



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE
PHARMACIE
RABAT



Année : 2019

Thèse N° : 24

MISE EN PLACE D'UN WORKFLOW POUR
L'ÉTUDE PHARMACOGÉNÉTIQUE DES
ANTIVITAMINES K

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mme NAHM-TCHOUGLI Christiana Philippa Linanipo

Née le 03 Mai 1992 à Lomé

Pour l'Obtention du Diplôme de

DOCTEUR EN PHARMACIE

Mots clés : Pharmacogénétique, PCR-RFLP, Antivitamines K, SNP, Optimisation.

Membres du Jury :

Mme N. MESSAOUDI

Professeur d'Hématologie Biologique

PRESIDENTE

Mr A. IBRAHIMI

Professeur de Biotechnologie médicale

RAPPORTEUR

Mme N. EL HAFIDI

Professeur de Pédiatrie

Mr Z. LAKHAL

Professeur de Cardiologie

Mr Y. BOUSLIMAN

Professeur de Toxicologie

JUGES



UNIVERSITE MOHAMMED V
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

ADMINISTRATION :

Doyen

Professeur Mohamed ADNAOUI

Vice-Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes

Professeur Brahim LEKEHAL

Vice-Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération

Professeur Toufiq DAKKA

Vice-Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie

Professeur Jamal TAOUFIK

Secrétaire Général

Mr. Mohamed KARRA

1 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne - Clinique Royale
Anesthésie - Réanimation
Pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes

Pathologie Chirurgicale

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYA OUI Mohamed

Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1989

Pr. ADN AOUI Mohamed
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne - Doyen de la FMPR
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine-Interne
Gynécologie - Obstétrique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOU DA Yahia
Pr. BERRAHO Armina
Pr. BEZAD Rachid
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anesthésie Réanimation- Doyen de FMPO
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique Méd. Chef Maternité des Orangers
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie- Dir. du Centre National PV Rabat
Chimie thérapeutique V.D à la pharmacie+Dir. du CEDOC:
Directeur du Médicament

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOU DA Adil
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. EL OUAHABI Abdessamad

Chirurgie Générale Doyen de FMPT
Anesthésie Réanimation
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie

Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan

Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques *Doyen de la FMPA*
Gynécologie Obstétrique
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale - *Directeur du CHIS-Rabat*
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Dermatologie
Chirurgie Générale
Traumatologie - Orthopédie
Gynécologie - Obstétrique
Dermatologie

Urologie *Directeur Hôpital My Ismail Meknès*
Chirurgie - Pédiatrique
Pédiatrie
Gynécologie - Obstétrique
Traumatologie - Orthopédie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie *Inspecteur du Service de Santé des FAR*
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale

Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Pédiatrie
Radiologie
Néphrologie
Cardiologie *Directeur Hôp.Mil. d'Instruction Med V Rabat*

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie *Directeur Hôp.Ar-razi Salé*
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*

Neurologie *Doyen de la FMP Abulcassis*
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUAMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNIAI Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie *Directeur Hôp. My Youssef*
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie - *Directeur Hôp.Cheikh Zaid*
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pédiatrie
Neurologie

Décembre 2000

Pr.ZOHAIR ABDELLAH *

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUCHEANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
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. SABBAAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

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. BICHAH Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL Fellous Sidi Zouhair

ORL

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie - *Directeur Hôp. d'Enfants Rabat*
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie - *Directeur Hôpital Ibn Sina*
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

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

Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 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*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 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. JABOURIK Fatima
 Pr. KHARMAZ Mohamed
 Pr. MOUGHIL Said
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre *
 Pr. TARIB Abdelilah*
 Pr. TIJAMI Fouad
 Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
 Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 Pr. ALLALI Fadoua
 Pr. AMAZOUZI Abdellah
 Pr. AZIZ Noureddine*
 Pr. BAHIRI Rachid
 Pr. BARKAT Amina
 Pr. BENYASS Aatif
 Pr. DOUDOUH Abderrahim*

Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumo-phtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Rhumatologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie *Directeur Hôp. Al Avachi Salé*
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Biophysique

Pr. EL HAMZAOUI Sakina *
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

AVRIL 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
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

Décembre 2006

Pr SAIR Khalid

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
Pr. AMHAJJI Larbi *
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed *
Pr. BALOUCH Lhousaine *

Microbiologie
Cardiologie (*mise en disponibilité*)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio - Vasculaire.
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie - Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo - Phtisiologie
Biochimie
Pneumo - Phtisiologie

Chirurgie générale *Dir. Hôp.Av.Marrakech*

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation *Directeur ERSSM*
Biochimie-chimie

Pr. BENZIANE Hamid *
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHERKAOUI Naoual *
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 Pr. EL BEKKALI Youssef *
 Pr. EL ABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 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. 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

Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie cardio-vasculaire
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologie biologique
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie-orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Décembre 2008

Pr TAHIRI My El Hassan*

Chirurgie Générale

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali *
 Pr. AGADR Aomar *
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
 Pr. AIT BENHADDOU El Hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. BELYAMANI Lahcen *
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae *

Médecine interne
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie *Directeur Hôp.des Spécialités*
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie

Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. BOUNAIM Ahmed *
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
 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. KARBOUBI Lamya
 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 *

Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie-orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-Phthisiologie

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 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
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Decembre 2010

Pr.ZNATI Kaoutar

Anesthésie réanimation
 Médecine Interne
 Physiologie
 Microbiologie
 Médecine Aéronautique
 Biochimie- Chimie
 Radiologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Plastique et Réparatrice
 Urologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Hématologie
 Anatomie Pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed

Anatomie Pathologique

Chirurgie pédiatrique

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

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

* Enseignants Militaires

Février 2013

Pr. AHID Samir
 Pr. AIT EL CADI Mina
 Pr. AMRANI HANCHI Laila
 Pr. AMOR Mourad
 Pr. AWAB Almahdi
 Pr. BELAYACHI Jihane
 Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
 Pr. BENCHEKROUN Laila
 Pr. BENKIRANE Souad
 Pr. BENNANA Ahmed*
 Pr. BENSCHIR Mustapha *
 Pr. BENYAHIA Mohammed *
 Pr. BOUATIA Mustapha
 Pr. BOUABID Ahmed Salim*
 Pr. BOUTARBOUCH Mahjoub
 Pr. CHAIB Ali *
 Pr. DENDANE Tarek
 Pr. DINI Nouzha *
 Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
 Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
 Pr. EL FATEMI NIZARE
 Pr. EL GUERROUJ Hasnae
 Pr. EL HARTI Jaouad
 Pr. EL JAOUDI Rachid *
 Pr. EL KABABRI Maria
 Pr. EL KHANNOUSSI Basma
 Pr. EL KHLLOUFI Samir
 Pr. EL KORAICHI Alae
 Pr. EN-NOUALI Hassane *
 Pr. ERRGUIG Laila
 Pr. FIKRI Meryem
 Pr. GHFIR Imade
 Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed *

