisée pour la mise en évidence de délétions. Le principe consiste à utiliser des amorces assez éloignées l'une de l'autre encadrant juste les points de cassure. Si l'allèle est non délété, l'intervalle entre les deux amorces sera trop grand et l'amplification n'aura pas lieu. En revanche, si l'allèle est délété, les deux amorces seront artificiellement rapprochées et l'amplification aura lieu (Figure 1).

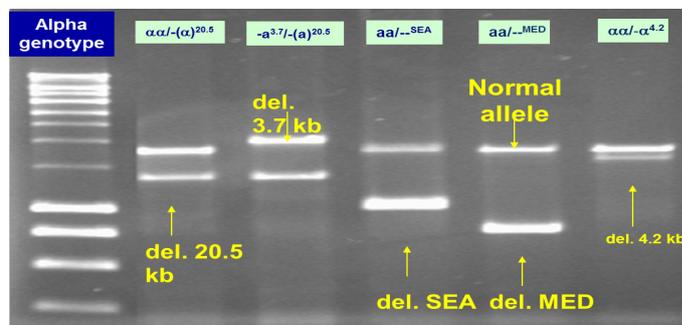


**Figure 1 :** Principe de la technique GAP PCR MULTIPLEX

### - Analyse statistique

La fréquence allélique globale de l'alpha-thalassémie a été calculée et sa répartition équilibrée dans la population (homozygotes sauvages, hétérozygotes, homozygotes mutés) a été vérifiée au moyen de l'équilibre de Hardy-Weinberg via un test de chi2 comparant, à partir de la fréquence allélique calculée, les répartitions observées et théoriques entre homozygotes sauvages, hétérozygotes et homozygotes mutés. L'équilibre de Hardy-Weinberg stipule que les fréquences alléliques et les fréquences génotypiques (c'est-à-dire la structure génétique de la population) reste stable de génération en génération. On dit alors que la population est à l'équilibre et il existe une relation simple entre les fréquences alléliques et les fréquences génotypiques :

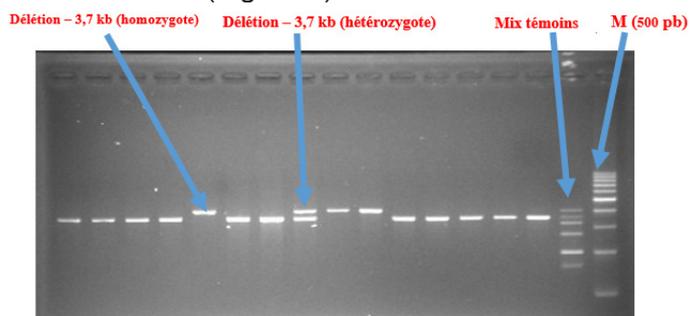
- - Soit p la fréquence allélique de l'allèle sauvage,
  - - Soit q la fréquence allélique de l'allèle muté (del -3.7 kb).
  - Si l'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté :
  - - Proportion théorique des homozygotes sauvages =  $p^2$
  - - Proportion théorique des homozygotes mutés =  $q^2$
  - - Proportion théorique des hétérozygotes =  $2pq$
- Ainsi  $p+q=1$  donc  $(p+q)(p+q)=1 \implies p^2 + 2pq + q^2 = 1$



**Figure 2 :** Gel de référence représentant les cinq délétions alpha-thalassémiques les plus communes

## RÉSULTATS

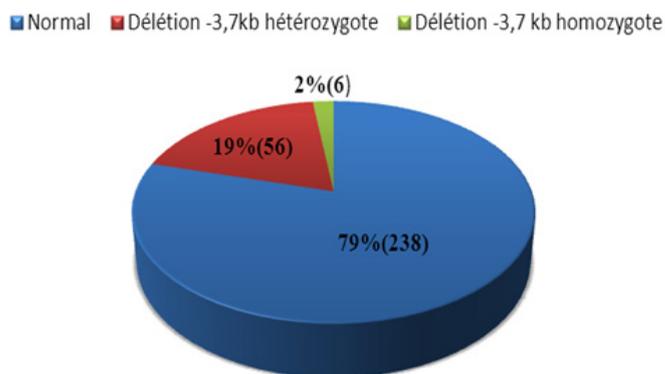
Au plan démographique, la répartition des patients en fonction de l'âge a montré que la tranche d'âge de 6 à 10 ans était la plus représentée avec un pourcentage de 51%. Quant à la répartition de la population en fonction du sexe, les patients de sexe masculin étaient plus nombreux ( $n=169$ ) avec un sex ratio H/F de 1,29. Pour le statut alpha-thalassémique, sur les cinq délétions recherchées à savoir -3.7, MED, SEA, -20.5 kb, -4.2 kb (Figure 2), seule la délétion - 3,7 kb a été retrouvée (Figure 3).



