

LA MISE EN ÉVIDENCE DE LA MUTATION P533R
ET ÉTUDE DU POLYMORPHISME DE L'INTRON 2 DU
GÈNE DE L'IDURONIDASE.

THESE

Présentée et soutenue publiquement le:.....

PAR

Mme. AGNAOU Rajae

Né le 15 Février 1989 à Rabat

pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : MPS I, Hurler, polymorphisme de taille, P533R, RFLP, ARMS.

MEMBRES DE JURY

Mr. M. KHATTAB
Professeur de Pédiatrie.

PRESIDENT

Mr. L. CHABRAOUI
Professeur de Biochimie.

RAPPORTEUR

Mme. Y. KRIOUILE
Professeur de Pédiatrie.

Mme. S. BOUHSAIN
Professeur de Biochimie.

JUGES

Mme. N. ALAMI OUAHABI
Professeur de Biochimie.

17 JUIN 2013



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ – HASSOUNI

2

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Jamal TAOUFIK
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
Pr. BENSOUDA Mohamed Anatomie
Pr. BENOSMAN Abdellatif Chirurgie Thoracique
Pr. LAHBABI Naïma Physiologie

Novembre 1983

Pr. BELLAKHDAR Fouad Neurochirurgie
Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI Rhumatologie

Décembre 1984

Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil Radiothérapie
Pr. MAAOUNI Abdelaziz Médecine Interne

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Anesthésie -Réanimation
Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima
Pr. BENSALIM Younes
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
Pr. IRAQI Ghali

Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie
Pneumo-ptisiologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali
Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. EL YAACOUBI Moradh
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAOUY Mohamed

Radiologie
Gastro-Entérologie
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida
Pr. HERMAS Mohamed
Pr. TOLOUNE Farida*

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Traumatologie Orthopédie
Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*
Pr. CHAD Bouziane
Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda
Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine Interne
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Neurologie
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENABDELLAH Chahrazad
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Hématologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie

Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Pharmacologie
Histologie Embryologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Pharmacologie
Chimie thérapeutique

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DAOUDI Rajae
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

Pr. AGNAOU Lahcen
Pr. BENCHERIFA Fatiha
Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. EL IDRISSE Lamghari Abdennaceur
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim

Ophtalmologie
Ophtalmologie
Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie
Gynécologie – Obstétrique

Pr. SENOUCI Karima

Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Urologie
Chirurgie – Pédiatrie
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. BEDDOUCHE Amqrane*
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. FERHATI Driss
Pr. HASSOUNI Fadil
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. IBRAHIMY Wafaa
Pr. MANSOURI Aziz
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Gynécologie Obstétrique
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Cardiologie
Urologie
Ophtalmologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOVAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie

Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
Pr. MOHAMMADI Mohamed
Pr. MOULINE Soumaya
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumo-phtisiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN AMAR Abdesselem
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAOUIR Souad*
Pr. DERRAZ Said
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Noureddine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. NAZI M'barek*
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Chirurgie Générale
Urologie
Neurologie
Radiologie
Neurochirurgie
Pédiatrie
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Cardiologie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*
Pr. LABRAIMI Ahmed*

Gastro-Entérologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENCHERIF My Zahid
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie

Pr. CHAOUI Zineb
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. EL OTMANY Azzedine
Pr. HAMMANI Lahcen
Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-ptisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AIT OURHROUI Mohamed
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. BENCHEKROUN Nabih
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL IDGHIRI Hassan
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. HSSAIDA Rachid*
Pr. LAHLOU Abdou
Pr. MAFTAH Mohamed*
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. NASSIH Mohamed*
Pr. ROUIMI Abdelhadi

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

Décembre 2001

Pr. ABABOU Adil
Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BELMEKKI Mohammed
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami

Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Ophtalmologie
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-ptisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie

Pr. BENYOUSSEF Khalil
 Pr. BERRADA Rachid
 Pr. BEZZA Ahmed*
 Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
 Pr. BOUHOUCHE Rachida
 Pr. BOUMDIN El Hassane*
 Pr. CHAT Latifa
 Pr. CHELLAOUI Mounia
 Pr. DAALI Mustapha*
 Pr. DRISSI Sidi Mourad*
 Pr. EL HIJRI Ahmed
 Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
 Pr. EL MADHI Tarik
 Pr. EL MOUSSAIF Hamid
 Pr. EL OUNANI Mohamed
 Pr. ETTAIR Said
 Pr. GAZZAZ Miloudi*
 Pr. GOURINDA Hassan
 Pr. HRORA Abdelmalek
 Pr. KABBAJ Saad
 Pr. KABIRI EL Hassane*
 Pr. LAMRANI Moulay Omar
 Pr. LEKEHAL Brahim
 Pr. MAHASSIN Fattouma*
 Pr. MEDARHRI Jalil
 Pr. MIKDAME Mohammed*
 Pr. MOHSINE Raouf
 Pr. NOUINI Yassine
 Pr. SABBAH Farid
 Pr. SEFIANI Yasser
 Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Rhumatologie
 Anatomie
 Cardiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 Pr. AMEUR Ahmed *
 Pr. AMRI Rachida
 Pr. AOURARH Aziz*
 Pr. BAMOU Youssef *
 Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 Pr. BENZEKRI Laila
 Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
 Pr. BERNOUSSI Zakiya
 Pr. BICHTA Mohamed Zakariya
 Pr. CHOHO Abdelkrim *
 Pr. CHKIRATE Bouchra

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie

Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
Pr. EL BARNOUSSI Leila
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. EL MANSARI Omar*
Pr. ES-SADEL Abdelhamid
Pr. FILALI ADIB Abdelhai
Pr. HADDOUR Leila
Pr. HAJJI Zakia
Pr. IKEN Ali
Pr. ISMAEL Farid
Pr. JAAFAR Abdeloihab*
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. LAGHMARI Mina
Pr. MABROUK Hfid*
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
Pr. NATLHO Abdelhamid*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RACHID Khalid *
Pr. RAISS Mohamed
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOU Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Chirurgie Pédiatrique
Gynécologie Obstétrique
Dermatologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Ophtalmologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Médecine Interne
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KARMANE Abdelouahed
Pr. KHABOUZE Samira
Pr. KHARMAZ Mohamed

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Traumatologie Orthopédie

Pr. LEZREK Mohammed*
Pr. MOUGHIL Said
Pr. SASSENOU ISMAIL*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Urologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENHALIMA Hanane
Pr. BENHARBIT Mohamed
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAOUI Sakina
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. KARIM Abdelouahed
Pr. KENDOOUSSI Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam
Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Ophtalmologie
Cardiologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie
Pédiatrie
Radiologie
Ophtalmologie
Cardiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique

Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. ESSAMRI Wafaa
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. GHADOUANE Mohammed*
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AMMAR Haddou
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZIANE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
Pr. ELABSI Mohamed
Pr. EL BEKKALI Youssef*
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GANA Rachid

Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Gastro-entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
ORL
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Neuro chirurgie

Pr. GHARIB Nouredine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
 Pr. MOUTAJ Redouane *
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIGUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo ptisiologie
 Hématologique
 Anesthésier réanimation
 Parasitologie
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

PROFESSEURS AGREGES :

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. AGDR Aomar*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMAHZOUNE Brahim*
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. AZENDOUR Hicham*
 Pr. BELYAMANI Lahcen*

Médecine interne
 Pédiatre
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Rhumatologie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation

Pr. BJIJOU Younes
Pr. BOUHSAIN Sanae*
Pr. BOUI Mohammed*
Pr. BOUNAIM Ahmed*
Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
Pr. CHAKOUR Mohammed *
Pr. CHTATA Hassan Toufik*
Pr. DOGHMI Kamal*
Pr. EL MALKI Hadj Omar
Pr. EL OUENNASS Mostapha*
Pr. ENNIBI Khalid*
Pr. FATHI Khalid
Pr. HASSIKOU Hasna *
Pr. KABBAJ Nawal
Pr. KABIRI Meryem
Pr. KADI Said *
Pr. KARBOUBI Lamya
Pr. L'KASSIMI Hachemi*
Pr. LAMSAOURI Jamal*
Pr. MARMADE Lahcen
Pr. MESKINI Toufik
Pr. MESSAOUDI Nezha *
Pr. MSSROURI Rahal
Pr. NASSAR Ittimade
Pr. OUKERRAJ Latifa
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
Pr. ZOUHAIR Said*

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. CHADLI Mariama*
Pr. CHEMSI Mohamed*
Pr. CHERRADI Ghizlan
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat

Anatomie
Biochimie-chimie
Dermatologie
Chirurgie Générale
Traumatologie orthopédique
Hématologie biologique
Chirurgie vasculaire périphérique
Hématologie clinique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Médecine interne
Gynécologie obstétrique
Rhumatologie
Gastro-entérologie
Pédiatrie
Traumatologie orthopédique
Pédiatrie
Microbiologie
Chimie Thérapeutique
Chirurgie Cardio-vasculaire
Pédiatrie
Hématologie biologique
Chirurgie Générale
Radiologie
Cardiologie
Pneumo-ptisiologie
Microbiologie

Anesthésie réanimation
Médecine interne
Physiologie
ORL
Microbiologie
Médecine aéronautique
Cardiologie
Biochimie chimie
Radiologie
Chirurgie pédiatrique
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie plastique et réparatrice
Urologie
Gastro entérologie
Anatomie pathologique

Pr. LEZREK Mounir
Pr. MALIH Mohamed*
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. RAISSOUNI Zakaria*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Ophtalmologie
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie générale
Hématologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. Abdelouahed AMRANI
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. Ahmed JAHID
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Drissi*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. Mouna EL ALAOUI MHAMDI
Pr. Mounir ER-RAJI
Pr. RAISSOUNI Maha*

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Chirurgie Pédiatrique
Cardiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

Pr. ABOUDRAR Saadia
Pr. ALAMI OUHABI Naima
Pr. ALAOUI KATIM
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
Pr. ANSAR M'hammed
Pr. BOUHOUCHE Ahmed
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
Pr. BOURJOUANE Mohamed
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia
Pr. DAKKA Taoufiq
Pr. DRAOUI Mustapha
Pr. EL GUESSABI Lahcen
Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbès
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohame
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss

Physiologie
Biochimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Génétique Humaine
Applications Pharmaceutiques
Microbiologie
Biochimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biotechnologie
Biologie
Chimie Organique
Biochimie
Pharmacognosie

Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Pharmacologie
Chimie Organique

**Enseignants Militaires*

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

(البقرة من الآية 32)

Dédicaces



A Mes très chers parents :

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous vos efforts et sacrifices. Vous avez toujours été présents et généreux et c'est à travers vos prières et vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez placés en moi. Ce modeste travail est aussi le votre. Puisse dieu tout puissant vous restituer un minimum de ce que je vous dois.

A mon cher frère Yassine et ma chère sœur Amal :

J'espère avoir été à la hauteur de votre estime, que ce travail soit le témoignage mes sentiments les plus chers. Je vous exprime mon grand amour et mes vœux de bonheur et de réussite.

A mon cher mari Noureddine :

Pour ton soutien moral et tes encouragements qui m'ont poussé vers l'avant, j'espère avoir été à la hauteur de tes espérances.

A Tous les membres de la famille AGNAOU :

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de longue vie.

A Tous les membres de la famille EL JASTMI:

Je vous dédie ce travail avec l'expression de mon profond dévouement et tout mon attachement.

A Tous les membres de la famille ZEDDOU :

Je vous dédie ce travail en vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

*A mes très chères amies : Chaimae, Rahima, Nisserine,
Hayat, Zakiya, Rabab, Ghyzlane...*

J'aurais toujours à l'esprit le souvenir des agréables années d'études, des inoubliables moments vécus ensemble. Puisse Dieu vous protéger.

A Tous Mes maîtres et Professeurs.

*A tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail,
en particulier au personnel du laboratoire de Chimie
Biochimie Biologie Biologie moléculaire et ceux du plateau
technique de recherche.*

*A tous ceux connus ou inconnus qui vont feuilleter un jour
ce travail.*

Remerciements



*A notre maître et président de thèse
Monsieur KHATTAB Mohammed*

Professeur de Pédiatrie

En présidant ce jury, vous nous faites un grand honneur.

*Votre compétence, votre rigueur et vos qualités humaines
sont exemplaires.*

*Veillez trouver, cher maître, dans ce modeste travail,
l'expression de notre très haute considération et notre
profonde gratitude.*

*A notre maître et rapporteur de thèse
Monsieur CHABRAOUI Layachi*

Professeur de Biochimie

Cher maître, préparer ce travail sous votre direction a été pour nous un grand honneur et un véritable privilège. Les qualités tant humaines que professionnelles qui sont les vôtres ne sont plus à présenter, elles font depuis des années votre réputation.

Nous espérons à travers notre travail être à la hauteur de votre confiance et de vos attentes, veuillez y trouver l'expression de notre plus sincère reconnaissance.

*A notre maître et juge de thèse
Madame KRIOUILLE Yamna*

Professeur de pédiatrie.

C'est un réel plaisir et un honneur pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury de thèse.

En dépit de vos nombreuses occupations vous avez accepté de venir juger ce travail.

Veillez trouver, chère maître, l'expression de notre très haute considération et notre profonde gratitude.

*A notre maître et juge de thèse
Madame BOUHSAIN Sanae*

Professeur de Biochimie.

Nous vous remercions sincèrement de l'honneur que vous nous faites en siégeant dans notre jury.

Votre sérieux, vos compétences et vos qualités humaines et intellectuelles n'ont cessé de susciter ma grande admiration.

Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre gratitude et notre profond respect.

*A notre maître et juge de thèse
Madame ALAMI OUAHABI Naïma*

Professeur de Biochimie.

*Nous sommes infiniment sensible à l'honneur que vous faites
en acceptant de juger notre thèse.*

*Votre rigueur et dévouement sont pour nous source
d'admiration et de profond respect.*

*Veillez trouver, chère maître, l'expression de notre
reconnaissance et notre profonde estime.*

LISTE DES ABREVIATIONS :

IDUA	:	Gène de l'iduronidase.
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
MPS I	:	Mucopolysaccharidose de type I MPS I
DS	:	Dermane-sulfate
HS	:	Héparane-sulfate
ARMS	:	Amplification-refractory mutation system.
PCR	:	Polymerase chain reaction
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
VNTR	:	Variable number of tandem repeats
BET	:	Bromure d'éthidium
TBE	:	Tampon Tris, Borate, EDTA
UV	:	Ultraviolet
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Répartition des étudiants selon le sexe.

Figure 2 : Répartition des étudiants selon l'origine géographique.

Figure 3 : Principe schématique de la PCR .

Figure 4 : Photo d'une migration électrophorétique des produits d'amplification du VNTR de l'intron 2 sur gel d'agarose à 2%.

Figure 5: Principe de la Technique RFLP

Figure 6 : Profils électrophorétiques de quelques échantillons étudiés.

Figure 7 : Répartition des différents haplotypes de l'intron 2 du gène IDUA « chez la population marocaine ».

Figure 8 : Répartition des différents allèles de l'intron 2 du gène IDUA « chez la population marocaine »

Figure 9 : Profil électrophorétique d'un échantillon normal et d'un échantillon muté après digestion enzymatique.

Figure 10 : Profil électrophorétique d'un échantillon normal et d'un échantillon muté après amplification par amorces spécifiques.

Figure 11 : Résultat du séquençage d'un patient Hurler homozygote pour la mutation P533R

Figure 12 : Résultat du séquençage du patient Hurler hétérozygote pour la mutation P533R

Figure 13 : Localisation du gène IDUA

Figure 14 : Morphotype d'une enfant atteinte de la maladie de Hurler

Figure 15 : Anomalies lymphocytaires observé sur un frottis sanguin.

Figure 16 : profil électrophorétique de mucopolysaccharides sur plaque d'acétate de cellulose.

Figure 17 : schémas résumant les étapes nécessaires à l'isolement des GaG's à partir des urines.

Figure 18 : Localisation de la mutation P533R

LISTE DES TABLEAUX:

Tableau I : Résultats de l'étude des génotypes du polymorphisme de taille

Tableau II : Résultats de l'étude de la fréquence des allèles du polymorphisme de taille

Tableau III : Maladies de surcharge lysosomale et anomalies cytologiques

Tableau IV : valeur usuelles du dosage des GAG's urinaires par la méthode du DMB en fonction de l'âge.