Pharmacologie
 Toxicologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Réanimation Médicale
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie-Chimie
 Hématologie
 Informatique Pharmaceutique
 Anesthésie Réanimation
 Néphrologie
 Chimie Analytique et Bromatologie
 Traumatologie orthopédie
 Anatomie
 Cardiologie
 Réanimation Médicale
 Pédiatrie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Neuro-chirurgie
 Médecine Nucléaire
 Chimie Thérapeutique
 Toxicologie
 Pédiatrie
 Anatomie Pathologique
 Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Physiologie
 Radiologie
 Médecine Nucléaire
 Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie

Pr.LATIB Rachida
 Pr.MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr.MEDDAH Bouchra
 Pr.MELHAOUI Adyl
 Pr.MRABTI Hind
 Pr.NEJJARI Rachid
 Pr.OUBEJJA Houda
 Pr.OUKABLI Mohamed *
 Pr.RAHALI Younes
 Pr.RATBI Ilham
 Pr.RAHMANI Mounia
 Pr.REDA Karim *
 Pr.REGRAGUI Wafa
 Pr.RKAIN Hanan
 Pr.ROSTOM Samira
 Pr.ROUAS Lamiaa
 Pr.ROUIBAA Fedoua *
 Pr.SALIHOUN Mouna
 Pr.SAYAH Rochde
 Pr.SEDDIK Hassan *
 Pr.ZERHOUNI Hicham
 Pr.ZINE Ali *

AVRIL 2013

Pr.EL KHATIB MOHAMED KARIM *

MAI 2013

Pr.BOUSLIMAN Yassir

MARS 2014

Pr. ACHIR Abdellah
 Pr.BENCHAKROUN Mohammed *
 Pr.BOUCHIKH Mohammed
 Pr. EL KABBAJ Driss *
 Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira *
 Pr. HARDIZI Houyam
 Pr. HASSANI Amale *
 Pr. HERRAK Laila
 Pr. JANANE Abdellah *
 Pr. JEAIDI Anass *
 Pr. KOUACH Jaouad*
 Pr. LEMNOUER Abdelhay*
 Pr. MAKRAM Sanaa *
 Pr. OULAHYANE Rachid*
 Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar
 Pr. SABRY Mohamed*
 Pr. SEKKACH Youssef*
 Pr. TAZI MOUKHA Zakia

AVRIL 2014

Pr.ZALAGH Mohammed

Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

Toxicologie

Chirurgie Thoracique
 Traumatologie- Orthopédie
 Chirurgie Thoracique
 Néphrologie
 Biochimie-Chimie
 Histologie- Embryologie-Cytogénétique
 Pédiatrie
 Pneumologie
 Urologie
 Hématologie Biologique
 Gynecologie-Obstétrique
 Microbiologie
 Pharmacologie
 Chirurgie Pédiatrique
 CCV
 Cardiologie
 Médecine Interne
 Gynecologie-Obstétrique

ORL

PROFESSEURS AGREGES :

DECEMBRE 2014

Pr. ABILKASSEM Rachid*
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila
Pr. BEKKALI Hicham *
Pr. BENZAOU Salma
Pr. BOUABDELLAH Mounya
Pr. BOUCHRIK Mourad*
Pr. DERRAJI Soufiane*
Pr. DOBLALI Taoufik*
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim*
Pr. EL MARJANY Mohammed*
Pr. FEJJAL Nawfal
Pr. JAHIDI Mohamed*
Pr. LAKHAL Zouhair*
Pr. OUDGHIRI NEZHA
Pr. RAMI Mohamed
Pr. SABIR Maria
Pr. SBAI IDRISSE Karim*

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

AOÛT 2015

Pr. MEZIANE Meryem
Pr. TAHRI Latifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

Pr. BENKABBOU Amine
Pr. EL ASRI Fouad*
Pr. ERRAMI Noureddine*
Pr. NITASSI Sophia

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

JUIN 2017

Pr. ABI Rachid*
Pr. ASFALOU Ilyasse*
Pr. BOUAYTI El Arbi*
Pr. BOUTAYEB Saber
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim
Pr. OURAINI Saloua*
Pr. RAZINE Rachid
Pr. ZRARA Abdelhamid*

Microbiologie
Cardiologie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Oncologie Médicale
Oncologie Médicale
O.R.L
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Immunologie

* Enseignants Militaires

2 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS SCIENTIFIQUES


PROFESSEURS/Prs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie-chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naima	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie-chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

Mise à jour le 10/10/2018
Khaled Abdellah
Chef du Service des Ressources Humaines