**Figure 3 :** Délétion -3,7 kb (2022 pb) retrouvée par technique GAP PCR MULTIPLEX

Soixante-deux (62) des 300 patients présentaient la délétion -3,7 kb, soit une prévalence de 21% dont 19% (56 patients) pour la forme hétérozygote et 2% (6 patients) pour la forme homozygote (Figure 4).

### Prévalence de la délétion -3,7 kb



**Figure 4 :** Prévalence de la délétion -3,7 kb au sein de notre population d'étude.

- Utilisation de l'équilibre de Hardy-Weinberg :

Soit  $p$  = fréquence de l'allèle sauvage

$q$  = fréquence de l'allèle muté

$p^2$  = fréquence des sauvages

$q^2$  = fréquence des homozygotes

$2pq$  = fréquence des hétérozygotes

Nous avons une population de 300 patients: 238 sauvages, 56 hétérozygotes et 6 homozygotes

Chaque sujet = 2 allèles => 600 allèles au total

•  $p = ((2 \times 238) + 56) / 600 = 0.89$  (nombre de fois où l'allèle sauvage apparaît/ nombre total d'allèles)

•  $q = ((2 \times 6) + 56) / 600 = 0.11$  (nombre de fois où l'allèle muté apparaît/nombre total d'allèles).

-->Fréquence des génotypes:

• Sauvages  $p^2 = 0,792$

• Hétérozygotes  $2pq = 0,196$

• Homozygotes  $q^2 = 0,012$

-->Effectifs attendus:

• Sauvages:  $0.792 \times 300 = 237,6$  soit 238 patients

• Hétérozygotes:  $0,196 \times 300 = 58,8$  soit 59 patients

• Homozygotes  $0,012 \times 300 = 3,6$  soit 3 patients.

Ainsi l'équilibre de Hardy-Weinberg nous a permis d'avoir les effectifs théoriques. Et le test de  $\chi^2$ , est utilisé pour comparer ces effectifs théoriques à ceux observés dans notre population pour chaque génotype (Tableau I).

**Tableau I** : Amorces utilisées pour l'étude des cinq délétions alpha-thalassémiques à l'aide de la GAP PCR MULTIPLEX [11].

Séquences d'amorces (5'----->3'sequence)	GenBank ID : Nu- cleotides	Tailles des frag- ments (pb)	Génotypes
$\alpha 2/3.7$ -F CCCCTCGCCAAGTCCACCC	HUMHBA4 : 5676 -----> 5694	2022/2029 pb (délétion - 3,7)	$\alpha$ + -thalassémie: - $\alpha 3.7$
3.7/20.5- R AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	HUMHBA4 : 11514 -----> 1494	1800 pb (ampli- mère $\alpha 2\alpha 2$ )	Gène sauvage (Normal)
$\alpha 2$ -R AGACCAGGAAGGGCCGGTG	HUMHBA4 : 7475-----> 7457		
4.2-R CCCGTTGGATCTTCTCATTTC	HUMHBA4 : 8942 -----> 8920	1628 pb	$\alpha$ + -thalassémie: - $\alpha 4.2$
4.2-F GGTTCACCATGTGGTGCCTC	HUMHBA4 : 3064 -----> 3084		
-( $\alpha$ ) 20.5-F GCCCAACATTCCGGAGTACATG	HSGG1 : 17904 ----->17924	1175 pb	$\alpha$ o -thalassémie: -( $\alpha$ ) 20.5
-( $\alpha$ ) 20.5 -R AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	HUMHBA4 : 11514 ----->11494		
MED-F TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	HSGG1 : 23123 ----->23144	875 pb	$\alpha$ + -thalassémie: --MED
MED-R TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	HSGG1 : 41203 ----->41183		
SEA-F CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	HSGG1 : 26120 ----->26140	1349 pb	$\alpha$ + -thalassémie: --SEA
SEA-R AGCCCACGTTGTGTTTCATGGC	HSGG1 : 3817----->3797		