Tableau V : valeur usuelles de l'activité enzymatique des enzymes lysosomales

TABLE DES MATIERES :

I.	INTRODUCTION	2
II.	MATERIELS ET METHODES.....	3
1.	La population d'étude	4
2.	Méthodes	6
2.1.	Etude du polymorphisme de taille.....	7
2.1.1.	Amplification de l'ADN cible.....	7
2.1.2.	Electrophorèse sur Gel d'Agarose.....	11
2.2.	Technique de recherche de la mutation P533R par RFLP.....	13
2.2.1.	Amplification de l'ADN cible.....	13
2.2.2.	Digestion enzymatique.....	14
2.2.3.	Electrophorèse sur Gel d'Agarose	17
2.3.	Technique de recherche de la mutation P533R par ARMS.....	18
2.3.1.	Principe de la technique ARMS	18
2.3.2.	Amplification de l'ADN cible.....	18
2.3.3.	Electrophorèse sur Gel d'Agarose.....	19
III.	RESULTATS	
1.	Etude du polymorphisme de taille de l'intron 2.....	21
2.	Recherche de la mutation P533R par RFLP	25
3.	Recherche de la mutation P533R par ARMS	26
4.	Résultats du séquençage de l'exon 11 des 4 patients Hurler.....	27
IV.	DISCUSSION	
A.	Aspect analytique.....	30

B. Apport du travail au niveau marocain.....	32
1. Intérêt de l'étude du polymorphisme de taille de l'intron.....	32
1.1. Les répétitions en tandem.	32
1.2. Interprétation des résultats obtenus.....	34
2. Intérêt de la recherche de la mutation P533R	35
2.1. Sur le plan clinique	36
2.2. Sur le plan biologique.....	40
2.2.1. Examens biologiques d'orientation	40
2.2.2. Examens biologiques de confirmation	42
2.3. Sur le plan moléculaire.....	48
2.3.1. Apport de l'étude moléculaire (génétique) à la MPS I.....	48
2.3.2. Interprétation des résultats obtenus pour la mise au point de la technique de recherche de la mutation P533R	49
2.4. Sur le plan thérapeutique.....	51
2.4.1. Traitement symptomatique	51
2.4.2. Le traitement spécifique	53
3. Limite du travail	56
V. CONCLUSION.....	58
RESUMES.....	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65

Introduction :

L' α -L-iduronidase est une enzyme lysosomale qui intervient dans le catabolisme des glycosaminoglycanes. Son déficit est responsable de la mucopolysaccharidose de type I (MPS I), une maladie héréditaire du métabolisme qui se transmet selon le mode autosomique récessif. Il y a trois types d'expression clinique. La maladie d'Hurler est le phénotype sévère, la maladie de Scheie est la forme modérée et une forme intermédiaire appelée syndrome de Hurler-Scheie. Le déficit en α -L-Iduronidase est responsable de l'accumulation lysosomique progressive du dermatane-sulfate (DS) et de l'héparane-sulfate (HS) [1]. Ces glycosaminoglycanes sont éliminés dans les urines où leur étude permet d'orienter le diagnostic de la maladie. Celui-ci est confirmé par la mise en évidence de la diminution de l'activité enzymatique dans les leucocytes.

L' α -L-Iduronidase est codée par le gène de l'iduronidase (IDUA) situé sur le bras court du chromosome 4 (4p16.3) [2]. Plus de 100 mutations du gène IDUA ont été identifiées, mais l'étude de ce gène chez les patients Marocains atteints de mucopolysaccharidose de type I (MPS I) a montré que la mutation P533R est présente chez la majorité d'entre eux [3]. Il s'agit d'une mutation ponctuelle (CCG =>CGG) qui conduit à la substitution d'un acide aminé neutre (la proline) par un acide aminé basique (l'arginine) en position 533 de la protéine IDUA.

Le but de notre travail est de contribuer à l'étude du gène IDUA en mettant au point une méthode simple de recherche de la mutation P533R et en étudiant le polymorphisme de taille (VNTR) décrit par Scott au niveau de l'intron 2 du gène IDUA [4].

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de biochimie et du plateau technique de recherche de la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, durant une période de 9 mois.

Matériels et Méthodes :

1. La population d'étude :

Elle comporte 75 étudiants de la section pharmacie de la faculté de médecine et de pharmacie Rabat ainsi que 4 patients atteints de la maladie d'Hurler.

Le consentement a été obtenu de la famille de chaque patient et une fiche de consentement éclairée a été remplie par chaque étudiant (Annexe). Elle renferme des renseignements tels que : le nom, le lieu de naissance, la région d'origine...

➤ Critères d'inclusion à l'étude :

- L'étudiant doit être inscrit à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat au sein de la section pharmacie.
- Le patient doit être confirmé portant la mutation P533R.

➤ Caractéristiques de la population d'étude :

- Répartition de la population en fonction du sexe :

Sur un effectif de 75 étudiants, les sujets féminins représentent plus que la moitié, soit (44/75), alors que les sujets masculins ne représentent que 41,33% (31/75). Le sexe ratio M/F est de 0,70 (Figure 1).

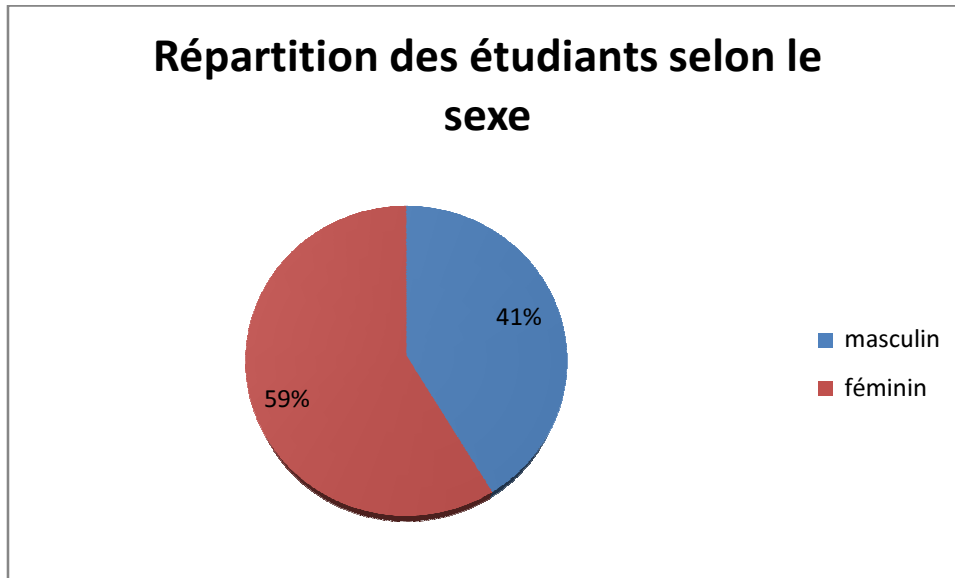


Figure 1 : Répartition des étudiants selon le sexe.

- Répartition de la population d'étude selon la tranche d'âge :

- La tranche d'âge des étudiants varie entre 20 et 25 ans.

- Les 4 patients Hurler sont âgés de 4 à 13 ans.

- Répartition de la population selon l'origine géographique

- Les origines géographiques des étudiants de la section pharmacie de Rabat sont représentées dans la figure ci-dessous:

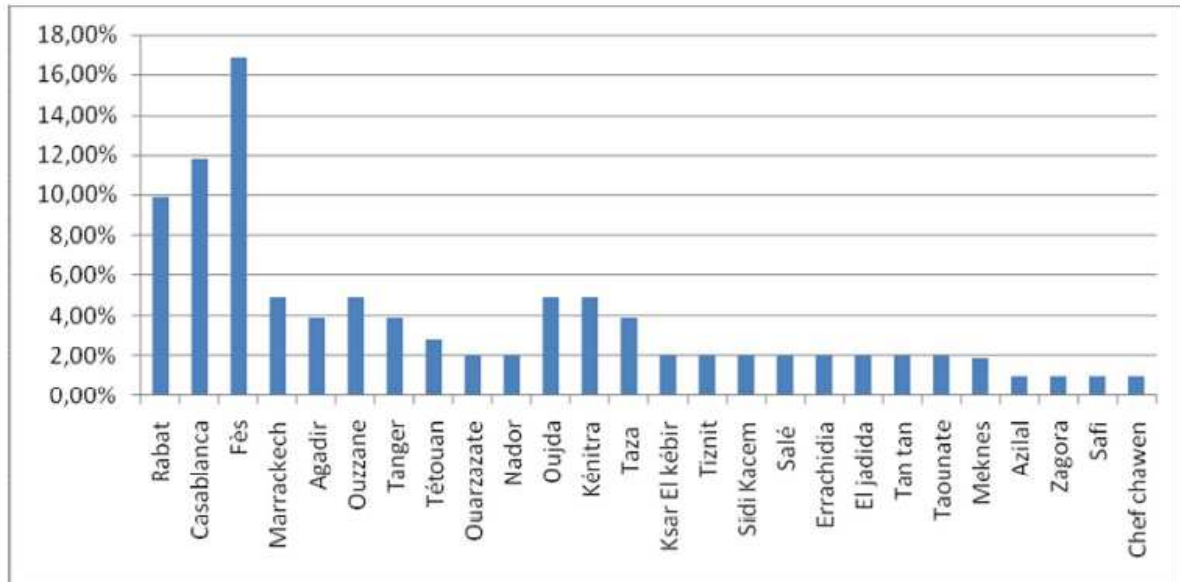


Figure 2 : Répartition des étudiants selon l'origine géographique.

2. Méthodes :

Nous avons réalisé cette étude en deux parties :

- La première partie consistait à étudier le polymorphisme de taille présent au niveau de l'intron 2 du gène IDUA chez la population phénotypiquement saine.
- La deuxième partie consistait à mettre en place une technique de diagnostic moléculaire de la maladie de Hurler en recherchant la mutation P533R, puis à vérifier l'efficacité de la technique mise en place grâce aux patients confirmés atteints de la maladie d'Hurler et portant la mutation P533R.

2.1. Etude du polymorphisme de taille :

Pour étudier le polymorphisme de taille présent au niveau de l'intron 2 du gène IDUA, nous avons réalisé des PCR à partir des ADN déjà préparés selon le protocole décrit par M. Max Bwanga (thèse de Pharmacie n°60, 2012). Les produits d'amplification obtenus sont ensuite séparés et identifiés par électrophorèse.

2.1.1. Amplification d'ADN cible (PCR) :

- Principe :

La PCR (Polymerase Chain Reaction) fut inventée par K. Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase pour répliquer in vitro des séquences précises d'ADN. Cette méthode permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes :

- Une dénaturation : c'est une étape qui permet de séparer les deux brins d'ADN par élévation de la température.
- Une hybridation : c'est une étape où les amorces vont reconnaître leur site complémentaire et vont s'y fixer par des liaisons hydrogène.
- Une élongation : c'est une étape qui permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (Figure 3).

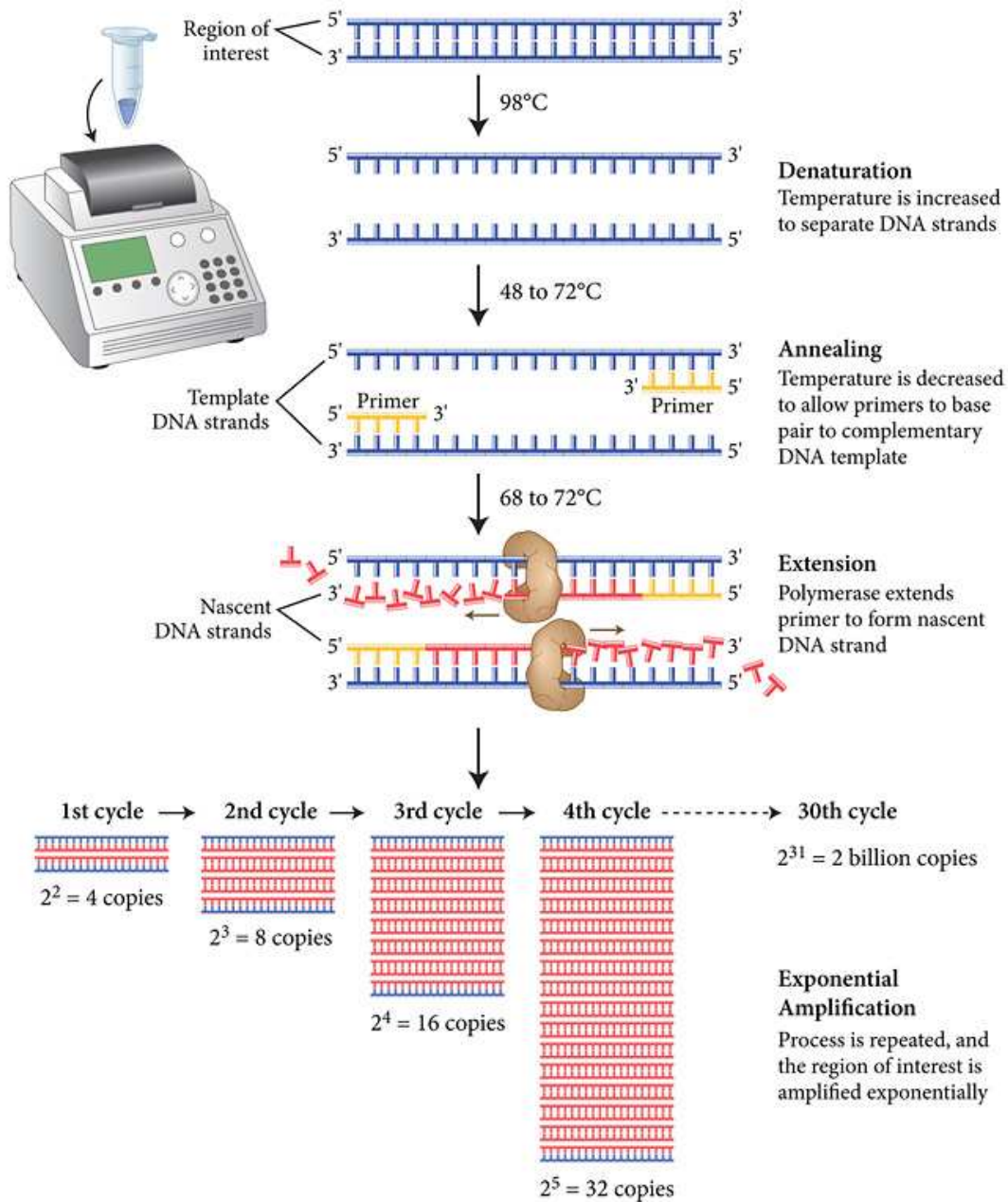


Figure 3 : Principe schématique de la PCR [5].

- Protocole :

La composition pour un volume de PCR de 50µl est la suivante :

Tampon taq (5X)	: 10 µl
Mgcl ₂ 25mM	: 5 µl
Le primer (F-I ₂)	: 1 µl
Le primer (R-I ₂)	: 1 µl
d-NTP	: 1 µl
Eau (ultra pure)	: 30,5 µl
Taq polymérase	: 0,5 µl
Echantillon d'ADN	: 1 µl

Les échantillons ainsi préparés sont placés dans un thermocycleur (HVD Life sciences Qantaus®).

Le paramétrage de l'appareil est réglé comme suit :

- Préchauffage de la plaque du couvercle du thermocycleur à 112°C.
- La dénaturation à 95°C.
- L'hybridation à 57°C.
- L'élongation à 72°C.

Le fragment de gène que nous allons amplifier est de 714pb. Il se caractérise par la présence d'un VNTR « variable number of tandem repeats »,

C'est un emplacement dans le gène où une courte séquence nucléotidique est organisée comme une répétition en tandem.

La séquence nucléotidique qui se répète est constituée d'un fragment de 86pb.

On distingue 3 allèles pour l'intron 2 en fonction de l'absence du fragment de 86pb (marqué en rouge) ou de sa présence en un ou en deux exemplaires.