Remerciements





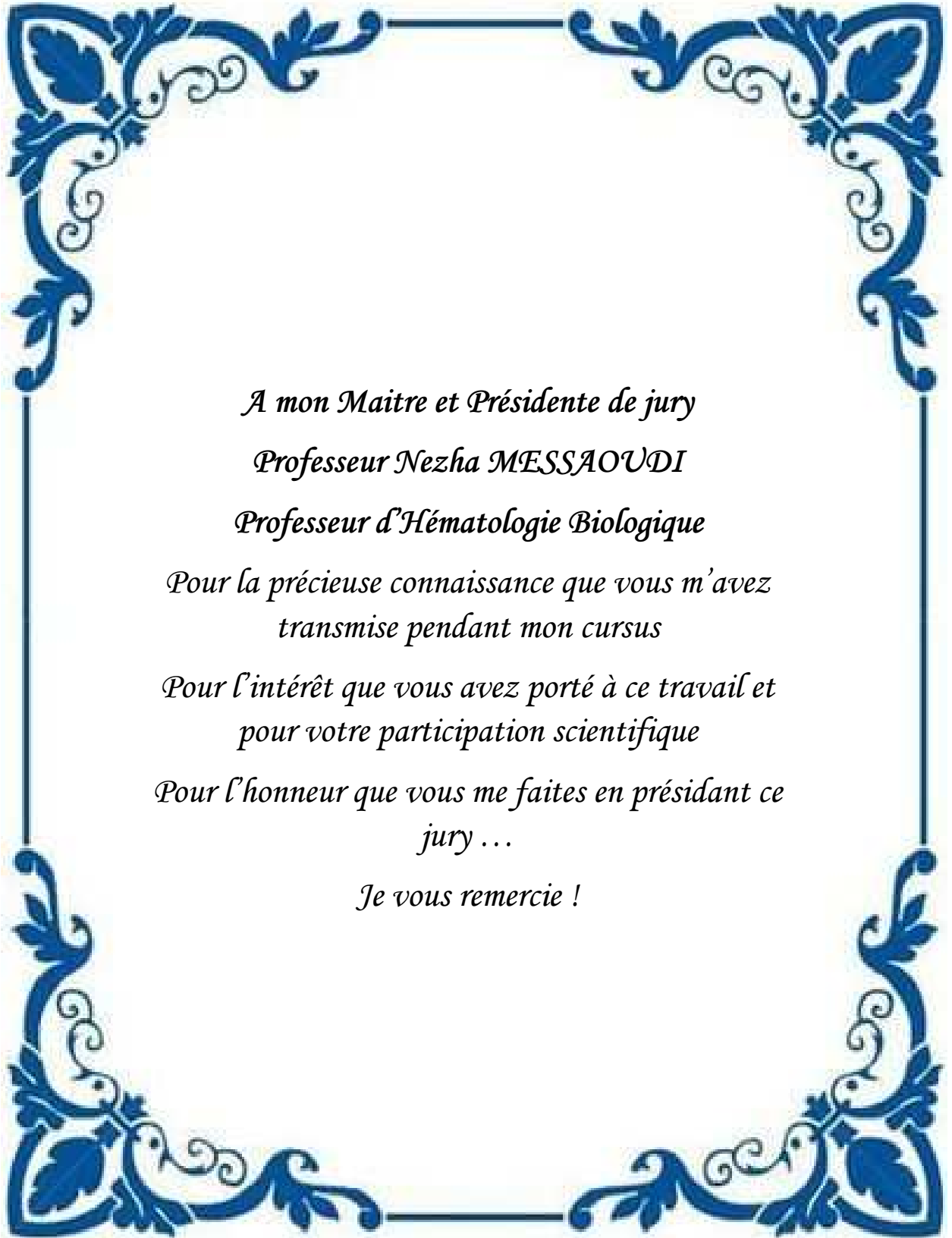
*A Celui qui m'a donné vie en Jésus Christ
Qui a tracé pour moi ce parcours afin que je
puisse être instruite dans sa grâce dans la course
vers la perfection*

*A Celui qui m'aime au-delà de ce que je peux
imaginer et qui m'aimera toujours*

Au Dieu Fort et Grand

Souverain dans tout ce qu'il accomplit

Au Dieu Eternel !



A mon Maître et Présidente de jury

Professeur Nezha MESSAOUDI

Professeur d'Hématologie Biologique

*Pour la précieuse connaissance que vous m'avez
transmise pendant mon cursus*

*Pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et
pour votre participation scientifique*

*Pour l'honneur que vous me faites en présidant ce
jury ...*

Je vous remercie !



A mon Maître et Directeur de thèse

Professeur Azeddine IBRAHIMI

Professeur de Biotechnologie Médicale

Je vous remercie grandement pour toute votre aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie car outre votre appui scientifique, vous avez toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos encouragements et votre confiance.

A decorative blue floral border with intricate scrollwork and leaf patterns, framing the central text.

A mon maitre et Juge de thèse

Professeur Naima EL HAFIDI

Professeur de Pédiatrie

*Je vous remercie pour l'honneur que vous me
faites en acceptant de juger de cet humble
travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma
profonde gratitude.*



A mon maitre et Juge de thèse

Professeur Zouhair LAKHAL

Professeur de cardiologie

*Veillez trouver ici l'expression de ma
gratitude pour avoir accepté examiner et
juger ce travail.*