La délétion -3,7 kb était répartie de façon homogène au sein de notre population d'étude. En effet, le test du  $\chi^2$  n'a pas retrouvé de différence statistiquement significative entre les effectifs observés et les effectifs théoriques selon les fréquences alléliques calculées ( $p = 0,72$ ) (Tableau II).

**Tableau II** : Répartition homogène de la délétion -3,7 kb au sein de notre population d'étude

	Sauvages	Hétérozygotes	Homozygotes	p
Effectifs observés	238	56	6	0,72
Effectifs théoriques selon les fréquences alléliques calculées	238	59	3	

## DISCUSSION

La délétion -3.7 kb a été observée dans le monde entier, avec des fréquences plus élevées dans certaines populations africaines et méditerranéennes. [11,12]. Dans notre étude, nous avons retrouvé une prévalence de 21% pour cette délétion avec 19% pour la forme hétérozygote et 2 % pour la forme homozygote. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres pays notamment en Guinée Conakry (20,8%) [23] et au Brésil (17%) [13, 24]. Concernant la Guinée, les résultats, superposables à ceux du Sénégal, pourraient s'expliquer par la proximité, les mouvements migratoires, le brassage et le métissage des deux peuples très voisins à tous points de vue. Quant au Brésil, la prévalence est superposable à la nôtre, mais elle reste néanmoins moins élevée (17%). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans ce pays, le métissage ethnique est plus prononcé, mais l'influence africaine y est moindre, comparée à d'autres pays touchés par l'esclavage. En effet, il y a eu, au Brésil, moins d'esclaves d'origine africaine en raison de l'absence de ports adéquats [28]. Dans ce pays, la corrélation entre l'alpha-thalassémie et le groupe ethnique a effectivement été rapportée. C'est ainsi que Wagner et al. [27] ont évalué la prévalence dans divers groupes ethniques en divisant la population d'étude en descendants africains et européens. Ils ont alors observé une prévalence plus grande dans le premier groupe (23,1%) que dans le second (4,5%), corroborant ainsi la forte corrélation entre l'alpha-thalassémie et le groupe ethnique. Par ailleurs, les résultats d'une étude américaine ont rapporté une prévalence de 17% chez une population pédiatrique drépanocytaire afro-américaine, prévalence comparable à la nôtre (21%). Cette prévalence monte à 49% dans une population constituée de drépanocytaires âgés de plus de 20 ans. Ceci serait dû au fait que l'effet de l'alpha-thalassémie, sur la clinique chez l'enfant drépanocytaire, est inhibé par l'hémoglobine F qui est un facteur protecteur. Ainsi l'influence de l'alpha-thalassémie sur la clinique serait plus visible après le switch  $\beta\gamma$ . Ces résultats, montrent encore une fois qu'il est nécessaire de considérer l'anémie drépanocytaire, non seulement comme un défaut

d'un seul gène, mais comme une maladie dont l'expression clinique est le résultat d'un groupe de gènes capables d'interagir au niveau phénotypique [29].

Des prévalences nettement plus élevées que les nôtres, ont par contre été signalées chez d'autres populations de drépanocytaires homozygotes : en Inde (32%) [14], au Royaume-Uni, chez les afro-britanniques (34%) [15], en Guadeloupe (36%) [16], en Arabie Saoudite (40%) [17], aux Etats Unis, chez les afro-américains (41%) [18], en Oman (43%) [19], en France chez les africains (48%) [20], en Tanzanie (58%) [21]. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que ces études ont été réalisées sur des populations adultes, ce qui nous ramène au contexte du switch  $\beta\gamma$  déjà évoqué.