Allèle G : 714pb. (Séquence nucléotidique de 86pb répétée)

```
taggtgtctcctcagagaggtccctcgctgaccatcaggctcctcactccctgtcgtatccccttac  
caaagattccattccctgacgacgcctgtcccctcggaatgcaggcctcgtgggaattcagccat  
ccgcaagtgcagtggcagggcggcccccttcccccttgacgacgcctgtccccttggaatgcagg  
cctcgtgggaattcagccatctgcaagtgcagtggcagggcggcccccttctcccttgaggacgc  
ctgtcccctcg|taatgcaggcctcgtgggaattcagccatctgcaagtgcagtggcagggcggc  
cccccttctcccttgaggacgcctgtcccctcg|taatgcaggcctcgtgggaattcagccatctgca  
agtgcagtggcagggcggcccccttctcccttgaggacgcctgtcccctcg|gaatgcaggcctcg  
tgggaattcagcccatctgcaagtgcagtggcagggcggcccccttctcccttgacgacgcctgt  
cccctcggaatgcaggcctcgtgggaattcagcccatcggcaagtgcagtggcagggcggccc  
cctcacccttgacgacgcctgtcccctcggaatgcaggcctcatgggaattcagccatctgcaag  
tgcagtggcagggcggcccccttctcccttctcctgtgcactcatgtgccttt
```

Allèle M : 628 pb (séquence nucléotidique en un seul exemplaire)

```
taggtgtctcctcagagaggtccctcgctgacctcaggctcctcactccctgtcgtatccccttac  
caaagattccattccctgacgacgcctgtcccctcggaatgcaggcctcgtgggaattcagcccat  
ccgcaagtgcagtggcagggcggccccctccccctgacgacgcctgtcccctggaatgcagg  
cctcgtgggaattcagcccatctgcaagtgcagtggcagggcggccccctctccctgaggacgc  
ctgtcccctcg|taatgcaggcctcgtgggaattcagcccatctgcaagtgcagtggcagggcggc  
ccccctccccctgaggacgcctgtcccctcg|gaatgcaggcctcgtgggaattcagcccatctg  
caagtgcagtggcagggcggccccctctccctgacgacgcctgtcccctcggaatgcaggcct  
cgtgggaattcagcccatcggaagtgcagtggcagggcggccccctcaccctgacgacgc  
ctgtcccctcggaatgcaggcctcatgggaattcagcccatctgcaagtgcagtggcagggcggc  
ccccctcccccttctgtgcactcatgttgccttt
```

Allèle P : 542pb. (Séquence nucléotidique est absente)

```
taggtgtctcctcagagaggtccctcgctgacctcaggctcctcactccctgtcgtatccccttac  
caaagattccattccctgacgacgcctgtcccctcggaatgcaggcctcgtgggaattcagcccat  
ccgcaagtgcagtggcagggcggccccctccccctgacgacgcctgtcccctggaatgcagg  
cctcgtgggaattcagcccatctgcaagtgcagtggcagggcggccccctctccctgaggacgc  
ctgtcccctcggaatgcaggcctcgtgggaattcagcccatctgcaagtgcagtggcagggcgg  
ccccctctccctgacgacgcctgtcccctcggaatgcaggcctcgtgggaattcagcccatcg  
gcaagtgcagtggcagggcggccccctcaccctgacgacgcctgtcccctcggaatgcaggc  
ctcatgggaattcagcccatctgcaagtgcagtggcagggcggccccctctcccttctgtgcact  
catgttgccttt
```

2.1.2. Electrophorèse sur Gel d'Agarose :

L'électrophorèse est une technique physicochimique qui sépare des constituants ionisés dans un champ électrique. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également pour purifier des molécules solubles.

Depuis une vingtaine d'année, le développement de nouveaux supports (gels de polyacrylamide, d'agarose et capillaires de silice) comme champ migratoire a donné à l'électrophorèse un nouvel essor. Il convient toutefois de distinguer les techniques utilisées par un laboratoire d'analyses de routine, qui reposent sur l'utilisation de kits (techniques semi- ou totalement automatisées), de celles pratiquées dans un laboratoire de recherche nécessitant une phase de mise au point [6].

- Principe de l'électrophorèse de l'ADN:

L'électrophorèse de l'ADN est effectuée dans un gel d'agarose creusé de puits où seront déposées les échantillons d'ADN (produits PCR) à analyser. Le gel plonge dans un tampon alcalin (pH 8.6). Dans ces conditions l'ADN qui s'ionise sur ses groupements phosphates est chargé négativement et migre vers l'anode. Le déplacement de l'ADN dans le gel poreux sous le champ électrique est proportionnel à la taille des fragments d'ADN qui sont donc séparés en fonction de leur taille, exprimée en paires de bases (pb). Les petits fragments migrent plus rapidement que les plus grands. Afin de repérer les fragments par leur taille, on dépose dans l'un des puits du gel, un marqueur de poids qui est formé par un mélange de fragments de tailles connues. Les marqueurs commercialisés sont souvent obtenus par digestion d'ADN identifié par une enzyme de restriction [6].

- Protocole utilisé :

Nous avons utilisé l'électrophorèse sur gel d'agarose pour identifier et contrôler les produits d'amplification par PCR.

Cette séparation s'effectue dans un tampon TBE à travers la matrice du gel d'agarose additionné de **Bromure d'éthidium** (BET), agent intercalant d'une grande sensibilité, la détection de la fluorescence s'effectuant sous UV [6].

L'action d'intercalation de cette substance est à l'origine d'effets mutagènes importants, pouvant être également cancérigènes et tératogènes. L'exposition est relativement faible lors de la manipulation des gels, ce qui ne dispense pas de porter impérativement des gants.

Le gel d'agarose à 2% est préparé dans le tampon TBE 1X.

Les conditions d'électrophorèse que nous avons utilisées sont :

- Tension : le voltage 60 volts.
- Temps de migration : une heure.

Dans ces conditions le courant généré est de 35 mA.

A la fin de la migration le gel est retiré de la cuve et placé dans la chambre de visualisation sous lumière UV. L'image est capturée à l'aide d'une caméra et traitée par ordinateur (Figure 4).

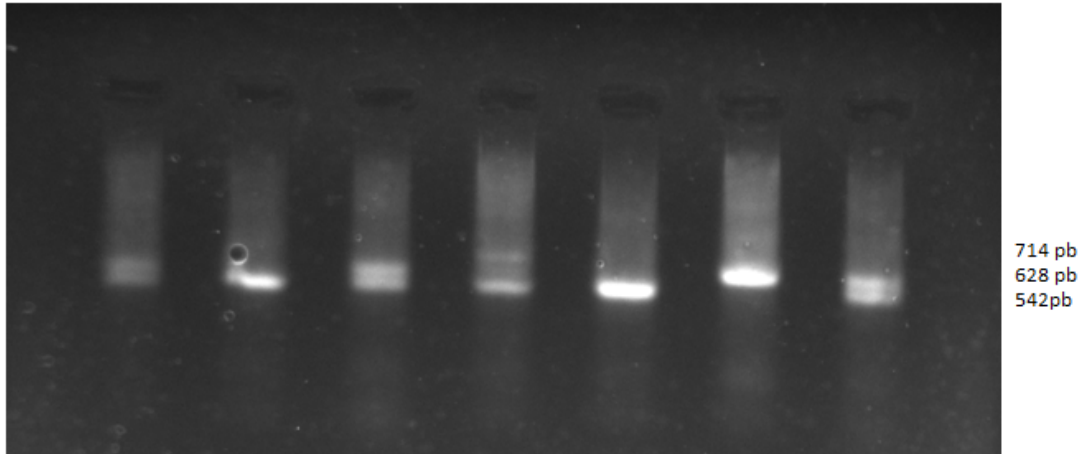


Figure 4: Photo d'une migration électrophorétique des produits d'amplification du VNTR de l'intron 2 sur gel d'agarose à 2%.

2.2. Technique de recherche de la mutation P533R par RFLP :

Pour mettre en place une technique de recherche de la mutation P533R, qui permettrait de diagnostiquer la maladie de Hurler sans faire de séquençage, nous avons procédé comme suit.

2.2.1. Amplification de l'ADN cible (PCR) :

- Protocole :

La composition pour un volume de PCR de 50µl est la suivante :

Tampon taq (5X) : 10 µl

MgCl₂ 25mM : 5 µl

DMSO : 5 µl

Le primer (F-11) : 1 µl

Le primer (R-12) : 1 µl
d-NTP : 1 µl
Eau (ultra pure) : 25,5 µl
Taq polymérase : 0,5 µl
Echantillon d'ADN : 1 µl

Les échantillons sont placés dans le thermocycleur. Le paramétrage de l'appareil est réglé comme suit :

- Préchauffage de la plaque du couvercle du thermocycleur à 112°C.
- La dénaturation à 95°C.
- L'hybridation à 57°C.
- L'élongation à 72°C.

Le fragment de gène que nous allons amplifier est de 449 pb.

2.2.2. Digestion enzymatique (RFLP) :

- Principe :

La RFLP est la l'abréviation de l'expression anglaise *Restriction Fragment Length Polymorphism* (le terme français équivalent est Polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Elle repose sur la digestion d'un ADN cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par l'ADN. Certaines mutations modifient la séquence du site de restriction et empêchent l'action de l'enzyme. Les modifications par mutation peuvent également faire apparaître un nouveau site de restriction permettant ainsi l'action d'une enzyme de restriction. Les non-coupures de l'ADN ou au contraire les nouvelles coupures sont détectées par une variation du nombre et

de la longueur des fragments d'ADN (fragments de restriction) obtenus après digestion enzymatique.

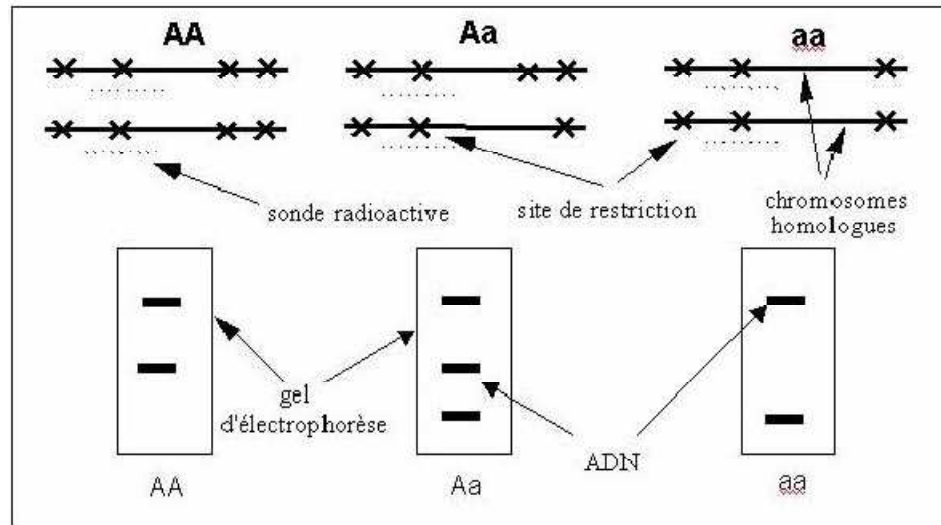


Figure 5: Principe de la Technique RFLP [7].

- Protocole :

Pour rechercher la mutation P533R nous utilisons l'enzyme Hpy99I. Elle possède deux sites de restriction sur le fragment amplifié au niveau de l'exon 11 du gène IDUA sur le chromosome 4. Le site de restriction reconnu par l'enzyme est CGWCG est indiqué en jaune sur la figure ci dessous.

L'action de l'enzyme à lieu juste après le site de reconnaissance comme indiqué sur la figure ci dessous par les flèches rouges.

```

cgcgcccttaccgcgcggcgccctgacctgcgccccgcgctgcggc
tgccgtcgcttttgcctggtgcacgtgtgtgcgcgccccgagaagccgcc
gggcaggcaagtggcagtcacctaacccgcgcgcggcccggaactccct
tccccgacgccatcacagcccttcctccccaggtcacgcggctccgcg
ccctgcccctgacccaagggcagctggttctggtctggtcggatgaacac
    
```

La composition pour un volume de digestion de 20µl que nous allons incuber à 37°C est la suivante :

ADN (produit PCR) : 10 µl

BSA : 0,5 µl

Tampon : 2 µl

Enzyme : 1U par µg d'ADN

Eau : 7 µl

En absence de la mutation, l'enzyme reconnaît les deux sites et engendre 3 fragments : **200pb + 148pb + 101pb**

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
200	Hpy99I	250	none	449	CCATCACAGC CCTCCCTCC CCCAGGTCAC GCGGCTCCGC GCCCTGCCCC TGACCCAAGG GCAGCTGGTT CTGGTCTGGT CGGATGAACA CGTGGGCTCC AAGTGCCTGA GTGGGGCCGC CCCTCCCTCT GCCTGGTCTT AGGCAGGTCC CTGGGTCCCG ACCCCTTAC CCATGCGGTC ACTCGGGCCA CTTGCCGTGG
148	none	1	Hpy99I	148	TTCGCCCTGA GGTCGGGCGC AGCGTCCCCA GCTCCCCTGG AGAACCCTGA GGACCGGCCA CTGCGCCAG GACCCGGTGG CCGCGGCGCC CCGCCCCTTA CCCGCCGGCG GCCGCCTGAC CCTGCGCCCC GCGTGCCTGG TG CCGTGC
101	Hpy99I	149	Hpy99I	249	CTTTGCTGG TGCACGTGTG TGCGCGCCCC GAGAAGCCGC CCGGGCAGGC AAGTGGCAGT CCCCTAACCC GCGCCGCGGC CCGGACTCCC CTTCC CGAC G

En présence de la mutation P533R, la cytosine est substituée par une guanine.

```

ccgcccttaccgcgcggcggcgccctgaccctgcgccccgcgctgcggc
tgccgtggcttttgctggtgcacgtgtgtgcgccccgagaagccgcc
gggcaggcaagtggcagtcacctaacccgcgccccggactccct
tcccggaccgccatcacagcccttcctccccagggtcacgcggtccgcg
ccctgccccgaccaagggcagctggttctggtctggtcggatgaacac
    
```

L'enzyme ne reconnaitra qu'un seul site ce qui va engendrer 2 fragments seulement : **200pb + 249pb.**

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
249	none	1	Hpy99I	249	TTCGCCCTGA GGTCGGGCCG AGCGTCCCCA GCTCCCCTGG AGAACCCTGA GGACCGGCCA CTGCGCCCAG GACCCGGTGG CCGCGGCGCC CCGCCCCTTA CCCGCCGGCG GCCGCCTGAC CCTGCGCCCC GCGCTGCGGC TG C GTCGCT TTTGCTGGTG CACGTGTGTG CGCGCCCCGA GAAGCCGCC GGGCAGGCAA GTGGCAGTCC CCTAACCCGC GCCGCGGCC GGA
200	Hpy99I	250	none	449	CCATCACAGC CCTTCCCTCC CCCAGGTAC GCGGCTCCGC GCCCTGCCCC TGACCCAAGG GCAGCTGGTT CTGGTCTGGT CGGATGAACA CGTGGGCTCC AAGTGCCTGA GTGGGGCCGC CCCTCCCTCT GCCTGGTCT AGGCAGGTCC CTGGGTCCCG ACCCCTCAC CCATGCGGTC ACTCGGGCCA CTTGCCGTGG

2.2.3. Electrophorèse sur Gel d'Agarose :

Les conditions d'électrophorèse avec lesquelles nous avons travaillé sont :

- Tension : le voltage 60 volts.
- Temps de migration : une heure et demie.

2.3. Technique de recherche de la mutation P533R par ARMS :

Nous avons procédé comme suit.

2.3.1. Principe de la technique ARMS:

Le système d'amplification par amorce spécifique (ARMS : amplification-refractory mutation system) est une méthode simple pour détecter toute mutation impliquant de petites délétions ou des mutations ponctuelles. Cette technique est basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques qui permettent d'amplifier l'ADN si l'allèle cible est contenue dans l'échantillon, la présence ou l'absence du produit de PCR permet donc de conclure que l'allèle cible est présent ou absent.

2.3.1. Amplification de l'ADN cible (PCR) :

- Protocole :

La composition pour un volume de PCR de 50µl est la suivante :

Tampon taq (5X)	: 10 µl
Mgcl ₂ 25mM	: 5 µl
DMSO	: 5 µl
Le primer (F-11N ou F-11M)	: 1 µl
Le primer (R-10)	: 1 µl
d-NTP	: 1 µl
Eau (ultra pure)	: 25,5 µl
Taq polymérase	: 0,5 µl
Echantillon d'ADN	: 1 µl

Pour chaque échantillon à étudier nous avons réalisé deux amplifications, une avec le primer forward normal et l'autre avec le forward muté. Les échantillons seront ensuite placés dans le thermocycleur Qantaus® selon les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude de la mutation P533R par RFLP.

2.3.3. Electrophorèse sur Gel d'Agarose :

Les conditions d'électrophorèse avec lesquelles nous avons travaillé sont :

- Tension : le voltage 60 volts.
- Temps de migration : une heure et demie.

Résultats :

1. Etude du polymorphisme de taille de l'intron 2 :

Après avoir réalisé la PCR et l'électrophorèse des 75 ADN recueillis chez les étudiants de la section pharmacie, les résultats de l'étude du polymorphisme de taille au niveau de l'intron 2 montrent la présence des 3 allèles dans la population étudiée. La figure 6 ci-dessous rapporte les exemples de 2 gels obtenus montrant les génotypes de certains étudiants de notre série.