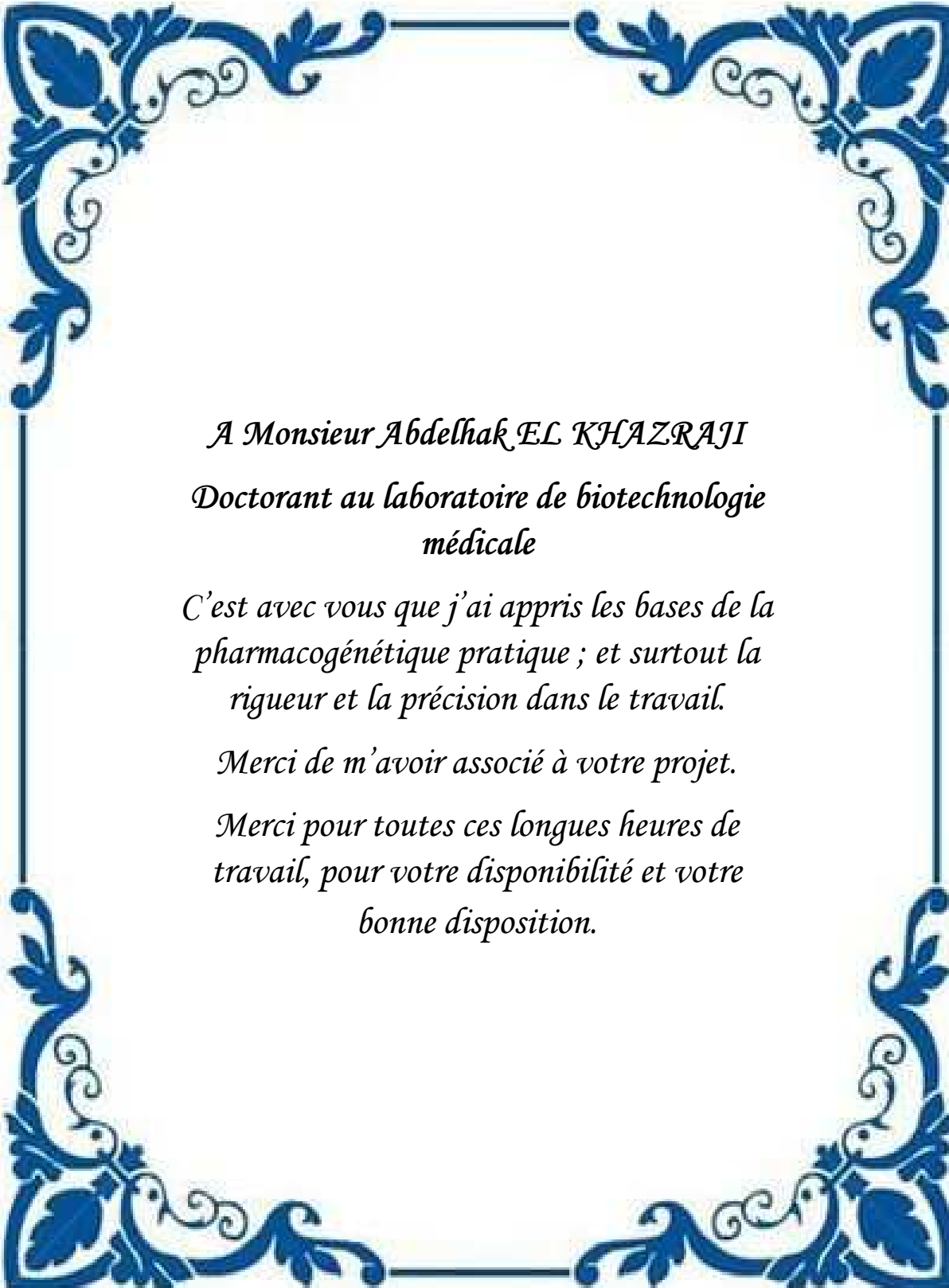


A mon maitre et Juge de thèse

Professeur Yassir BOUSLIMAN

Professeur de toxicologie

*Veillez retrouver ici cher professeur ma
gratitude pour tout le temps de formation passé
avec vous ; et pour avoir accepté de juger de ce
travail.*



*A Monsieur Abdelhak EL KHAZRAJI
Doctorant au laboratoire de biotechnologie
médicale*

*C'est avec vous que j'ai appris les bases de la
pharmacogénétique pratique ; et surtout la
rigueur et la précision dans le travail.*

Merci de m'avoir associé à votre projet.

*Merci pour toutes ces longues heures de
travail, pour votre disponibilité et votre
bonne disposition.*

Dédicaces





Je dédie cette thèse,

A mes grands parents

A mes parents Jean de la croix et Caroline, Claude et Rosette

En signe de reconnaissance pour votre amour, vos nombreux sacrifices et de ce que vous me portez toujours dans vos cœurs.

A mon cher et tendre époux Gethro BORGELYN

Que tu puisses y trouver l'expression de mon amour et toute ma reconnaissance pour ton soutien indéfectible

A ma fille Dorothée Rhoseth

Ceci est une modeste façon pour maman de te dire « je t'aime »

A mon frère Jonathan,

Merci de toujours croire en moi

A mes sœurs Debora, Judith, Floraltana

Belles et braves vous êtes . . . je vous aime

A mes frères et sœurs dans la foi, au Maroc et partout dans le monde

Vous m'avez manifesté votre amour par vos prières incessantes et votre soutien. Mon combat a été le vôtre.

Soyez richement bénis dans le Seigneur et dans Sa grâce !

Que Dieu vous bénisse tous !



A toute ma promotion de pharmaciens

A mes tous mes amis et collègues internes et résidents en biologie médicale

A tous les membres de l'Association des Médecins et Pharmaciens étrangers de Rabat

A la belle équipe de Medbiotech

A toute la communauté des étudiants et stagiaires Togolais au Maroc

A ma nouvelle famille Haitienne au Maroc

A Christelle, Clémence, Kaoutar, Houda, Asma, Sanae, Ines, Sylvie, Hassane, Théodore...

Vous êtes si nombreux que toutes les pages de cette thèse ne suffiraient pour citer vos noms.

Vous avez tous été là pour moi. Vous m'avez motivé, supporté, encouragé.

Je vous remercie !

A tous les enseignants de la faculté de Médecine et de pharmacie de Rabat.

A cette chère et belle terre Marocaine et à tous ses habitants qui m'ont accueilli pour que je parvienne à cet objectif.

Que DIEU soit le rémunérateur de tous !

Liste des abréviations

A : Adénine
ADN ou DNA: Acide désoxyribonucléique
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
Ala: Alanine
Arg: Arginine
ARN : Acide ribonucléique
AT : Antithrombine
AVK : Antivitamines k
BET : Bromure d'éthidium
C : Cytosine
CYP2C9 : Cytochrome P450 isoenzyme 2C9
CYP450 : Cytochrome P450
CYP4F2 : Cytochrome P450 isoenzyme 4F2
Cys: Cystéine
dATP : desoxyadenosine triphosphate
dCTP :desoxycytidine triphosphate
dGTP :desoxyguanosine triphosphate
dNTP :desoxynucléotides triphosphate
dTTP :desoxythymidine triphosphate
EDTA : ethylene diamine tétra acétique
EMA : European Medicines Evaluation Agency
FDA : food and Drug Administration
FT : Facteur tissulaire
G : Guanine
Gly: Glycine
gpIIb/IX : Glycoprotéine IIb/IX
HapMap: Carte Haplotype
HAS : Haute Autorité de santé
Ile : Isoleucine
INR : International Normalized Ratio
ISI : Index de sensibilité internationale
K : la vitamine K sous forme quinone
KH2 : la vitamine K sous forme hydroquinone
KO : la vitamine K époxyde
Leu : Leucine
MgCl₂ : Chlorure de magnésium
NIH : institut national de la santé
OMS : Organisation mondiale de la santé
Pb : Paire de bases
PCAST : President's Council of Advisors on Science and Technology
PCR : Polymerase chain reaction

PG : Polymorphisme génétique

PGt: Pharmacogénétique

PGx: Pharmacogénomique

PPSB : Prothrombine, Proconvertine, facteur de Stuart, facteur antihémophilique B

RFLP : Restriction Fragment length Polymorphism

SNP : Single Nucléotide Polymorphism

T : Thymine

TAE : Tris Acetate EDTA

TBE : Tris Borate EDTA

TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor

Tm :Melting temperature (température d'hybridation)