Nos résultats sur l'alpha-thalassémie suggèrent que d'autres axes méritent d'être explorés, notamment la corrélation entre l'alpha-thalassémie et certains paramètres biologiques. En effet, des études sur des patients drépanocytaires homozygotes SS ont montré que l'alpha-thalassémie serait associée à une augmentation du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite, ainsi qu'à un taux de réticulocytes et une bilirubinémie plus faibles. Ces résultats suggéreraient que l'alpha-thalassémie diminue le degré d'anémie en réduisant le degré d'hémolyse [30, 31, 32, 33].

Toutefois, il faut souligner que la modulation génétique du taux d'hémoglobine F, des haplotypes du locus  $\beta$ -globine et l'alpha-thalassémie n'ont pas de valeur pronostique individuelle. Des études ont effectivement montré que des patients drépanocytaires, présentant un taux élevé d'HbF ou une alpha-thalassémie, sont capables de développer une forme sévère de la maladie [34]. Ces trois facteurs n'expliquent donc qu'une partie de la variabilité clinique, ce qui soulève l'hypothèse d'autres gènes modificateurs.

## CONCLUSION

Eu égard d'une part à la prévalence non négligeable de l'alpha-thalassémie (21%) et de sa répartition homogène au sein de notre population d'étude, et d'autre part à son implication dans la symptomatologie clinique de la maladie, il serait important de pouvoir réaliser cette recherche en routine. Cela permettrait non seulement de prévenir les complications hémolytiques (AVC) pour les enfants ne présentant pas la délétion alpha-thalassémique -3.7 kb (80%) par la mise en œuvre du Doppler Trans-Cranien, mais également une meilleure prise en charge des complications vaso-occlusives chez les enfants ayant cette délétion.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS, « Rapport du secrétariat-Prévalence de la drépanocytose », 24 avr. 2006, disponibles sur le site. [apps.who.int/gb/ebwha/pdf\_files/WHA59/A59\_9-fr.pdf].
2. Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *American Journal of Hematology* 2012 ; 87: 795–803.
3. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 2011; 117: 6681–6684.
4. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletion determinants of alpha-thalassemia. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):360-362.
5. Higgs DR, Pressley L, Olde JM, Hunt DM, Clegg JB, Weatherall DJ, and Serjeant GR. Negro alpha-thalassemia is caused by deletion of single alpha-globin gene. *Lancet* 1979; 2(8137): 272-276.
6. Higgs DR, Pressley L, Aldridge B, Clegg JB, Weatherall DJ, Cao A, Hadjiminias MG, Kattamis C, Metaxatou-Mavromati A, Rachmilewitz EA, and Sophocleous T. Genetic and molecular diversity in non deletion Hb H disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(9): 5833-5837.
7. Orkin SH, Old J, Lazarus H, Altay C, Gurgey A, Weatherall DJ. and Nathan DJ The molecular basis of alpha-thalassemia: frequent occurrence of dysfunctional alpha loci among non-Asians with Hb H disease. *Cell* 1979; 17(1): 33-42.
8. Embury SH, Miller A, Dozy AM, Kan YW, Chan V and Todd D. Two different molecular organizations account for the single alpha-globin gene of the thalassemia-2 genotype. *J Clin Invest* 1980; 66(6): 1319-1325.
9. Keclard L, Romana M, Lavocat E, Saint-Martin C, Berchel C and Merault G. Sickle cell disorder, beta-globin gene cluster haplotypes and alpha-thalassemia in neonates and adults from Guadeloupe. *Am J Hematol* 1997; 55(1): 24-27.
10. Darbari DS, Onyekwere O, Nouraie M, Minniti CP, Luchtman-Jones L, et al. Markers of severe vasoocclusive painful episode frequency in children and adolescents with sickle cell anemia. *Journal of Pediatrics* 2012; 160: 268–290.
11. Samuel S, Corinne D, Douglas R and Garry R. Single-tube multiplex –PCR screen for common deletion determinants of  $\alpha$ -thalassemia. *Blood* 2000; 95:360-362.
12. Higgs DR and Weatherall DJ. The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:1154-1162.
13. Belisa'rio AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB. Coinheritance of a  $\alpha$ -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin* 2010; 34: 516–529.
14. Pandey S, Pandey S, Mishra RM, Sharma M, Saxena R. Genotypic influence of  $\alpha$ -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. *Korean Journal of Hematology* 2011; 46: 192–195.
15. Day TG, Drasar ER, Fulford T, Sharpe CC, Thein SL. Association between hemolysis and albuminuria in adults with sickle cell anemia. *Haematologica* 2012; 97: 201–205.
16. Tarer V, Etienne-Julan M, Diara JP, Belloy MS, Mukizi-Mukaza M, et al. Sickle cell anemia in Guadeloupean: pattern and prevalence of acute clinical events. *European Journal of Hematology* 2006; 76: 193–199.
17. Alsultan A, Aleem A, Ghabbour H, AlGahtani FH, Al-Sheri A, et al. Sickle cell disease subphenotypes in patients from South Western province of Saudi-Arabia. *Journal of Pediatric Hematology Oncology* 2012; 34: 79–84.
18. Guasch A, Zayas CF, Eckman JR, Muralidhoron K, Zhang W, et al. Evidence that microdeletions in the alpha globin gene protect against the development of sickle cell glomerulopathy in humans. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999; 10: 1014–1019.
19. Wali YA, Al-Lamki Z, Hussein SS, Bererhi H, Kumar D, et al. Splenic function in Omani children with sickle cell disease: correlation with severity index, hemoglobin phenotype, iron status, and alpha-thalassemia trait. *Pediatric Hematology Oncology* 2002; 19: 491–500.
20. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Cioc L, et al. G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood* 2008; 112: 4314–4317.
21. Cox SE, Makani J, Newton CR, Prentice AM, Kirkham FJ. Hematological and genetic predictors of