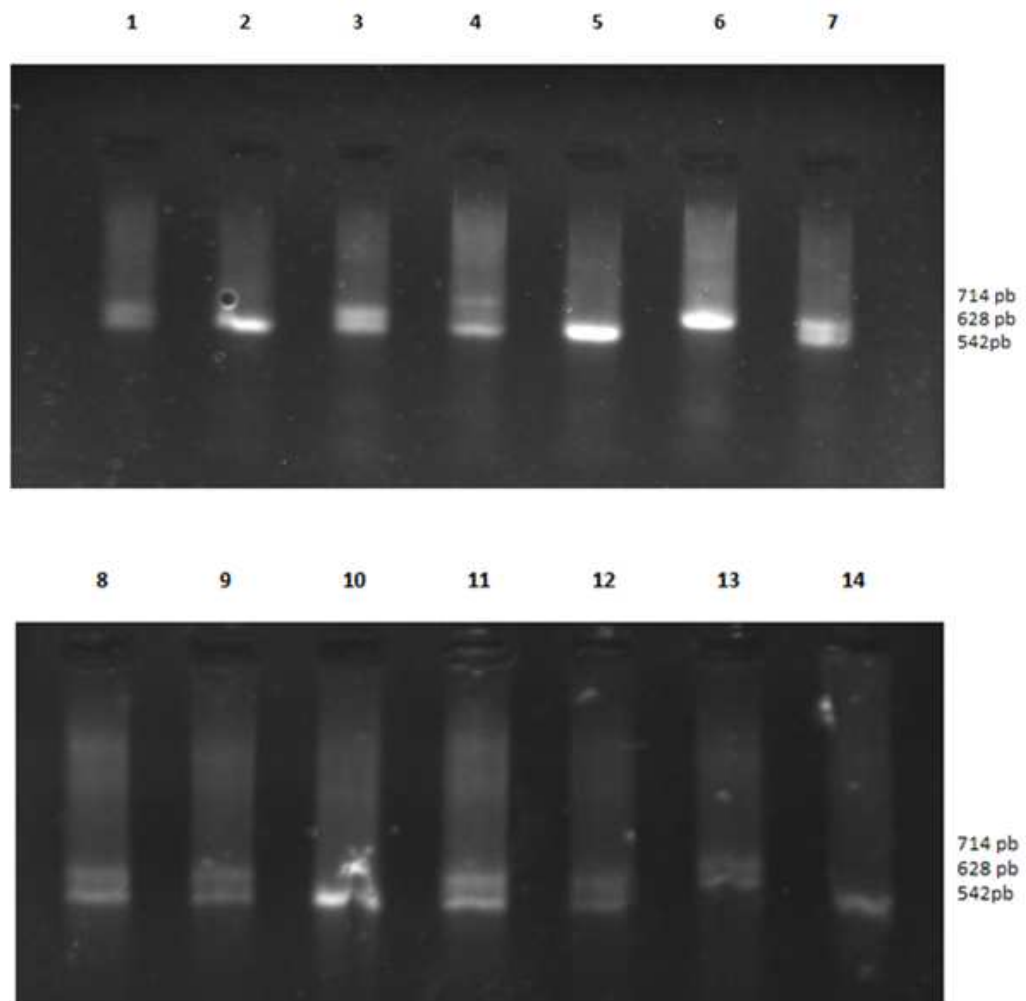


Figure 6 : Profils électrophorétiques de quelques échantillons étudiés.

Les résultats de l'étude de la répartition des 3 allèles et des différents génotypes, sont représentés dans les tableaux I et II et illustrés par les figures 7 et 8 ci-dessous.

Tableau I : Résultats de l'étude des génotypes du polymorphisme de taille

Génotype	Nombre de patients	Fréquence
M/P	20	27%
P/P	12	16%
G/P	11	15%
M/M	13	17%
G/M	13	17%
G/G	6	8%

Tableau II : Résultats de l'étude de la fréquence des allèles du polymorphisme de taille

Allèle	Nombre	Fréquence
P (542 pb)	55	37%
M (628 pb)	59	39%
G (714 pb)	36	24%

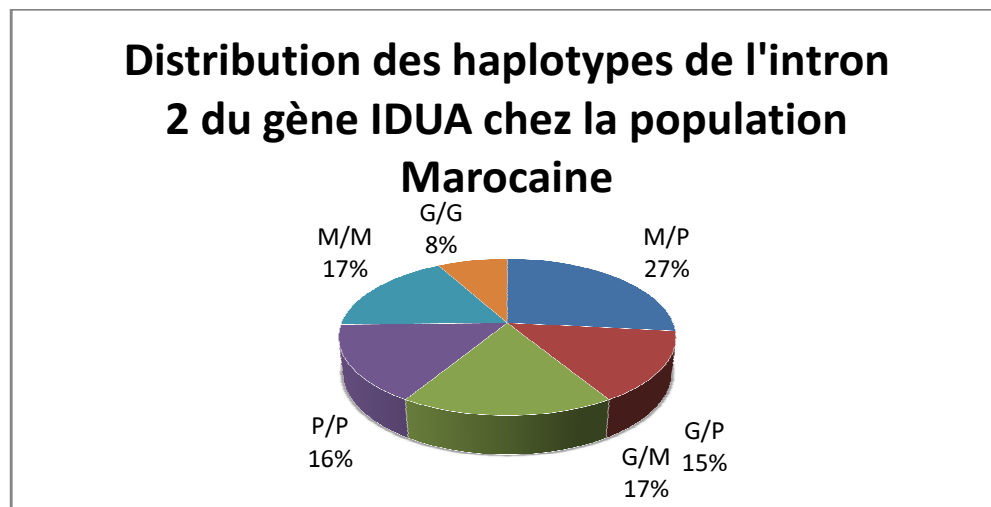


Figure 7 : Répartition des différents haplotypes de l'intron 2 du gène IDUA « chez la population marocaine ». G : 714pb ; M : 628pb ; P : 542pb.

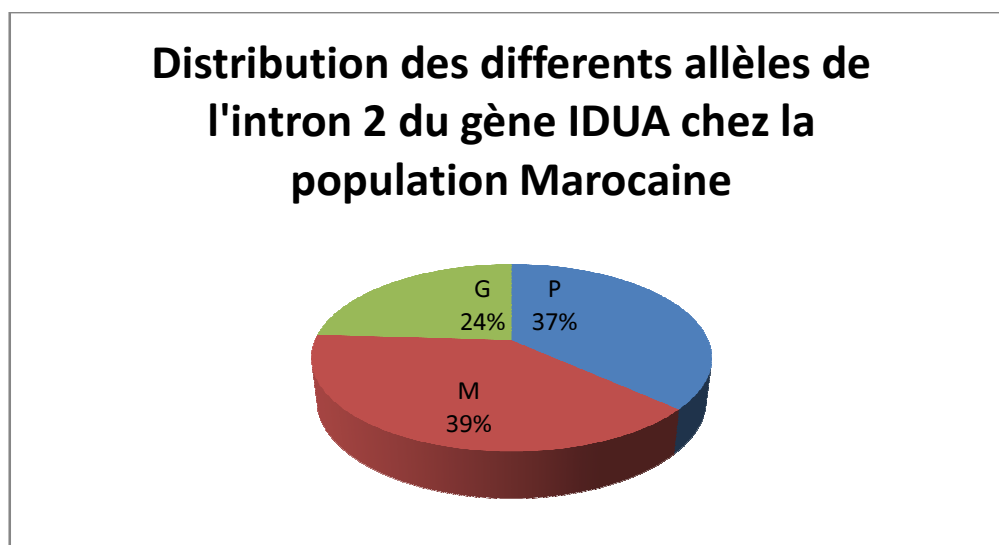


Figure 8 : Répartition des différents allèles de l'intron 2 du gène IDUA « chez la population marocaine ». G : 714pb ; M : 628pb ; P : 542pb.

2. Recherche de la mutation P533R par RFLP :

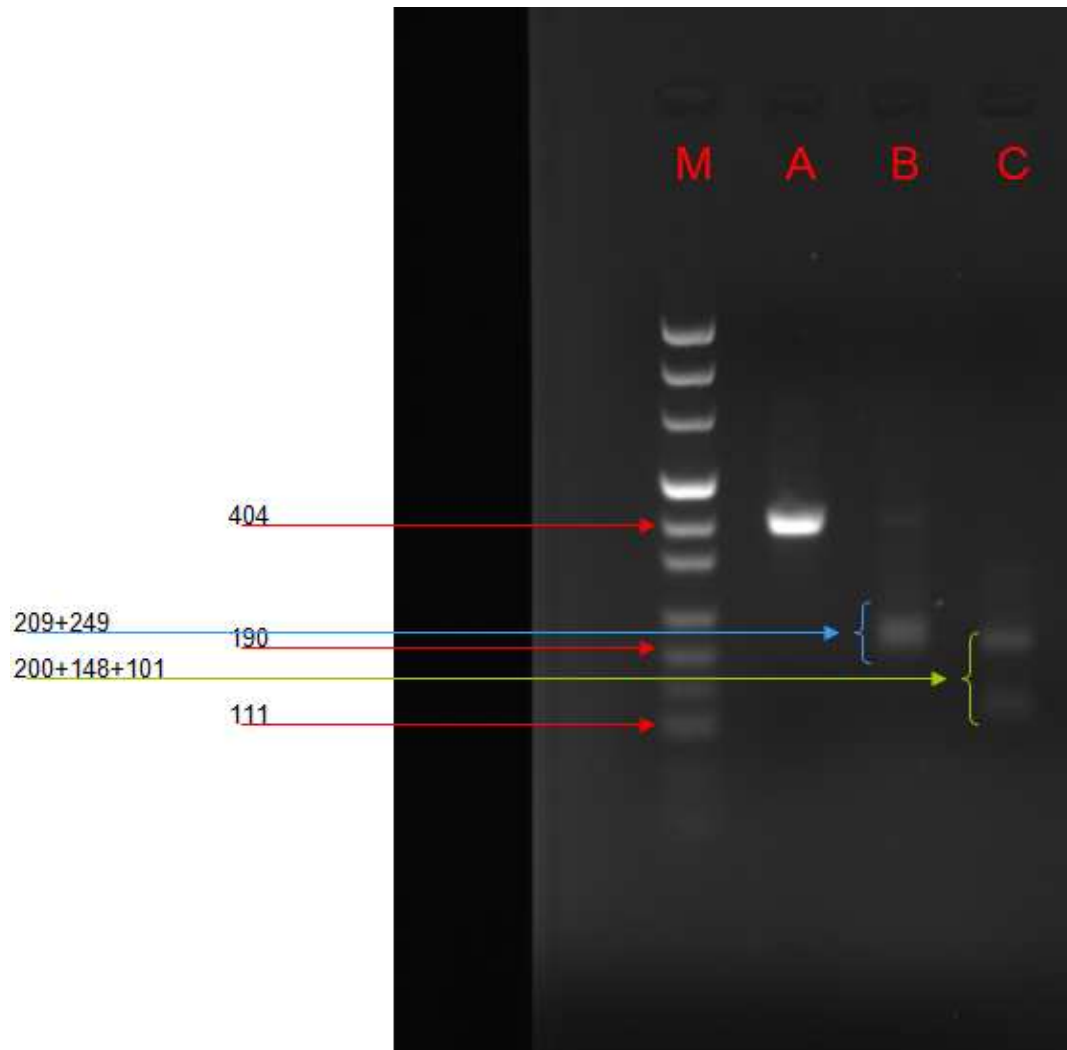


Figure 9 : Profil électrophorétique d'un échantillon normal et d'un échantillon muté après digestion enzymatique.

- Interprétations du profil électrophorétique :
 - « M » correspond au marqueur de poids moléculaire.
 - « A » correspond au fragment amplifié dans l'exon 11 avant digestion enzymatique. Il présente une bande de **449 pb**.

- « B » correspond aux sujets Hurler qui porte la mutation P533R après digestion enzymatique. Il présente 2 bandes seulement **200pb** + **249pb**.
- « C » correspond à l'un des étudiants de la série que nous avons étudiée. Il présente 3 bandes après digestion **200pb** + **148pb** + **101pb**.

3. Recherche de la mutation P533R par ARMS :

La figure 10 montre les résultats obtenus pour un patient Hurler homozygote pour la mutation P533R et pour l'un des étudiants étudiés.

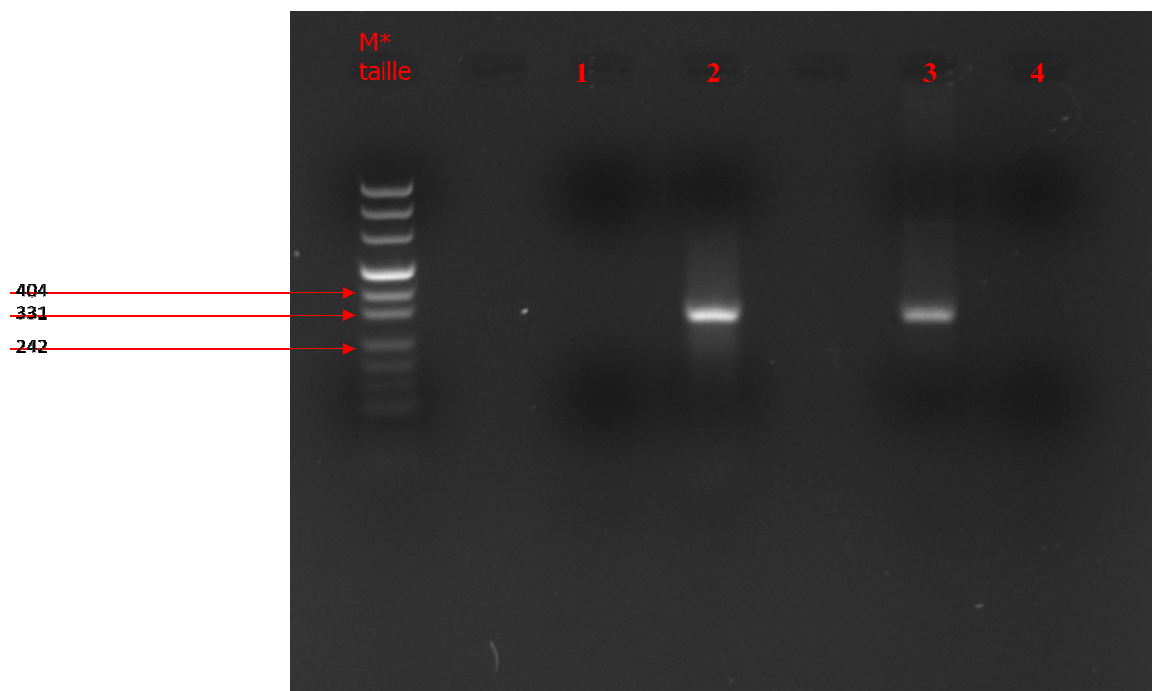


Figure 10 : Profil électrophorétique d'un échantillon normal et d'un échantillon muté après amplification par amorces spécifiques.

- Interprétations du profil électrophorétique :
 - « M* » correspond au marqueur de poids moléculaire.
 - « 1 » correspond à l'ADN du patient Hurler amplifié par le primer normal (amplification négative).
 - « 2 » correspond à l'ADN du patient Hurler amplifié par le primer muté. (amplification positive).
 - « 3 » correspond à l'ADN de l'étudiant 1 de la série que nous étudions amplifié par le primer normal (amplification positive).
 - « 4 » correspond à l'ADN de l'étudiant 1 de la série que nous étudions amplifié par le primer muté (amplification négative).

La recherche de la mutation P533R sur 22 ADN parmi ceux obtenus à partir des étudiants s'est avérée négative.

L'application des techniques mises au point aux ADN des 4 patients Hurler a montré que trois parmi eux étaient homozygotes et le quatrième hétérozygote pour la mutation P533R.

4. Résultats du séquençage de l'exon 11 des 4 patients Hurler :

La mutation P533R a été recherchée par séquençage de l'exon 11 chez les 4 patients Hurler. Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Biochimie Génétique de l'Institut Cochin à Paris dans le cadre d'un programme de collaboration, elle a permis de confirmer que 3 des patients que nous avons étudiés étaient homozygotes pour la mutation recherchée (Figure 11). Le quatrième patient était hétérozygote (Figure 12) pour la mutation P533R, il s'agit d'un patient ayant un statut d'hétérozygote composite pour qui la

recherche de la deuxième mutation qui est en cours nécessite le séquençage de l'ensemble du gène IDUA.

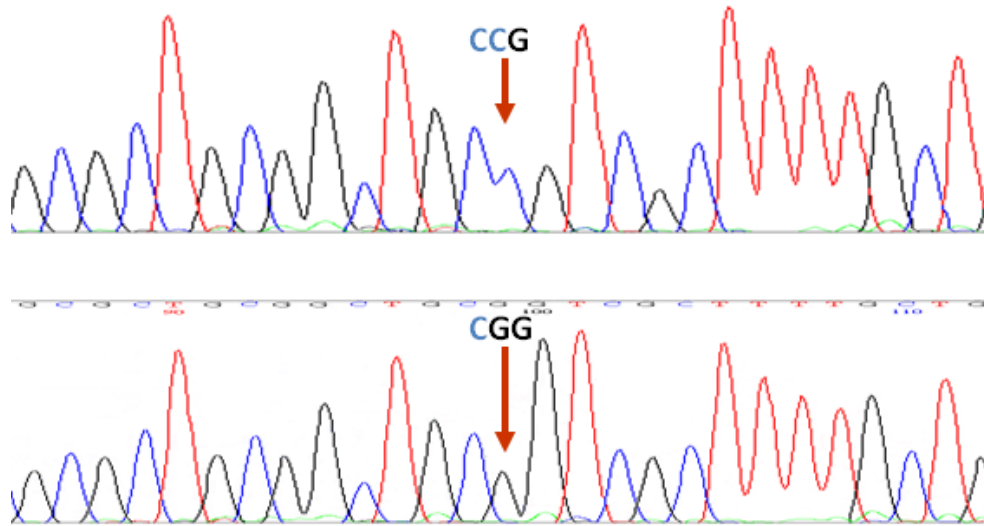


Figure 11 : Résultat du séquençage d'un patient Hurler homozygote pour la mutation P533R : séquence en bas (CGG) comparée à une séquence normale (CCG) en haut.