TP : Taux de prothrombine

TQ : Temps de Quick

Val : Valine

VKORC1 : Vitamine K époxyde réductase la sous unité C1

VWF : Facteur Von Willebrand

Liste des figures

Figure 1: Taux de non réponse aux traitements selon différentes classes thérapeutiques.....	7
Figure 2: Nombre d'articles par année, entre 1999 et 2008 qui incluent le terme « médecine personnalisée » basée sur une recherche PubMed en Mars 2009.....	8
Figure 3: Domaines d'intervention courants des biomarqueurs.....	10
Figure 4: Des approches «omiques» à la médecine personnalisée en passant par les «big data».....	15
Figure 5 : Les différents types de variations génétiques [31].....	21
Figure 6: Schéma montrant les différentes étapes de l'hémostase	26
Figure 7 : Cascade de la coagulation et différents inhibiteurs physiologiques..	30
Figure 8: Phase d'initiation (concept actuel) [51].....	31
Figure 9: Phase d'amplification de la coagulation (concept actuel) [51].....	31
Figure 10 : Cycle de la vitamine K : rôle de VKORC1 et inhibition par les AVK.	36
Figure 11: Facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans la variabilité de la dose à l'équilibre chez le patient traité par les AVK.	44
Figure 12: présentation générale du NanoVue™ Spectrophotometer utilisé au laboratoire de biotechnologie de la FMPR.....	58
Figure 13: Structure et principe d'un spectrophotomètre mono faisceau.....	59
Figure 14: Tableau de commande du Nanovue	59
Figure 15: Présentation de l'écran d'accueil du Nanovue	60
Figure 16: Principe de la PCR. L'amplification en trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.....	62

Figure 17: Répartition du matériel et des réactifs par compartiment de la chaîne de l'amplification	63
Figure 18: Barrette à 8 microtubes pour PCR.....	66
Figure 19: Thermocycleur utilisé au Laboratoire de Biotechnologie médicale	68
Figure 20: Ecran de programmation des conditions de la PCR.....	68
Figure 21: Principe de la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)[100]	72
Figure 22: appareillage pour électrophorèse utilisé au laboratoire de Biotechnologie.....	76
Figure 23 : Marqueurs de taille d'ADN utilisés.....	79
Figure 24: présentation du Transilluminator slider LED imager utilisé au laboratoire de biotechnologie	82
Figure 25: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de VKORC1-1639G> A. Echantillons avec allèle G (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par MspI, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé.	87
Figure 26: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de VKORC1-1173 C> T. Echantillons avec allèle C (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par StyI, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé.	88
Figure 27: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de CYP2C9*2 (430 C> T). Echantillons avec allèle C (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par Ava II, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé	89
Figure 28: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de CYP2C9*2 (1075 A> C). Echantillons avec allèle A (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par Nsi I, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé.....	89

Figure 29: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de CYP4F2 (1347 G> A).
Echantillons avec allèle G (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées
par Pvu II, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé..... 90

Figure 30 : Gel d'agarose à 3% des résultats RFLP de GG CX (12970 C> G).
Echantillons avec allèle G (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées
par Hind III..... 91

Liste des tableaux

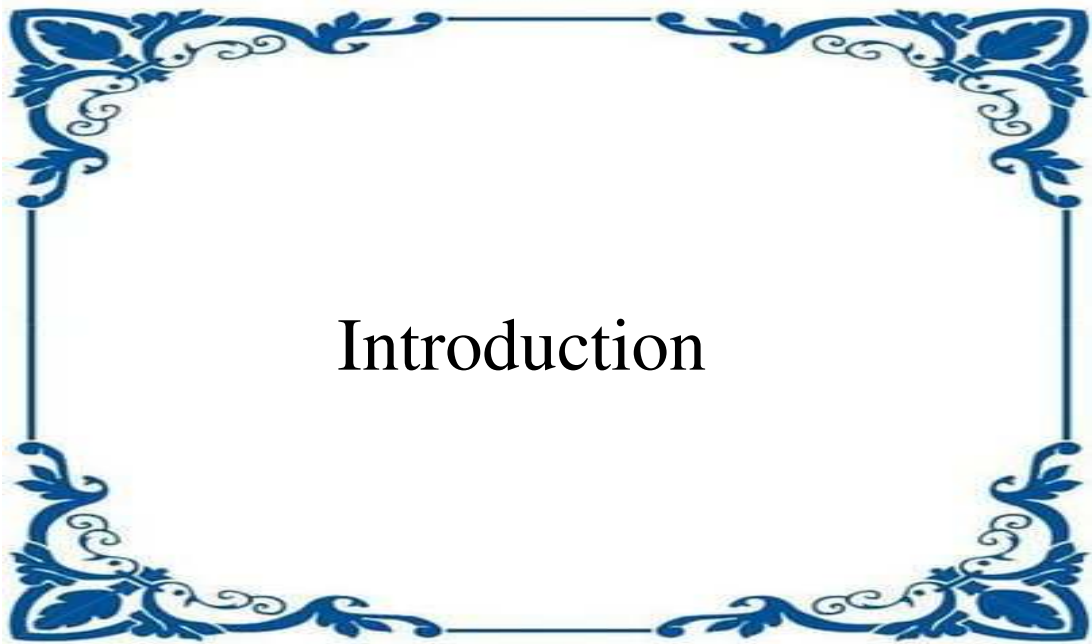
Tableau I: Différents CYP 450 exprimés et leurs fréquents SNP	24
Tableau II: Principaux facteurs de coagulation [47][52].....	29
Tableau III: Principales caractéristiques des inhibiteurs de la coagulation [47][52]	29
Tableau IV: Les AVK commercialisés	34
Tableau V: Les accidents hémorragiques sous AVK	38
Tableau VI: l'INR en fonction du type de prothèses et des caractéristiques du patient [71]	42
Tableau VII: Composition des milieux réactionnels pour la PCR à 50 µl, 25µl et 12.5µl	67
Tableau VIII: Les conditions d'exécution de la PCR	69
Tableau IX: Séquences d'amorces, enzymes de restriction utilisée et fragments d'ADN trouvés pour les variations des gènes VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 et GGCX	73
Tableau X: Mélanges pour restriction enzymatique	74
Tableau XI: Pourcentages du gel d'agarose préparé selon les tailles des fragments d'ADN amplifiés et digérés par restriction enzymatique.....	78
Tableau XII: Composition des échantillons d'ADN amplifié, d'ADN digéré par RFLP et marqueur de taille pour la migration électrophorétique	80
Tableau XIII: Résumé des conditions d'électrophorèse	81
Tableau XIV: Tableau des concentrations de l'ADN extrait par méthode au phénol/ chloroforme	85
Tableau XV: Concentrations de l'ADN extrait sur colonnes de résines échangeuses d'ions	86
Tableau XVI: Méthodes de lyse et de purification utilisées dans les techniques d'extraction de l'ADN.....	96
Tableau XVII: Sources et séquences reconnues des différentes enzymes de restriction utilisées.....	99
Tableau XVIII: Caractéristiques des différentes classes d'enzymes de restriction	100
Tableau XIX: Pourcentage recommandé des gels d'agarose pour la séparation de fragments d'ADN.....	104