- daytime hemoglobin saturation in Tanzanian with and without sickle cell anemia. International Scholarly Research Network Hematology 2013; 1–6.
22. Rumaney MB, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramessar R, Kengne AP, et al. The Co-Inheritance of Alpha-Thalassemia and Sickle Cell Anemia is associated with Better Hematological Indices and Lower Consultations Rate in Cameroonian Patients and Could Improve Their Survival. PLoS ONE 2014; 9(6): e100516. doi:10.1371/journal.pone.0100516.
23. Millimono TS, Loua KM, Rath SL, Relvas L, Bento C, et al. High prevalence of hemoglobin disorders and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Guinea (West Africa). Hemoglobin 2012; 50:118–125.
24. Nagel R. L., Erlingsson S., Fabry M.E., Croizat H., Susuka S. M., Lachman H. et al. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-American sickle cell anemia patients. Blood 1991; 77 (6): 1371-1375.
25. Kinney T. R., Helms R. W., O'Branski E. E., Ohene-Frempong K., Wang W. and al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. Pediatric Hydroxyurea Group. Blood 1999; 94(5): 1550-1554.
26. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassemia. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010; 5: 13.
27. Wagner SC, Castro SM Castro SM, Gonzalez TP, Santin AP, Filippon L, Zaleski CF, Azevedo LA, Amorin B, Callegari-Jacques SM and Hutz M. Prevalence of common  $\alpha$ -thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. Genet Mol Biol 2010; 33:641-645
28. Cascudo LC (1984) História do Rio Grande do Norte. 2 edition. Fundação José Augusto, Natal, 524 pp.
29. Fabry ME, Mears JG, Patel P, Schaefer-Rego K, Carmichael LD, et al. Dense cells in sickle cell anemia: the effects of gene interaction. Blood 1984; 64: 1042–1046.
30. Embury SH, Dozy AM, Miller J, Davis JR, Kleman KM and al. Concurrent sickle cell-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. N Engl Med 1982; 306(5): 270-274.
31. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ and al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. N Engl J Med 1982; 306(24): 1441-1446.
32. Steinberg MH and Embury SH Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. Blood 1986; 68(5): 985-990.
33. Adams RJ, Kutlar A., McKie V, Carl E., Nichols FT, Liu JC and al. Alpha-thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. Am J Hematol 45 (4):279-282.
34. Inati A, Taher A, Bou Alawi W, Koussa S, Kaspar H and al. Beta-globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. Eur J Haematol 70(2): 79-83.