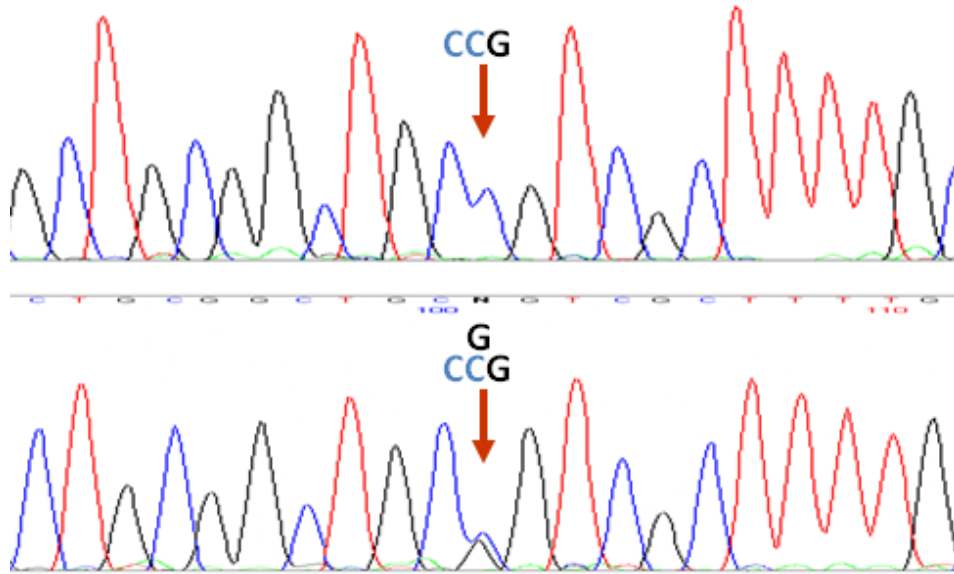


Figure 12 : Résultat du séquençage du patient Hurler hétérozygote pour la mutation P533R : séquence en bas (CGG/CCG) comparée à une séquence normale (CCG) en haut.

Discussion :

A. Aspects analytique :

- **Matériels génétique :**

L'objectif de notre étude est d'estimer la prévalence des trois allèles constituant le VNTR (Variable Number Tandem Repeat) présent au niveau de l'intron 2 du gène IDUA et de rechercher la mutation P533R au niveau de l'exon 11 du gène IDUA dans l'échantillon d'individus normaux recrutés, considérés comme représentatif de la population Marocaine.

Nous avons donc utilisé pour notre étude des ADN que nous avons récupérés à partir d'une population estimée représentative : les étudiants de la section Pharmacie. Ces ADN ont été prélevés dans le cadre d'une étude similaire portant sur la phénylcétonurie puis conservés à -20°C.

La population d'étude choisie peut être considérée représentative puisque les étudiants de la section pharmacie proviennent des différentes régions du Maroc. La quasi-totalité des régions du royaume furent donc représentées avec une prédominance des étudiants provenant des villes de Fès, Casablanca et Rabat qui sont des villes où le nombre d'habitants est également élevé par rapport à d'autres villes du pays. On pourrait donc considérer que le groupe d'étudiants est assez représentatif de la population Marocaine sans toutefois prétendre être à l'abri de biais de recrutement. Nous avons prévu d'augmenter l'effectif de notre groupe d'étudiants en prélevant une deuxième promotion d'étudiants en pharmacie, mais nous n'avons pas pu réaliser cet objectif pour des raisons logistiques. Nous considérons que les résultats que nous rapportons dans ce travail sont préliminaires.

- **La nature des Primers et leur concentration optimale :**

La mise au point de la technique a nécessité plusieurs ajustements en vue d'une optimisation des conditions de PCR permettant d'améliorer le rendement et d'augmenter la spécificité. Les ajustements avaient porté entre autres sur la nature des primers que nous avons utilisés et qui sont formés de 20 bases chacun. Nous avons préparé une dilution permettant de travailler avec une concentration de 100 ng/ μ l. Il faut noter qu'une concentration élevée en primers peut faire apparaître des produits d'amplifications non spécifiques.

- **La concentration optimale du Tampon Taq :**

Le tampon Tq 5X fourni par le fabricant doit être dilué au 1/5ème. Nous avons utilisé 10 μ l de tampon pour un volume total de PCR de 50 μ l.

- **Le volume de chlorure de magnésium à utiliser :**

La concentration de Chlorure de Magnésium ($MgCl_2$) est une donnée capitale qui doit être optimisée. Nous avons réalisé des PCR avec une gamme de concentrations de $MgCl_2$ en utilisant des prises d'essai de 3 μ l, 4 μ l et 5 μ l de $MgCl_2$ à 25 mM. Les résultats étaient meilleurs avec une prise de 5 μ l de $MgCl_2$.

- **La température optimale d'amplification:**

Nous avons réalisé plusieurs séries de PCR avec des températures d'hybridation allant de 56 à 60°C.

Pour l'étude du polymorphisme de taille (amplification de l'intron 2), 58°C était la température la plus concluante. Alors que pour l'étude de la mutation

P533R, nous avons opté pour 60°C, température optimale pour amplifier ce gène.

- **Optimisation de la PCR :**

Pour l'amplification des exons 10 et 11 riche en guanine et cytosine nous avons utilisé le DMSO connue pour son pouvoir à déstabiliser la structure en double hélice d'un ADN à haute teneur en GC. En effet La présence de guanine et cytosine augmente la force de liaison hydrogène rendant la dénaturation de la matrice plus difficile, ce qui conduit à la formation de structures secondaires intermoléculaires qui peuvent rivaliser avec l'hybridation des amorces [8].

- **Conditions physicochimiques de la digestion enzymatique :**

Nous avons choisi 37°C pour réaliser nos incubations comme le préconise la fiche descriptive de l'enzyme [9].

Nous avons ensuite testé des durées d'incubation de 4, 6, 8... heures afin de choisir la durée qui nous permet d'obtenir le meilleur rendement de digestion du fragment d'ADN étudié.

Nous avons ensuite retenu 6h.

B. Apport du travail au niveau marocain :

1. Intérêt de l'étude du polymorphisme de taille de l'intron 2 :

1.1. Les répétitions en tandem [10] :

- **Définition:**

Une répétition en tandem est une succession de motifs d'ADN répétés les uns derrière les autres. Les répétitions en tandem représentent environ 3% du

génomique humaine, la majorité (en nombre de locus) étant des répétitions de dinucléotides. Il y a environ 1 répétition en tandem tous les 2 kilobases. Elles ont été étudiées en premier lieu chez les mammifères, où trois catégories ont été distinguées : les satellites, les minisatellites, et les microsatellites.

Cette distinction correspond à différentes plages de taille (pour la longueur totale) et a été faite de façon plus ou moins arbitraire : l'ADN « satellite » a tout d'abord été observé et isolé par centrifugation sur gradient de densité, où il constituait une fraction particulière dite « satellite ». Ensuite, des répétitions en tandem de taille inférieure, pouvant être analysées grâce à la technique de Southern Blot, ont été caractérisées puis appelées « minisatellites ». Enfin, les répétitions en tandem de taille encore inférieure pouvant être étudiées par PCR ont été nommées « microsatellites ».

Les répétitions en tandem sont souvent polymorphes et leurs allèles, de tailles différentes, sont facilement identifiables par PCR à partir d'amorces spécifiques, suivie d'une simple migration sur gel. C'est la méthode que nous avons adoptée pour l'étude de l'intron 2 du gène IDUA.

La répétition en tandem que nous étudions au niveau de l'intron 2 est de 86pb. Elle est donc classée parmi les minisatellites qui sont définis comme étant constitués d'unités d'une quinzaine à plusieurs centaines de paires de bases. Le premier minisatellite humain a été mis en évidence en 1980 par Wyman [11] et le nom de « minisatellites » leur a été donné par Jeffreys en 1985 [12], qui a découvert la grande utilité de ces structures extrêmement polymorphes pour réaliser les premières « empreintes génétiques ».

- Rôles biologiques attribués aux minisatellites :

La plupart des minisatellites sont localisés dans des régions intergéniques. Ils peuvent cependant avoir des divers fonctions :

- Certains sont soupçonnés de jouer un rôle dans les phénomènes d'empreinte parentale.
- D'autres constituent des sites fragiles, cassures chromosomiques survenant lors de la métaphase à des localisations caractéristiques.
- Enfin, de façon plus hypothétique, les minisatellites pourraient jouer un rôle dans l'initiation de l'appariement des chromosomes.

Pour la plupart des minisatellites situés dans des introns, ou au niveau des jonctions introns/exons on peut noter une association entre certains allèles et des pathologies humaines :

- Indirectement, l'association reflétant alors un déséquilibre de liaison dû à la proximité entre le minisatellite et la mutation responsable du phénotype.
- Directement, le minisatellite lui-même étant impliqué dans la pathologie par l'une de ces deux voies majeures:
 - soit en modulant l'expression du gène situé à proximité.
 - soit en jouant un rôle sur l'épissage pour les minisatellites localisés dans des introns

1.2. Interprétation des résultats obtenus :

Sur les 150 chromosomes étudiés on note une prédominance de l'allèle M (39%), il est présent à 17% sous la forme homozygote M-M et à 44% sous la

forme hétérozygote M-G et M-P. Suivi de l'allèle P (37%), présent à 16% sous la forme homozygote P-P et à 41% sous la forme hétérozygote G-P et M-P. L'allèle le moins représenté est G (24%).

Scott [4] avait observé la même distribution lors d'une étude réalisée sur 136 chromosomes, issue de personnes phénotypiquement saines et ne représentant aucun lien de parenté. L'allèle M représentait 55%, suivi de l'allèle P (28%) puis de l'allèle G (17%).

Pour mettre en évidence une éventuelle relation entre le VNTR présent au niveau de l'intron 2 et la forme sévère de la MPS I, Scott [4] a aussi étudié 106 chromosomes issus de patients atteints du syndrome Hurlé. L'allèle M était fortement prédominant et représentait 81%.

Cela montre que la manifestation de la MPS I sous sa forme sévère fait intervenir plusieurs paramètres autres que la nature de la mutation au niveau de la partie traduite du gène IDUA. Il nous serait donc d'une grande utilité d'étudier la distribution de ces différents allèles à grande échelle chez la population Marocaine phénotypiquement saine et chez celle atteinte de la maladie d'Hurler. Cela permettra une meilleure compréhension des manifestations cliniques, qui sont pour la plus part très variées et de pronostic imprévisible, et une meilleure adaptation des traitements pour éviter les éventuelles complications mortelles.

2. Intérêt de la recherche de la mutation P533R :

Le gène IDUA est localisé sur le chromosome 4 (figure 13) entre les paires de bases 970785 et 988317 [14].

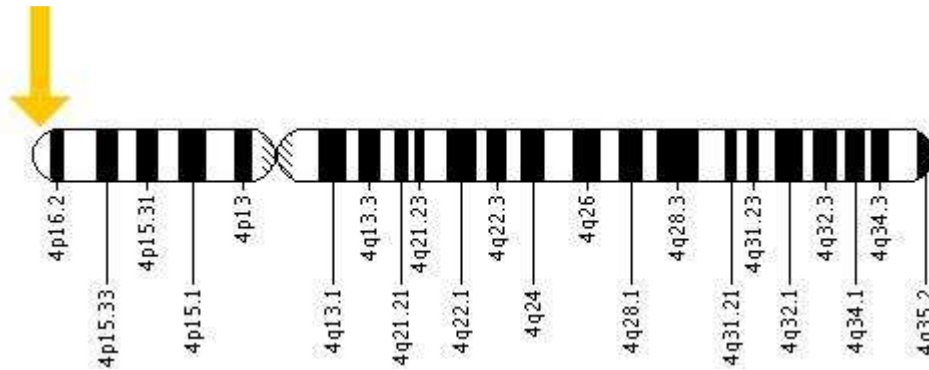


Figure 13 : Localisation du gène IDUA [14]

Le gène IDUA code pour une enzyme appelée « alpha-L-iduronidase » qui se trouve dans les lysosomes et intervient dans le catabolisme des glycosaminoglycanes (GAG). Elle hydrolyse les résidus acides alpha-iduronique en position terminale de deux GAGs : le dermatane sulfate et l'héparane sulfate.

Les mutations du gène IDUA sont responsables de la mucopolysaccharidose de type I (MPS I), caractérisée par l'accumulation lysosomique progressive du dermane-sulfate (DS) et de l'héparane-sulfate (HS) [1].

La mucopolysaccharidose de type I dans sa forme sévère a été décrite la première fois par Gertrud Hurler en 1919. L'accumulation de glycosaminoglycanes ou mucopolysaccharides n'est démontrée que plus tard en 1956 ; mais ce n'est qu'en 1970 que le déficit en alpha-L-iduronidase fût mis en évidence [15].

Il s'agit d'une maladie évolutive, progressive, multisystémique. Dans la majorité des cas, l'enfant naît après une grossesse et un accouchement normaux avec un examen néonatal normal [16].

Le diagnostic biologique repose sur l'excrétion urinaire accrue de DS et HS et le dosage enzymatique de l'alpha-L-iduronidase leucocytaire.

En dehors des traitements symptomatiques, deux traitements spécifiques sont possibles : l'allogreffe de moelle osseuse ou de sang de cordon, et l'enzymothérapie substitutive intraveineuse hebdomadaire (aldurazyme* : AMM en 2003) [17].

2.1. Sur le plan clinique:

La MPS I se manifeste selon trois formes cliniques:

La forme sévère Hurler (MPS I-H), la forme modérée : Hurler-Scheie (MPS I-H/S) et la forme atténuée Scheie (MPS I-S). La mutation P533R est connue pour son implication, le plus souvent, dans la forme sévère de la maladie (MPS I-H) [18].

Dans la MPS I-H, l'enfant est le plus souvent normal à la naissance, les signes cliniques apparaissent progressivement au cours de la première année. Le tableau clinique associe hernies, infection ORL répétées, dysmorphie faciale (Figure 14) et macrocéphalie, hirsutisme, cyphose dorsolombaire et limitations articulaires par dysostose multiple, hépatosplénomégalie, avance staturale initiale, puis nanisme, atteinte cardiaque, surdité, atteinte respiratoire, opacité cornéenne, et régression psychomotrice aboutissant à un retard mental sévère.

Les premiers signes cliniques de la maladie de Hurler apparaissent dans les premiers mois de la vie, mais le diagnostic est souvent tardif. On estime que 70% des patients ne se prêtent à l'avis d'un spécialiste qu'après l'installation du retard psychomoteur, la moyenne de l'âge d'admission reste élevée 5,9 ans [19].



Figure 14 : Morphotype d'un enfant atteint de la maladie de Hurler [1].

- **Le syndrome dysmorphique :**

La dysmorphie faciale est un signe caractéristique de la maladie de Hurler : Il existe une macrocranie, le front est saillant, le nez est aplati à sa racine et les narines sont larges. Le système pileux est très développé, les cheveux sont épais et raides, les sourcils broussailleux [20].

- **Les manifestations neurologiques :**

La détérioration mentale devient évidente dans la deuxième année. En effet la détérioration intellectuelle s'installe progressivement pour se préciser à l'âge de 3 ou 4 ans avec perte du langage, rupture du contact, régression des acquisitions psychomotrices [21]. Des anomalies du comportement sont fréquemment retrouvées : crainte, anxiété, trouble du sommeil et trouble de l'alimentation.

- **L'atteinte ophtalmologique :**

Chez les patients atteints de MPS I, l'accumulation de HS et du DS dans les tissus oculaires conduit à des manifestations cliniques ophtalmologiques

fréquentes [22]. L'opacification cornéenne stromale grisâtre puis l'aspect laiteux, prédominant souvent dans les couches antérieures et la région centrale, est une caractéristique des patients atteints de MPS I (80%) [19]. La baisse de l'acuité visuelle observée dans 50% des cas elle est relativement tardive [23].

- **L'atteinte otorhinolaryngologique :**

La perte de l'audition est extrêmement fréquente, elle est souvent présente au moment du diagnostic. Sa cause est attribuée au dépôt des GAGs dans le canal cochléaire, les stries vasculaires et le nerf cochléaire. Les patients atteints de la maladie d'Hurler présentent aussi une obstruction des voies aériennes supérieures pouvant aller de l'apnée du sommeil à une urgence obstructive menaçant la vie [24].