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
Eléments de théorie	4
CHAPITRE I :	5
LA MEDECINE PERSONNALISEE ET LES BIOMARQUEURS	5
1. Définition	5
2. Les intérêts de la médecine personnalisée	6
3. Evolution et l'ampleur de la médecine personnalisée	8
4. Les fondements de la médecine personnalisée : les biomarqueurs	9
4.1. Définition.....	9
4.2. Objectifs des biomarqueurs	9
4.3. Les biomarqueurs génomiques	11
5. L'ère de la génomique et de la post-génomique	11
5.1. La génomique	11
5.2. La transcriptomique.....	12
5.3. La Protéomique	12
5.3. La Métabolomique	14
5.4. La bio-informatique : le traitement des données.	15
CHAPITRE II :	17
LA PHARMACOGENOMIQUE ET LA PHARMACOGENETIQUE	17
1. Historique	17
2. Définitions	18
3. Principes de la pharmacogénomique et de la pharmacogénétique	19
3.1. Bases moléculaires de la variabilité dans le génome.....	19
3.2. Les variations génétiques	20
3.3. Les polymorphismes à un seul nucléotide : SNP	22
3.4. Les polymorphismes génétiques et les enzymes de métabolisme des médicaments.....	22
3.5. Intérêt des polymorphismes.....	25
CHAPITRE III :	26
L'HEMOSTASE ET LES ANTIVITAMINES K	26
1. Rappels sur l'hémostase	26

2. Les antivitamines K	32
2.1. La pharmacocinétique	33
2.2. La pharmacodynamie	34
2.3. Les indications thérapeutiques	36
2.4. Les contre-indications	36
2.5. Les effets indésirables	37
3. La surveillance du traitement par les Antivitamines K	41
3.1. Le temps de Quick.....	41
3.2. L'International Normalized Ratio	41
4. Les facteurs influençant le traitement par les antivitamines K	43
4.1. L'influence des facteurs environnementaux.....	43
4.2. L'influence des facteurs génétiques	44
Partie expérimentale.....	49
I. Objectifs du travail	50
II. Matériel et méthodes	52
1. Ethique et consentement	52
2. Echantillons collectés	52
3. L'étude pharmacogénétique	52
3.1. L'extraction et la purification de l'ADN.....	52
3.2. Evaluation de la qualité de l'ADN génomique extrait	57
3.3. L'analyse des gènes impliqués dans la pharmacogénétique des AVK par PCR-RFLP (Polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism)	61
III. RESULTATS	85
1. Quantification de l'ADN génomique extrait	85
1.1. L'ADN extrait par la méthode au phénol/chloroforme	85
1.2. L'ADN extrait par la méthode utilisant des colonnes de résines échangeuses d'ions.....	86
2. Résultats de la PCR	87
3. Résultats de la restriction enzymatique des SNP impliqués dans la pharmacogénétique des AVK	87
3.1. Produits de la restriction enzymatique du SNP VKORC1 (1639 G>A) par le <i>Msp I</i>	87
3.2. Produits de restriction enzymatique du SNP VKORC1 (1173 C>T) par le <i>Sty I</i>	87
3.3. Produits de restriction enzymatique du SNP CYP2C9*2 (430 C>T) par <i>Ava II</i>	88

3.4.	Produits de restriction enzymatique du SNP CYP2C9*3 (1075 A>C) par <i>Nsi I</i>	89
3.5.	Produits de restriction enzymatique du SNP CYP4F2 (1347 G>A) par <i>PvuII</i>	90
3.6.	Produits de restriction enzymatique du SNP GG CX (12970 C>G) par <i>Hind III</i>	90
IV.	DISCUSSION	93
1.	L'échantillon	93
2.	Les méthodes d'études du polymorphisme génétique	93
2.1.	Les polymorphismes de taille de fragments de restriction ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	93
2.2.	PCR et séquençage	94
2.3.	Le pyroséquençage	94
2.4.	PCR et hybridation spécifique d'allèle.....	95
2.5.	Mesure du point de fusion par PCR en temps réel (rt-PCR)	95
2.6.	Extension d'amorce.....	95
3.	L'optimisation	96
3.1.	Définition et objectifs.....	96
3.2.	Optimisation de l'extraction de l'ADN	96
3.3.	L'optimisation de la RFLP	98
3.4.	Optimisation de l'électrophorèse.....	103
V.	CONCLUSION	107
	Annexes	113
	Bibliographie	125



Introduction

Dans la pratique médicale, la prise en charge du patient est l'objet de profonds changements. Partant d'une médecine réactive, nous sommes arrivés à une médecine qui se veut préventive. En effet, depuis quelques années, la prise en charge des patients on assiste à ce nouveau paradigme dans la prise en charge des patients impliquant ainsi un passage à la personnalisation de la médecine.

Cette médecine personnalisée connaît un gain d'intérêt en pratique médicale courante grâce à l'évolution des technologies génétiques qui permettent une meilleure connaissance et une meilleure exploration de la physiopathologie de nombreuses maladies.

Parallèlement à l'avancée technologique des analyses génomiques, on assiste à une baisse de leur coût et de leur temps de mise en œuvre. Il en ressort une augmentation exponentielle de publications scientifiques en pharmacogénétique ou pharmacogénomique traitant des facteurs génétiques déterminant la réponse aux xénobiotiques chez l'être humain.(1)

En effet, certains médicaments, bien que très bénéfiques, peuvent néanmoins présenter des effets secondaires non négligeables et être caractérisés par un index thérapeutique relativement étroit. Il est donc nécessaire de contrôler régulièrement leur concentration sanguine afin de rechercher le meilleur compromis entre une efficacité thérapeutique optimale et une toxicité réduite. (2)

Les antivitamines K (AVK), molécules largement utilisées en pratique clinique courante font partie de ces médicaments à marge thérapeutique étroite pouvant conduire à des accidents hémorragiques graves. Leur maniement est rendu délicat par l'existence d'une grande variabilité interindividuelle de la réponse au traitement. En dehors des facteurs cliniques, biologiques, et des interactions médicamenteuses, l'identification de certains facteurs, notamment génétiques sont à l'origine de cette variabilité.L'identification de ces facteurs permettra une meilleure utilisation des AVK avec plus de sécurité (3). Ce sont notamment des polymorphismes ponctuels de séquence ou SNP touchant les gènes du VKORC1, des cytochromes CYP2C9 et CYP4F2 et du GGCX.

L'analyse pharmacogénétique de ces polymorphismes a fait l'objet de plusieurs études de par le monde, dans le but de dresser le profil génétique de diverses populations. Elle nécessite une connaissance et une maîtrise des différentes techniques. C'est dans cette optique que s'inscrit notre étude. Notre objectif étant de mettre en place un processus d'étude des principaux

polymorphismes impliqués dans la pharmacogénétique des AVK pour la population marocaine en vue d'une prise en charge personnalisée des patients sous traitement par AVK.

Dans cette thèse, nous articulerons notre travail en deux parties.

En premier lieu, nous parlerons d'abord des technologies génétiques et de leurs apports dans la médecine personnalisée ; et ensuite de l'importance de la pharmacogénétique dans les traitements par AVK.

Une deuxième partie sera consacrée à l'étude expérimentale, où nous dressons le workflow de cette étude pharmacogénétique pour six polymorphismes impliqués : VKORC1-1639 G>A, VKORC1 1173 C>T, CYP2C9*2 430 C>T, CYP2C9*3 1075 A>C, CYP4F2 1347 G>A et GGCX 12970 C>G.



*Eléments de
théorie*

CHAPITRE I :

LA MEDECINE PERSONNALISEE ET LES BIOMARQUEURS

1. Définition

La médecine personnalisée est un concept de traitement innovant reposant sur l'utilisation d'informations génétiques ou moléculaires permettant de sélectionner la meilleure stratégie pour améliorer les résultats thérapeutiques, notamment en termes d'efficacité et de sécurité, et ce pour chaque patient ou groupe de patients partageant des caractéristiques biologiques similaires.

Elle peut se définir comme l'utilisation d'informations biologiques, génétiques et génomiques d'un patient pour lui proposer le traitement.

Le National Institute of Health la définit comme une pratique « émergente » de la médecine qui utilise le profil génétique des individus pour guider les décisions concernant la prévention et le traitement des maladies »(4)

Pour la Food and Drug Administration (FDA) américaine, il s'agit d'obtenir « les meilleurs résultats médicaux en choisissant les traitements qui correspondent au profil génomique du patient ou à certaines caractéristiques de ses protéines, circulantes ou localisées à la surface cellulaire »(5)

Le but est donc d'utiliser des informations biologiques, génétiques et génomiques d'un patient pour lui proposer le traitement et/ou le dosage médicamenteux les plus adaptés et le plus efficace.(6)

Sur ce point, Le President's Council of Advisors On Science and Technology (PCAST) en définissant la médecine personnalisée comme l'adaptation du traitement médical aux caractéristiques individuelles de chaque patient, précise que cela ne signifie pas littéralement la création de médicaments ou de dispositifs médicaux qui sont uniques pour un patient, mais plutôt la capacité de classer les individus dans des sous-populations qui diffèrent dans leur susceptibilité à une maladie particulière ou par leur réponse à un traitement spécifique. (7)

Elle permet ainsi de classer les patients individuels en sous-populations les plus homogènes possibles des points de vue de leur susceptibilité au développement d'une maladie, du

comportement évolutif et/ou de la réponse thérapeutique (efficacité, tolérance). Cette segmentation, basée sur des critères moléculaires, doit permettre d'optimiser l'intérêt d'une intervention préventive, diagnostique ou thérapeutique spécifique dans un sous-groupe donné, le plus apte à en bénéficier.

L'objectif ultime de la médecine personnalisée ne serait pas seulement de traiter la pathologie mais d'augmenter la santé globale de l'individu. C'est le concept de la « Médecine P4 » tel que défini par Leroy Hood en 2008. La médecine devient alors « prédictive », « personnalisée », « préventive », et « participative » d'où le terme P4.(8)

- **Prédictive** : Prédictive du risque, de la réponse ou des réactions au traitement
- **Personnalisée** : chaque personne est génétiquement unique et doit être considérée comme un individu unique
- **Préventive** : Intervention précoce pour prévenir la survenue d'une maladie
- **Participative** : Implication du patient et de sa communauté et de l'équipe de soins cliniques dans les décisions de prévention ou de traitement

Elle fait appel à l'identification et l'utilisation d'un ou de plusieurs biomarqueurs.

Un biomarqueur est défini comme un paramètre mesurable, fiable et précis, indicateur d'un processus biologique normal ou pathologique ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. Il peut s'agir ici de mesures moléculaires (ADN, ARN et/ou protéines) ou cellulaires au sein de fluides biologiques (sérum, plasma, sang ou urines) ou de tissus, voire de mesures radiologiques morphologiques ou fonctionnelles.

2. Les intérêts de la médecine personnalisée

Le principe de la médecine personnalisée a été développé suite aux nombreuses découvertes récentes dans le domaine de la génétique, de la pharmacogénétique et de la pharmacogénomique. De plus, l'augmentation du coût de production des médicaments récents (principalement des anticancéreux), la diminution des mises sur le marché de nouveaux médicaments et la recherche constante d'une réduction des effets secondaires sévères, qui sont de plus en plus présents et coûteux, ont poussé les industriels et les instances réglementaires, tout comme les gouvernements, à soutenir les principes de la médecine personnalisée.

En effet, en 2000, sur 1232 entités chimiques approuvées comme médicaments aux Etats-Unis, 16 % sont associées avec des effets secondaires suffisamment sévères pour qu'une

mention soit ajoutée sur l'emballage du produit (9). Une autre étude a démontré que 1,8 million de personnes ont été hospitalisées pour des effets indésirables (excluant les échecs thérapeutiques, les empoisonnements et les toxicomanies) en 1994 aux Etats Unis, avec plus de 100 000 décès.

Ces effets indésirables provoquent un coût pour les hôpitaux pouvant aller de 1,58 à 4 milliards de dollars par an et sont classés entre la 4^{ème} et la 6^{ème} cause de décès aux Etats Unis(10). De plus, de nombreux traitements montrent une efficacité limitée.

L'illustration ci-dessous représente le pourcentage de personnes ne répondant pas aux traitements pour différentes classes thérapeutiques traitant des maladies chroniques(11). Le pourcentage de patients chez qui la thérapie médicamenteuse est inefficace reste très élevé (70 et 75 % d'inefficacité).