- **L'atteinte ostéoarticulaire :**

Chez les patients atteints de mucopolysaccharidoses, bien que le déficit touche une variété d'enzymes différentes, les manifestations cliniques liées aux atteintes ostéo-articulaires sont similaires. Ils sont dus à l'accumulation des GAG dans les lysosomes des os et du cartilage [25].

Le premier signe qui motive une consultation médicale est souvent l'apparition d'une raideur articulaire non inflammatoire, ce qui doit faire rechercher une mucopolysaccharidose. La diminution des amplitudes articulaires touche préférentiellement les mains se qui leur donne un aspect en griffe mais elle peut aussi toucher les épaules ou n'importe quelle autre articulation.

Le retard statural est souvent observé. La taille est généralement réduite (moins de 150 cm) mais peut être normale dans les formes atténuées. Le

développement axial est plus perturbé que le développement appendiculaire, en rapport avec un défaut d'ossification enchondrale du cartilage de conjugaison [26].

- **L'atteinte abdominale :**

L'infiltration des viscères par les mucopolysaccharides entraîne une hépato splénomégalie qui gêne la course du diaphragme engendrant un syndrome respiratoire restrictif, et participe à la distension abdominale avec comme conséquence une apparition d'hernies ombilicale et inguinale ayant la caractéristique de récidiver souvent après chirurgie [27].

- **L'atteinte cardiovasculaire :**

Chez les personnes atteintes de mucopolysaccharidose type I, l'échographie cardiaque montre une insuffisance mitrale, une insuffisance aortique et une dilatation ventriculaire. L'atteinte de l'endocarde et des valves cardiaques est due à l'infiltration par les mucopolysaccharides. On peut aussi noter une atteinte des artères coronaires qui peut être à l'origine d'angine de poitrine, et d'une hypertension artérielle [28].

- **L'atteinte respiratoire :**

La plupart des manifestations respiratoires sont caractérisées par une obstruction des voies aériennes qui est liée à un dépôt de GAGs. Initialement, les symptômes obstructifs sont plus prononcés au niveau des voies aériennes supérieures, puis les manifestations trachéo-bronchiques arrivent dans un deuxième temps. Ces atteintes sont plus fréquemment la cause du décès chez les patients atteints de la MPS I [29].

2.2. Sur le plan biologique:

Le diagnostic biologique de la MPS I comporte plusieurs étapes

2.2.1. Examens biologiques d'orientation : [30]

Les anomalies morphologiques des lymphocytes peuvent être révélatrices de pathologies métaboliques héréditaires. En effet plusieurs anomalies lymphocytaires sont décrites au cours des maladies de surcharge lysosomale. Certains examens hématologiques peuvent aider le diagnostic quand la symptomatologie clinique est évocatrice.

➤ **Le frottis sanguin :**

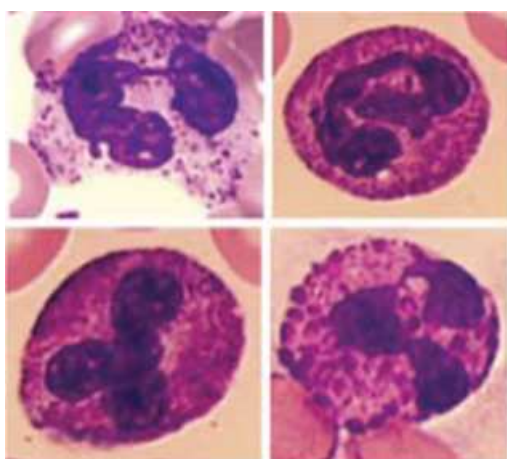
Dans le sang, les anomalies lymphocytaires sont multiples et plus ou moins spécifiques. Les lymphocytes vacuolés sont présents dans de nombreuses maladies de surcharge. La réalisation du frottis sanguin permet de rechercher :

- L'anomalie d'*Alder* : qui correspond à des granulations azurophiles plus grosses, plus denses anormalement surchargées en mucopolysaccharides.
- Le lymphocyte de *Gasser* qui est caractérisé par la présence au sein des vacuoles d'une inclusion de teinte violet- noir au MGG. La taille et le nombre de telles vacuoles sont très variables. Parfois, une même vacuole peut contenir plusieurs inclusions. La recherche doit être attentive (1 à 10 % des lymphocytes).

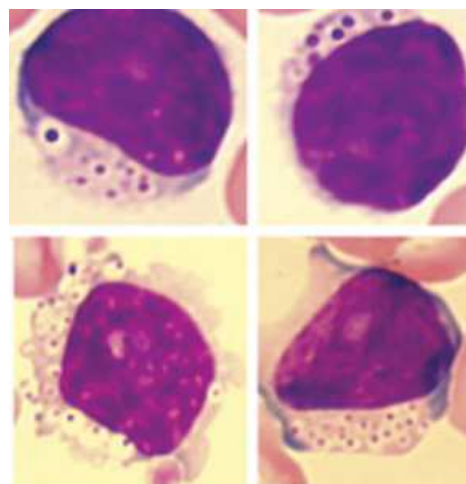
Leur présence est évocatrice de certaines mucopolysaccharidoses (Tableau IV, Figure 15).

Tableau IV : Maladies de surcharge lysosomale et anomalies cytologiques [31].

Type I – Hurler / Scheie	α -L-iduronidase	L. vacuolés \pm , L. de Gasser +, L. à granulations anormales \pm , anomalie d'Alder \pm	H. de Gasser +++, P. de Buhot \pm
Type II – Hunter	Iduronate-sulfatase	L. vacuolés \pm , L. de Gasser +, L. à granulations anormales \pm , L. rhodocircés \pm , anomalie d'Alder \pm	H. de Gasser ++, P. de Buhot \pm
Type III – Sanfilippo (sous-type A, B, C, D)	Enzymes variables dépendant du sous-type	L. vacuolés \pm , L. de Gasser +, L. à granulations anormales ++	H. de Gasser ++, P. de Buhot ++
Type IV – Morquio	N-acétylgalactosamine 6-sulfate sulfatase	Granulations anormales regroupées par paires dans les polynucléaires	
Type VI – Maroteaux-Lamy	N-acétylgalactosamine-4-sulfatase	L. vacuolés \pm , L. de Gasser +, L. à granulations anormales \pm , anomalie d'Adler ++	H. de Gasser +
Type VII – Sly	β - glucuronidase	Anomalie d'Adler +, L. de Gasser +, L. vacuolés \pm	P. de Buhot \pm , H. de Gasser +



Anomalies d'Alder



Lymphocytes de Gasser

Figure 15 : Anomalies lymphocytaires observées sur un frottis sanguin [31].

➤ **Le myélogramme :**

Il peut montrer de grandes cellules réticulaires qui contiennent de nombreuses granulations fortement basophiles, connues sous le nom de cellules de Gasser II.

2.2.2. Examens biologiques de confirmation :

L'étude biochimique des GAGs urinaires ainsi que le dosage de l'activité enzymatique de l'alpha- L-iduronidase sont indispensables au diagnostic biologique de la maladie d'Hurler.

➤ **Etude biochimique des GAG's urinaires :**

Les urines peuvent être soit des urines de 24h ou les urines de la première miction matinale. Elles sont recueillies dans un flacon propre sans additif et immédiatement adressées au laboratoire. Les urines de 24h doivent être conservées au frais.

• **Dosage des GAG's :**

Le dosage des GAG's est basé sur la métachromatie qui résulte de l'action de la DMB sur les GAG's sulfatés. La fixation du DMB sur les GAG's entraîne la formation d'une coloration violette proportionnelle à la concentration des GAG's .

Les résultats sont exprimés en mg/mmol de créatinine et varient en fonction de l'âge (Tableau IV).

Tableau IV : valeurs usuelles du dosage des GAG's urinaires par la méthode du DMB en fonction de l'âge [19].

Age en année	Taux desGAG's en mg/mmol de créatinine
[0-1]	3.7 - 26.16
[1-4]	5.32 - 13.82
[4-10]	2.67 - 7.55
[10-15]	2.27 - 5.81
> 15	0.81 - 1.73

- **Isolement des GAG's :**

L'isolement est réalisé par la méthode de hopwood et harisson. Elle consiste à traiter l'urine par le CPC (chlorure de cétylpyridinium) et à faire une précipitation différentielle des GAG's qui sont ensuite identifiés par électrophorèse.

- **Electrophorèse des GAG's urinaires :**

Elle permet l'évaluation quantitative des GAG's urinaires sur gel d'acétate de cellulose en tampon acétate de baryum à 0.05 M. Les bandes sont colorées par le diméthylméthylène bleu à 0.02%(figure 16).

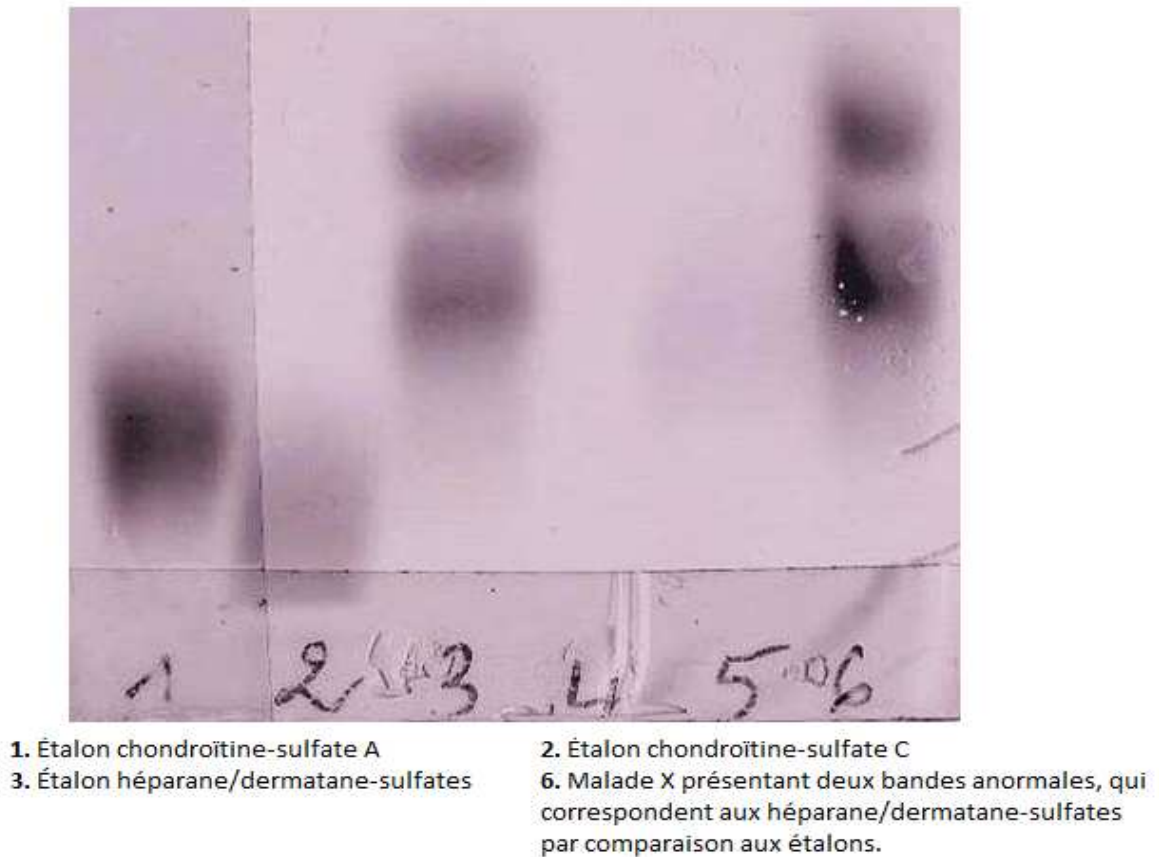


Figure 16 : profil électrophorétique de mucopolysaccharides sur plaque d'acétate de cellulose [1].

Cependant l'électrophorèse des GAG's urinaires ne permet pas de distinguer la MPS type I de la MPS type II (déficit en iduronate-2-sulfatase), car les deux présentent une excrétion urinaire accrue en DS et en HS. D'où l'intérêt de réaliser le dosage de l'activité enzymatique de l' α -L-Iduronidase.

➤ **Dosage de l'activité enzymatique de l' α -L-Iduronidase** : [32]

• **Isolement des leucocytes :**

Il se fait à partir de 5 à 10 ml de sang frais prélevé sur EDTA. Le sang est dilué dans une solution de chlorure d'ammonium qui lyse les hématies, puis les globules blancs sont récupérés en culot.

• **Dosage des protéines leucocytaires :**

Les globules blancs sont lysés par sonication ou par congélation dans l'azote liquide et le volume du lysat est ajusté avec du sérum physiologique. Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Lowry et le résultat est exprimé en mg/ml.

• **Détermination de l'activité enzymatique :**

La détermination de l'activité enzymatique de l' α -L-iduronidase (IDUA) est faite par une méthode colorimétrique en utilisant le substrat synthétique : le phényl- α -L-iduronide .

L'enzyme est caractérisée par sa propriété à hydrolyser de façon spécifique le phényl- α -L-iduronide en phénol et en acide α -L-iduronique. La réaction se fait à température ambiante, à pH 3,5 et l'incubation dure 18h. Le dérivé coloré produit présente un maximum d'absorbance à 760 nm, cette absorbance est proportionnelle à la quantité de phénol libérée par l'enzyme à partir du substrat pendant l'incubation [10].

L'activité de la β -D-glucosaminidase est aussi déterminée, elle est témoin de la qualité du prélèvement. Son activité est déterminée par fluorimétrie en

utilisant comme substrat le 4-méthyl-umbelliféryl-N-acétyl- β -D-glucopyranoside.

Tableau V : valeur usuelles de l'activité enzymatique des enzymes lysosomiques [19].

Enzymes lysosomiques	Activité enzymatique (nmoles/h/mg de protéines)
α -L-iduronidase	10-25
α -mannosidase	114-510
β -glucosaminidase	80-500

L'expérience marocaine dans ce domaine avait débuté en 1991 à l'Hôpital d'Enfant de Rabat avec la création au sein du laboratoire de biochimie d'un centre d'étude des maladies héréditaires du métabolisme (CEMHHM). Grâce à la collaboration avec le laboratoire de biochimie métabolique de l'hôpital Debrousse de Lyon, le Laboratoire du CHU de l'Hôpital Ibn Sina a pu installer les techniques colorimétriques, électrophorétiques et chromatographiques permettant le diagnostic des mucopolysaccharidoses et des oligosacchariduries. Le schéma général de la conduite diagnostique est illustré dans la figure 17.

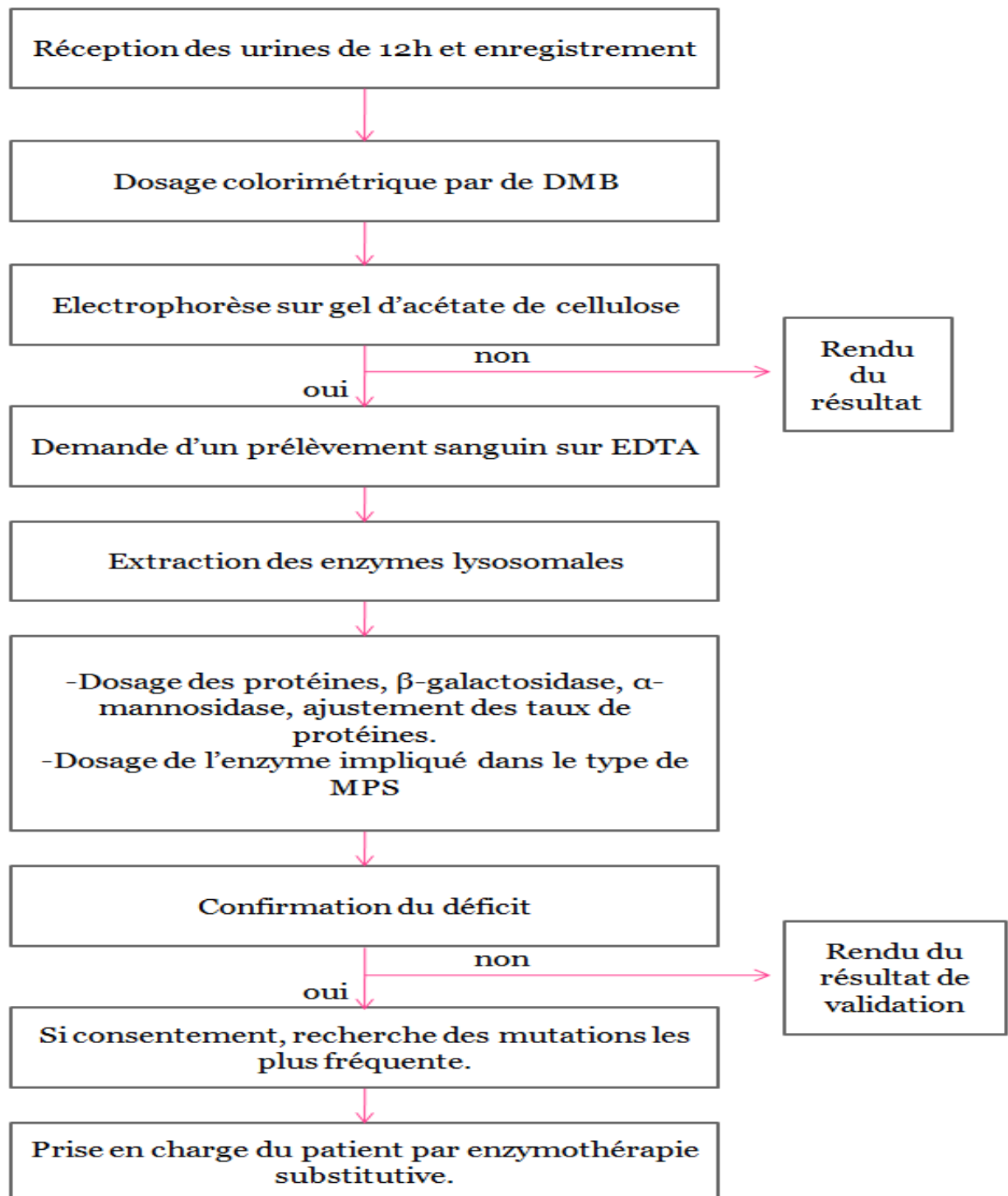


Figure 17 : Shéma résumant les étapes du diagnostic biologique des MPS [33].

2.3. Sur le plan moléculaire (génétique) :

2.3.1 Apport de l'étude moléculaire (génétique) à la MPS I:

La caractérisation moléculaire du gène IDUA identifie au moins 100 mutations distinctes, incluant des réarrangements génétiques complexes, des mutations faux sens, non sens du site d'épissage des grandes ou petites délétions intra géniques et des insertions au niveau du gène codant l' α -L-iduronidase. Toutes ces mutations sont répertoriées au niveau de la base de donnée « Human Gene Mutation Database : www.hgmd.org ».

Toutefois, plusieurs études démontrent une prévalence de mutations par régions géographiques. Les mutations W402X, Q70X sont responsables de la moitié des mutations dans la population européenne [34], alors que la P533R est identifiée comme étant la mutation prédominante dans la population méditerranéenne [35].

L'étude moléculaire génétique pourrait aider au diagnostic et à la prédiction précoce de la gravité de la maladie. Selon Scott la W402X, Q70X et P533R sont les trois mutations impliquées dans les phénotypes sévères de MPS I [36]. L'étude moléculaire génétique permettrait donc d'apporter une aide au pronostic (corrélation génotype-phénotype) et au choix thérapeutique bien que la vaste hétérogénéité génétique du gène IDUA complique cette corrélation [37]. Elle pourrait aussi servir pour fournir le conseil génétique aux familles dont un ou plusieurs enfants sont atteints de la maladie d'Hurler.

Les principales mutations sont rapportées dans la figure 18.

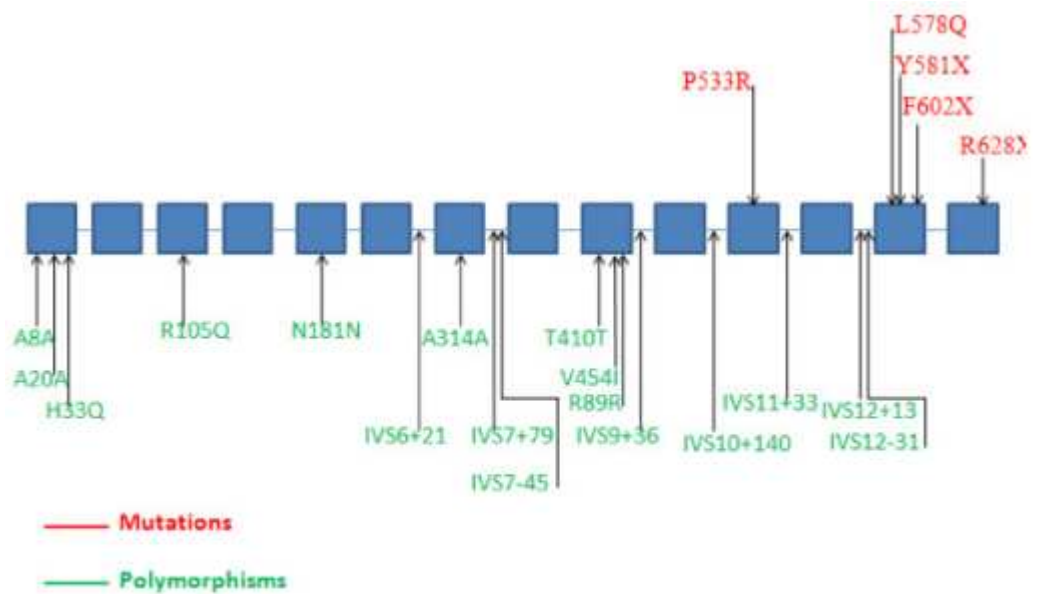


Figure 18 : Localisation de la mutation P533R dans le gène de l'IDUA [14].

La mutation P533R a été rapportée comme étant la mutation la plus fréquente au Maroc où elle a été identifiée dans 92% des cas [38]. Nous avons recruté 4 patients et nous avons trouvé cette mutation dans 7 chromosomes parmi les huit étudiés. Il s'agit d'une mutation ponctuelle (CCG =>CGG) qui conduit à la substitution d'un acide aminé neutre (la proline) par un acide aminé basique (l'arginine) en position 533 de la protéine IDUA.

2.3.2 Interprétation des résultats obtenus pour la mise au point d'une technique de recherche de la mutation P533R :

L'étude moléculaire génétique qui se fait actuellement nécessite la réalisation du séquençage directe de l'ADN dont le coût est relativement élevé pour les familles à revenu limité et ne bénéficiant d'aucune prise en charge.

Le but de notre travail est de mettre au point une technique de recherche de la mutation la plus fréquente au Maroc P533R. Une technique qui serait facile à réaliser, qui donne des résultats fiables et qui coûte beaucoup moins cher que le séquençage.

Nous avons procédé dans un premier temps à la mise au point d'une technique de recherche de la mutation P533R par RFLP. Cette mise au point nous a pris des mois avant que nous puissions bien maîtriser tous les paramètres impliqués dans sa réussite. Les résultats obtenus prouvent que l'on peut se fier à cette méthode pour dire si le patient atteint de la maladie d'Hurler présente ou pas une mutation P533R, et sans avoir à faire de séquençage.

Après la mise en évidence de la présence du DS et HS dans les urines et de l'absence de l'activité enzymatique de α -L-iduronidase, on peut appliquer la technique RFLP que nous avons mise au point durant notre étude. Si le patient atteint de la maladie d'Hurler présente la mutation P533R il va présenter 2 bandes à l'électrophorèse (**249pb + 200pb**), alors que s'il ne porte pas la mutation P533R, il va présenter 3 bandes (**200pb + 148pb + 101pb**).

La recherche de la mutation par RFLP donne des résultats fiables, mais son application reste contraignante vue qu'elle nécessite la réalisation de la PCR puis de la digestion enzymatique avant d'être révélé par électrophorèse. L'enzyme de restriction est relativement couteuse. Tenant compte de tous ces

paramètres nous avons essayé de développer une technique plus simple et de coût moins cher, c'est la technique ARMS.

Pour réaliser la technique ARMS nous avons procédé à une amplification spécifique en utilisant des amorces spécifiques. Chaque échantillon est amplifié deux fois, l'une avec l'amorce qui reconnaît le gène normal l'autre avec l'amorce qui reconnaît le gène muté. La réalisation de l'électrophorèse permet de connaître quelle amorce a permis d'amplifier le gène et par la suite de savoir s'il est normal ou s'il présente une mutation P533R. Cette technique reste relativement simple et de coût moins élevé que la RFLP, même sa mise au point ne nous a pas pris beaucoup de temps.

Nous avons appliqué la technique ARMS sur 22 des ADN de notre série d'étudiants pour rechercher un éventuel hétérozygote. Aucun échantillon n'a donné de résultat positif, cela ne nous a pas permis de tirer de conclusion valable sur la fréquence de la mutation P533R au Maroc. La principale réserve est en relation avec le nombre d'échantillons que nous avons contrôlés et avec la difficulté de constituer un échantillon représentatif de la population marocaine.

Certes la mutation P533R est la plus fréquente au Maroc mais elle n'est pas la seule mutation impliquée dans la MPS I chez la population marocaine. Donc il se peut que sa recherche s'avère négative même chez de véritables patients atteints de la maladie d'Hurler. L'application de la technique permet de distinguer les patients homozygotes pour la mutation P533R de ceux qui sont hétérozygotes. Elle permet aussi de différencier entre les sujets qui ne portent pas cette mutation de ceux qui la porte. Cette technique est donc très prometteuse pour les études familiales et pour la recherche des porteurs

hétérozygotes dans les familles à risque (cas index). Elle est donc très utile pour le conseil génétique.

2.4. Sur le plan thérapeutique :

La prise en charge des patients après un diagnostic de certitude comporte:

2.4.1. Traitement symptomatique :

Il permet d'améliorer la qualité de vie des malades en leur assurant un certain confort.

- **Traitement à visé respiratoire et ORL :**

L'objectif du traitement est de contrôler les infections récurrentes des voies respiratoires. Une antibiothérapie (de 10 - 15 jours) peut être utilisée pour traiter une infection bactérienne aiguë « bronchite aiguë, l'otite moyenne aiguë, une amygdalite... ». Les décongestionnants nasaux topiques peuvent être utilisés pour les épisodes aigus dans lesquels l'obstruction nasale est très intense. Les corticoïdes systémiques pendant de brèves périodes peuvent aider à réduire l'œdème et à faciliter le drainage des sécrétions [34].

- **Traitement à visé cardiovasculaire :**

La mort précoce chez les patients atteints de MPS type I dans sa forme sévère peut être causée en partie par les cardiomyopathies. Environ la moitié des patients meurent de causes cardiaques, d'insuffisance cardiaque congestive ou d'arythmie soudaine [34].

Dans le but d'améliorer l'état clinique des patients, les cliniciens peuvent instaurer un certain nombre de traitements. Des tonicardiaques en cas

d'insuffisance cardiaque, des vasodilatateurs coronariens en cas d'angine de poitrine, d'antihypertenseurs en cas d'hypertension artérielle ... Ils peuvent même proposer un remplacement valvulaire chez les patients souffrant d'une atteinte valvulaire sévère. [19]

- **Traitement à visé ophtalmologique :**

Le suivi ophtalmologique comporte le dépistage d'une hypertonie et/ou d'une atteinte rétinienne, ainsi que l'instauration de mesures photoprotectrices contre la photophobie. Une kératoplastie transfixiante peut être réalisée, même si son succès n'est que transitoire [22]. La tension oculaire doit être surveillée régulièrement pour dépister et traiter chirurgicalement un glaucome débutant [19].

- **Traitement à visé ostéoarticulaire :**

Les douleurs peuvent être calmés par des massages, la chaleur et par médicaments antalgiques (salicylés, paracétamol...). Des chaussures orthopédiques adaptées ainsi qu'une kinésithérapie motrice sont utiles et peuvent être envisagées. Une chirurgie orthopédique peut être réalisée pour corriger les déformations osseuses surtout au niveau des hanches, des genoux et des pieds [19].

2.4.2. Le traitement spécifique :

- **L'enzymothérapie substitutive :**

Les recherches fondamentales et cliniques sont très actives pour le développement de nouvelles thérapies pour les maladies lysosomales. Historiquement, la première enzymothérapie substitutive fut développée pour le

traitement de la maladie de Gaucher. Elle était basée sur l'administration en perfusion d'une enzyme extraite de placenta.

Pour le traitement des MPS I une enzyme substitutive existe : la laronidase, Aldurazyme[®] (Genzyme Corp Naarden, Pays-Bas). C'est une α -L-iduronidase recombinée de poids moléculaire d'environ 83 kDa, la protéine recombinante est composée de 628 acides aminés après clivage de l'extrémité N-terminale [39]. L'Aldurazyme[®] reste le premier médicament d'enzymothérapie substitutive approuvé pour le traitement des troubles de la MPS I. Elle a obtenu l'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis et en Europe en 2003 [40].

La laronidase est commercialisée dans un flacon de 5ml (0,58 mg / ml). Avant utilisation, le produit doit être stocké dans un réfrigérateur entre 2°C et 8°C. Après reconstitution il peut être conservé pendant un maximum de 24 heures à condition qu'il soit conservé au réfrigérateur. Actuellement, la FDA (Food and Drug Administration) recommande l'addition de 0,1% du sérum albumine humaine à la solution de perfusion.



-Mode d'administration de la laronidase : [41]

- 1) Peser le malade avant chaque perfusion;
- 2) Vérifier les signes vitaux (température, fréquence cardiaque et respiratoire, et la pression artérielle) et la saturation en oxygène avant de commencer la perfusion ;
- 3) Le patient doit recevoir une prémédication par des antipyrétiques et des antihistaminiques 30 à 60 minutes avant la perfusion ;
- 4) la laronidase est administrée à raison de 0.58 mg/kg de poids du malade :
 - Si le poids est inférieur à 20 kg: la laronidase est diluée dans 100 ml de solution saline à 0,9%. La perfusion est débutée à une vitesse de 2 ml par heure puis doublée toutes les 15 minutes jusqu'à atteindre un maximum de 32 ml par heure.
 - Si le poids est supérieur à 20 kg : la laronidase est diluée dans 250 ml de solution saline à 0,9%. La perfusion est débutée à une vitesse de 5 ml par heure puis doublée toutes les 15 minutes jusqu'à atteindre un maximum de 80 ml par heure.

Malgré le bénéfice indiscutable de ce traitement dans l'amélioration de la qualité de vie des patients, la Laronidase à posologie habituelle et par voie intraveineuse ne passe pas la barrière hématoencéphalique(BHE) . Donc en cas d'atteinte neurologique préexistante ou survenant au cours de la maladie le devenir est réservé. Des techniques visant à faciliter le passage de la BHE sont encore du domaine de la recherche : utilisation de fortes doses de Laronidase, thérapie génique intracérébrale... [42]

L'effet indésirable le plus marqué de la laronidase est le développement d'une réponse immune contre la protéine exogène présente dans la perfusion. Afin de diminuer le risque de réaction anaphylactique, les traitements antihistaminiques, antipyrétique et parfois corticoïdes sont proposés avant chaque perfusion. Il s'agit d'une complication habituelle de l'enzymothérapie substitutive, il a été démontré que 50% des patients développaient des IgG antilaronidase, en moyenne six à neuf semaines après la première perfusion. Ces IgG diminuent au bout de six mois de traitement en moyenne, par le biais d'introduction d'une tolérance immune. Elles ne réduiraient pas l'efficacité des perfusions [43].

- **Grefe de moelle osseuse :**

La première greffe de moelle osseuse indiquée pour maladie métabolique a été réalisée en 1980 chez un patient présentant le syndrome de Hurler. Cette greffe a entraîné une correction des paramètres biochimiques ; une amélioration de la croissance, du développement psychomoteur et de plusieurs autres manifestations somatiques de la maladie [34]. La greffe constitue le traitement de première intention pour les malades âgés de moins de deux ans, elle donne de bons résultats à condition qu'elle soit réalisée très tôt. Mais elle est accompagnée d'une morbi-mortalité élevée et pose des problèmes de recrutement des donneurs.

- **Grefe de sang ombilical :**

Pour les patients présentant des phénotypes sévères, particulièrement impliquant le système nerveux central, la transplantation de cellules souche hématopoïétiques allogéniques est le seul traitement actuellement disponible. Il

permet de corriger les paramètres métaboliques à long terme et d'améliorer les symptômes neurocognitifs et fonctionnels, en particulier lorsque cette transplantation est effectuée au début de l'évolution de la maladie [44].

CONCLUSION

La maladie d'Hurler est une MPS due au déficit de l'alpha-L-iduronidase. C'est une maladie évolutive, progressive et multisystémique. Son traitement repose essentiellement sur l'enzymothérapie substitutive qui doit être instaurée très tôt, d'où l'intérêt de dépister les malades de façon précoce ce qui est possible lorsque un cas index a été diagnostiqué.

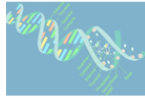
Nous espérons à travers ce travail avoir contribué à mieux faire connaître la maladie d'Hurler dans notre contexte marocain surtout ses aspects moléculaires et que ce modeste travail sera une ouverture pour d'autres études similaires. L'expérience du Laboratoire de Biochimie du CHIS de Rabat montre que sur une vingtaine d'années, plus de 86 patients ont été diagnostiqués et dont la plupart n'ont pas pu être traités. Il y a ici un argument suffisamment puissant pour inciter à mener une étude sérieuse sur la prévalence réelle de cette maladie et sur le profile génétique des patients pour mieux comprendre les particularités des patients marocains. Tout cela permettra de mieux prendre en charge les malades et mieux accompagner leurs parents.

Notre étude a permis de mettre au point deux techniques qui permettent d'identifier avec certitude la mutation P533R, mutation la plus fréquente au Maroc. Les deux techniques restent relativement faciles à utiliser surtout la technique ARMS qui est de réalisation plus simple et dont le coût est relativement moins élevé que la RFLP.

Nous espérons intégrer ces méthodes dans la stratégie diagnostique de la maladie d'Hurler. En effet il serait très intéressant de rechercher la mutation P533R en premier lieu par RFLP ou par ARMS avant de recourir au séquençage.

Ces méthodes permettent aussi d'offrir un conseil génétique fiable aux familles à risque si un cas index est diagnostiqué, en relation avec la présence ou non de la mutation P533R. Le dépistage des hétérozygotes serait donc un grand pas vers la prévention de cette maladie. La connaissance du génotype permettra le conseil génétique important pour la population Marocaine où la consanguinité reste fréquente. La recherche des hétérozygotes dans la famille proche du malade constitue un outil pour faciliter la réalisation d'un éventuel diagnostic prénatal.

ANNEXE



Laboratoire de Chimie, Biochimie, Biologie et Biologie Moléculaire

Chef de service

Pr. Layachi CHABRAOUI

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE

Equipe enseignante

Professeurs

Pr. Lhoucin BALOUCH

Pr. Youssef BAMOU

Pr. Sanae BOUHSAIN

Pr. Abdellah DAMI

Pr. Ouafae KABBAJ

Pr. Zohra. OUZZIF

Pr. Ahlam RIDHA

Pr. Saïda TELLAL

Je soussigné (e) Mr(Mlle)
Né(e) le.....à
Originaire de

Par la présente, donne mon consentement à subir un prélèvement sanguin.
La nature des études génétiques susceptibles d'être pratiquées sur ce
prélèvement m'a été bien expliquée par le Professeur Layachi CHABRAOUI
J'accepte que ce prélèvement soit conservé au laboratoire selon les
exigences légales et que les résultats des analyses et toutes les
informations me concernant soient utilisés en respectant le secret médical.

Fait à.....

Le

Signature de l'étudiant

Professeurs Assistants

Dr. Laila BENCHEKROUN

Dr. Mounya BOUABDELLAH

Dr. Samira EL MACHTANI

Dr. Jamila ELJASTIMI

Dr. Chadia OUZZANI

Je confirme avoir expliqué la nature des études génétiques qui seront
réalisées sur le prélèvement sanguin de la personne pré-signataire de ce
formulaire de consentement général.

Dr

Assistante

Dr Laila BENNAGHMOUCH

Date

Signature

RESUMES

RESUME

Titre : Mise en évidence de la mutation P533R et étude du polymorphisme de l'intron 2 du gène de l'Iduronidase.

Auteur : Rajae AGNAOU.

Mots- Clés : MPS I, Hurler, P533R, RFLP, ARMS.

Introduction : La mucopolysaccharidose de type I (maladie de Hurler) est une maladie de surcharge lysosomale due au déficit de l'alpha-L-iduronidase. Notre travail a pour objectif l'étude du polymorphisme de taille au niveau de l'intron 2 et la mise au point d'une technique de recherche de la mutation P533R la plus fréquente dans la population Marocaine.

Matériel et Méthodes : Pour l'étude du polymorphisme nous avons réalisé une amplification de la région variable puis une électrophorèse du ou des fragments amplifié(s). Pour la recherche de la mutation P533R nous avons mis au point 2 techniques : une technique RFLP utilisant l'enzyme de restriction Hpy99I et une technique ARMS qui nécessite la réalisation d'une PCR suivie d'une électrophorèse des produits obtenus en utilisant 2 amorces, une spécifique de l'allèle normal et l'autre spécifique de l'allèle muté.

Résultats : l'étude du polymorphisme montre une prédominance de l'allèle M chez la population normale. Les deux techniques ont donné des résultats permettant de mettre en évidence la présence ou l'absence de la mutation et peuvent être utilisées pour identifier les malades homozygotes et de les distinguer des porteurs hétérozygotes et des sujets normaux.

Discussion et conclusion : Notre étude a montré qu'il y a une différence entre les patients Hurler et les sujets normaux concernant le polymorphisme de taille de l'intron 2. Les techniques que nous avons mises au point permettent d'identifier avec certitude la mutation P533R. Nos résultats montrent que les 2 techniques pourraient être utilisées en première intention avant le séquençage lors du diagnostic moléculaire chez les patients Hurler ainsi que dans le cadre des études familiales.

Abstract:

Title: Detection of the P533R mutation and polymorphism study of intron 2 in the Iduronidase gene.

Author: Rajae Agnaou.

Keywords: MPS I, Hurler, length polymorphism, P533R, RFLP, ARMS.

Introduction: The mucopolysaccharidose type I (Hurler's disease) is a lysosomal storage disease caused by a deficiency of alpha-L-iduronidase. Our work aims to study the length polymorphism found at the intron 2 of the iduronidase gene and to develop a research technique of the most common P533R mutation in the Moroccan population.

Material and Methods: For the study of the polymorphism we performed a PCR amplification of the variable region and electrophoretic separation of amplified fragments. To search for the P533R mutation we developed two techniques: an RFLP technique using a restriction enzyme Hpy99I and an ARMS technique comprising a PCRs with two primers, one specific of the normal allele and the other specific of the mutated allele, followed by electrophoretic separation of the PCR products.

Results: the study of polymorphism shows a predominance of the M allele in the normal population. Both techniques yielded significant results that highlight the presence or the absence of the mutation. They can be effectively used to identify homozygous patients and heterozygous carriers and distinguish them from normal subjects.

Discussion and Conclusion: Our study showed that there is a significant difference between the Hurler patients and normal subjects in the length polymorphism in intron 2 of the iduronidase. The two techniques we have developed can identify the P533R mutation in the IDUA gene. Our result show that each of the two techniques could be used before sequencing in molecular diagnostics in Hurler patients and also be used in family studies when an index case was diagnosed.

ملخص

العنوان: الكشف عن الطفرة P533 و دراسة تعدد الأشكال في إنترون 2 في مورثة الإيدورونيداز

الكاتب: رجاء أكتاو

كلمات البحث: هيرلر،تعدد الأشكال الطول، RFLP, P533R

مقدمة

متلازمة هيرلر هو مرض تخزين الليزوزومي ناجم عن نقص في ألفا الإيدورونيداز. هدف بحثنا هو دراسة تعدد الأشكال في حجم إنترون 2 و وضع طريقة للكشف عن الطفرة P533R

المرضى و الطرق

لدراسة تعدد الأشكال في حجم الإنترون 2 أجرينا تضخيم ثم هضم من طرف أنزيم محدد من جهة ثم قمنا بتضخيم جزء من المورثة المراد دراستها من جهة أخرى و ذلك باستعمال بدايات مختلفة

النتائج

أظهرت الدراسة تعدد الأشكال غلبة الحليل M أما بنسبة لطريقتي البحث عن الطفرة P533R فقد أعطت كلتاهما نتائج جيدة قادرة على التأكيد ما إذا كانت لطفرة موجودة أو غائبة

المناقشة و الإستنتاج

معرفة خصائص تعدد الأشكال في جميع أنحاء الجين و كذا الطفرة التي تؤدي إلى متلازمة هيرلر ستمكن من فهم أفضل للمظاهر السريرية و تكيف العلاجات نحو الأفضل
نتائجنا تظهر أن التقنيات التي وضعنا يمكن أن تستخدم قبل دراسة تسلسل الجين بأكمله بنسبة لمرضى هيرلر. و يمكن أيضا أن تستخدم هذه التقنية كجزء من الدراسات الأسرية عندما يتم تشخيص حالة مرضية في الوسط العائلي

Références

Bibliographiques

- [1] **B. Imessaoudene, S. Hallal, M. A. Ghouali, A. Berhoune.** La maladie de Hurler : à propos de 30 cas Revue Francophone Des Laboratoires novembre 2001 ; 436:73-76.
- [2] **Scott HS, Ashton LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF, Sutherland GR, Morris CP, Hopwood JJ.** Chromosomal Localization of the Human α -L-iduronidase Gene (IDUA) to 4p16.3. Am. J. Hum. Genet. 47:802-807, 1990
- [3] **N. Alif et al.** Mucopolysaccharidose de type I au Maroc : manifestation clinique et profil génétique. Archive pédiatrique 2000 ; 7 : 567-604
- [4] **Scott S. et al .** Mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome): linkage disequilibrium indicates the presence of a major allele ; Hum Genet 1992 88:701-70
- [5] <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>.
- [6] **F. Trivin , T. Le Bricon .** Nouvelles techniques d'électrophorèse : applications aux protéines et à l'ADN ; Immuno-analyse & Biologie spécialisée 18 (2003) 11–22
- [7] **M. Bwanga Kumabwena.** Etude moléculaire de la PCU : Recherche de la Mutation p.G352fsdelG par RFLP. Thèse en pharmacie Rabat.
- [8] **A. Hardjasa, M. Ling, K. Ma, H. Yu.** Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method ; Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI) 2010 ; 14: 161-164
- [9] <https://www.neb.com/products/r0615-hpy99i>

- [10] **F. DENOEUDE**. Analyse des génomes à la recherche de répétitions en tandem polymorphes : outils d'épidémiologie bactérienne et locus hypermutables humains. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences de l'université paris XI Orsay.(2003)
- [11] **A. R Wyman, R. White**. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, **77**: 6754-6758.
- [12] **A.J. Jeffreys, V.Wilson, S.L. Thein**. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 1985,**316**: 76–79.
- [13] <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IDUA>
- [14] **D.P.Germain, C.Boucly, R.Y. Carlier et al** . La thérapie enzymatiques substitutive des maladie lysosomales. *La revue de Medecine interne* 2010 ; 31:279-291.
- [15] **L. Chkioua, S. Khedhiri et al**. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis type I in Tunisia: identification of novel mutation and eight Novel polymorphisms ; *Diagn Pathol* 2011 ;
- [16] **N Guffon**. La mucopolysaccharidose type 1 (MPS I) : présentation clinique et traitement actuel. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2003 ; 6(2) 91-97
- [17] **B. Héron-Longé** . Les mucopolysaccharidoses : diagnostic et traitements ; *La revue de médecine interne* 2007 ; 28: 294-295.
- [18] **Scott HS et al**. Alpha-L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associate with a severe Hurler phenotype. *Hum Muta*. 1992;1(4):333-9.

- [19] **E. Boussof** . La mucopolysaccharidose de type I : A propos de 10 cas., thèse en médecine Rabat, N° : 1702012.
- [20] **S.Wold, C.Derkay, D. Darrow, V. Proud** . Role of the pediatric otolaryngologist in diagnosis and management of children with mucopolysaccharidoses. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2010 ; 74 : 27-31
- [21] **Mouti O.** Les manifestations neurologiques des mucopolysaccharidoses (revue de la littérature). Thèse de médecine Rabat. 1997 ; 87
- [22] **E.Lala-Gitteau, S. Majzoub, F.Labarthe, S. Blesson, P.-J. Pisella.** Un point d'appel ophtalmologique à l'origine du diagnostic de deux cas de mucopolysaccharidose . Journal français d'ophtalmologie. 2007 ; 30(2) 165-169.
- [23] **J. Ashworth, S.Wraith, L.Lloyd** **Mucopolysaccharidoses and the eye.** Surv ophtalmo, 2006 ;51 :1-17
- [24] **R.Walker, M. Darowski, P. Morris, J. Wraith.** Anaesthesia and mucopolysaccharidoses. A review of airway problems in children. Anaesthesia 1994 ; 49(12) : 1078-1084
- [25] **G. Chalès, G. Coiffier , P. Guggenbuhl** . Manifestations ostéoarticulaires des mucopolysaccharidoses et des glyco-génoses. Revue du rhumatisme monographies. 78 (2011) 254–261
- [26] **S. Scheidecker, M. Vodoff-Oehler, L. Issa-Brunet, M.-F. Peralta** . Retard psychomoteur révélateur d'une mucopolysaccharidose de type I chez un enfant suivi pour mucoviscidose : à propos d'un cas. Archives de Pédiatrie 2011;18:1324-1326.

- [27] **V. Dahl, S. Mengel et al.** Lysosomal storage diseases as differential diagnosis of hepatosplenomegalie. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterologie*. 2010 ; 25 : 619-628.
- [28] **R. Y. Wang , K. Covault , E. M. Halcrow , A. J. Gardner d, X. Cao ,R. L. Newcomb , R. D. Dauben , A. C. Chang.** Carotid intima-media thickness is increased in patients with mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism* 2011 ; 104 : 592–596.
- [29] **M. Muhlebach, W. Wooten, J. Muenzer.** Respiratory manifestations in Mucopolysaccharidose. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2011 ; 12 :133-138.
- [30] **M. Maier-Redelsperger , O. Fenneteau.** Aspect cytologique des maladies de surcharge lysosomale. *Revue francaise des laboratoires*. 1998 ; 303 :31-35
- [31] **O. Fenneteau, M.-F. Hurtaud-Roux, N. Schlegel.** Aspect cytologique normal et pathologique du sang chez le nouveau-né et le jeune enfant. *Annal Biologie Clinique* 2006 ; 64 (1) : 17-36
- [32] **L. Chkioua & all ;** La mucopolysaccharidose de type I : stratégie diagnostique en Tunisie ; *Annal Biologie Clinique*. 2007 ; 65 (2) : 175-9
- [33] **L. Chabraoui, H. Talbaoui, C. Caillaud.** Épidémiologie des maladies de surcharge lysosomale au Maroc .poster.
- [34] **A. Maria Martins & all ;** Guidelines for the Management of Mucopolysaccharidosis Type I. *The Journal Of Pediatrics* Vol. 155, No. 4, Suppl. 2 ; S32-S46.

[35] **L.Chkioua et al.** La MPS I : identification des mutations du gène alpha-L-iduronidase dans les familles tuisiennes. *Archive de pédiatrie*. 2007 ;14 : 1183-1189

[36]**Scott et al.** alpha-L- iduronidase Mutations (Q70X and P533R) associate with a sever hurler phenotype. *Human mutation*. 1992 ; 1 :333-339 .

[37] **N.J. Terlato, G.F. Cox** . Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genetics in Medicine*. 2003; 5(4):286-94.

[38] **Alif N, Hess K, Straczek J, Sebbar S, N'Bou A, Nabet P, Dousset B.** Mucopolysaccharidosis type I: characterization of a common mutation that causes Hurler syndrome in Moroccan subjects. *Ann Hum Genet*. 1999 Jan; 63(Pt 1):9-16

[39] **G. Jung, M. Pabst, L. Neumann, A. Berger, G. Iubec** . Characterization of α -L-Iduronidase (Aldurazyme®) and its complexes ; *journal of proteomics* 2013 ; 80 : 26 – 33.

[40] **D.P. Germain , C. Boucly , R.Y. Carlier** . Thérapies enzymatique substitutives des maladies lysosomales. *La revue de médecine interne*. 2010 ;31(2) :279-291

[41]www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm080438.htm

[42] **C. Dupont, C. El Hachem, S. harchaoui, et all.** Mucopolysaccharidose de type I : intérêt d'un diagnostic et d'une enzymothérapie substitutive précoces. Archives de pédiatrie. 2008 ; 15 :45-49

[43] **Kakavanos R., Turner CT, Hopwood JJ et all.** Immune tolerance after long term enzyme-replacement therapy among patients who have mucopolysaccharidosis I. Lancet. 2003 ; 361 :1608-1613

[44] **V. K. Prasad , J. kurtzberg.** Transplant outcomes in mucopolysaccharidosis. Seminars in Hematology . 2010 ;47(1) : 59-69.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à législation en vigueur aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- De ne pas dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيما لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفيع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو احتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

" والله على ما أقول شهيد "

جامعة محمد الخامس - السويسي
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 73

سنة: 2013

الكشف عن الطفرة P533R و دراسة تعدد الأشكال في إنترون 2 في مورثة الإيدورونيدياز

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم:

من طرف

السيدة: رجاء أكناو

المزادة في 15 فبراير 1989 بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: هيرلر، تعدد الأشكال، P533R, RFLP, ARMS

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرف

أعضاء

السيد : محمد خطاب

أستاذ في طب الأطفال

السيد: لعياشي الشبراوي

أستاذ في الكيمياء الإحيائية

السيدة: يامنة كريول

أستاذة في طب الأطفال

السيدة: سناء بوحساين

أستاذة في الكيمياء الإحيائية

السيدة: نعيمة العلمي

أستاذة في الكيمياء الإحيائية