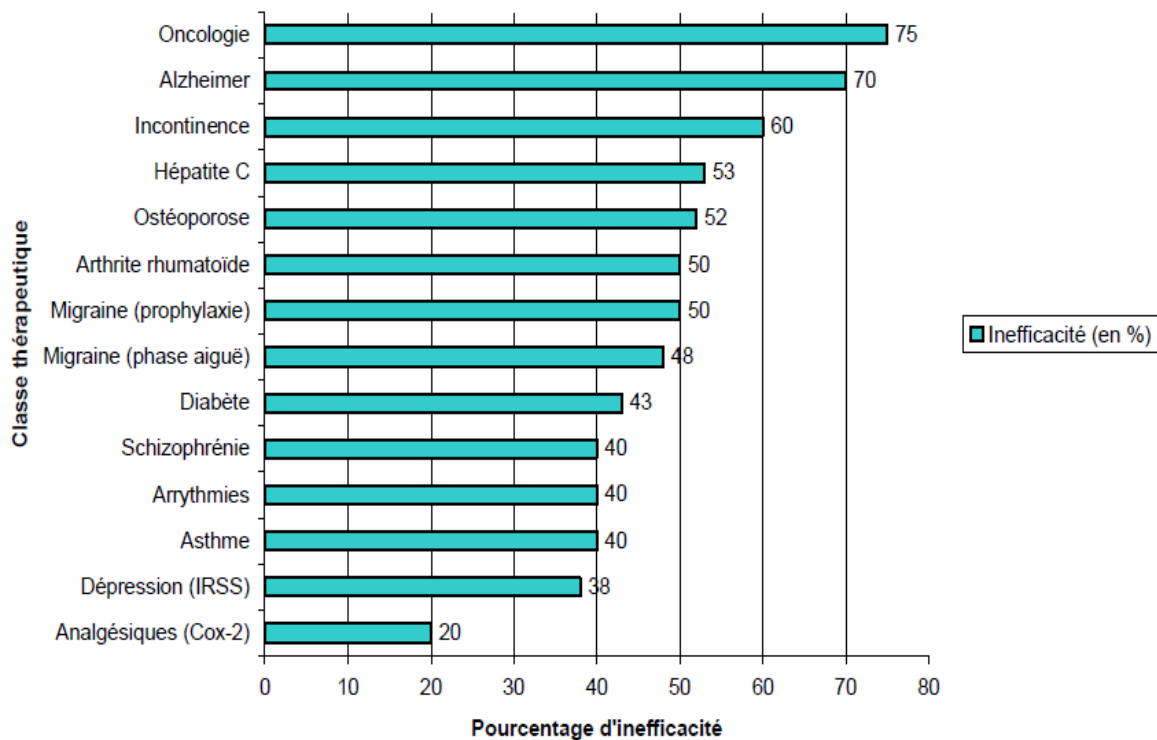


Figure 1: Taux de non réponse aux traitements selon différentes classes thérapeutiques (d'après [11]).

3. Evolution et l'ampleur de la médecine personnalisée

La médecine personnalisée est un sujet qui semble passionner le monde scientifique.

En effet, les publications sur ce sujet ont fortement augmentées (voir figure 2) entre 1999 (1) et 2008 (180), grâce au développement de la médecine moléculaire, aux méthodes de diagnostic moléculaire et aux besoins médicaux réels(12).

La création du « PersonalizedMedicine Coalition » par des industriels pharmaceutiques, des membres du gouvernement américain et des universitaires, le « Genomics and Personalized MedicineAct », introduit en 2006 par Barack Obama (sénateur à l'époque) tout comme les commissions ministérielles sur la médecine personnalisée partout en Europe, démontrent l'intérêt grandissant des acteurs de la santé (praticiens, chercheurs, industriels, gouvernementaux) pour ce sujet.

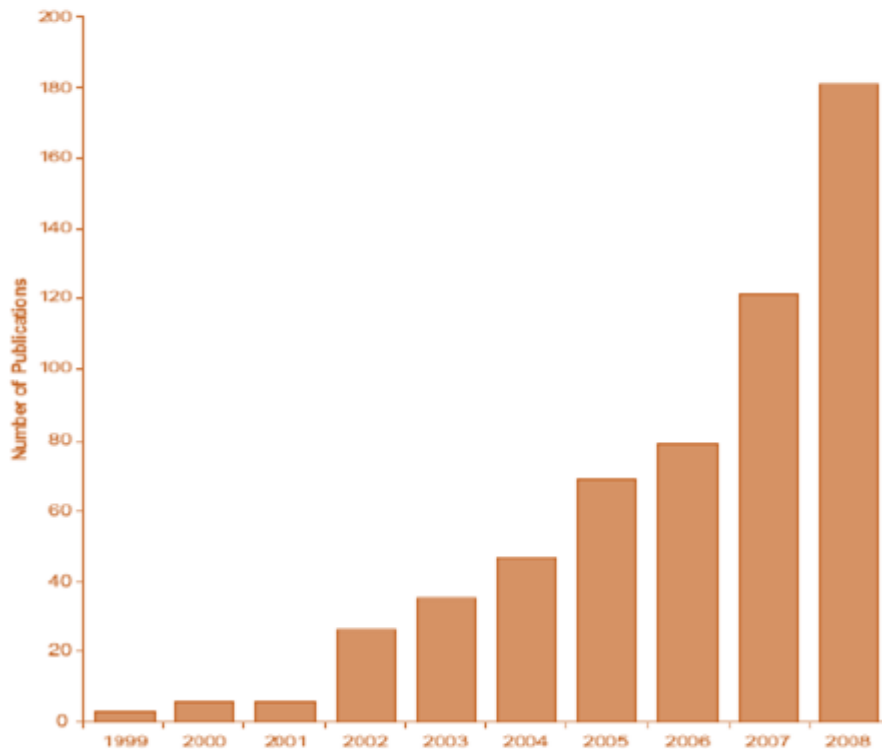


Figure 2: Nombre d'articles par année, entre 1999 et 2008 qui incluent le terme « médecine personnalisée » basée sur une recherche PubMed en Mars 2009[12].

4. Les fondements de la médecine personnalisée : les biomarqueurs

4.1. Définition

La médecine personnalisée se repose sur des marqueurs spécifiques des patients et qui permettront une adaptation idéale du traitement à chaque patient.

On utilise alors le terme de **biomarqueurs**, définis par le National Institute of Health, en 1998, comme « une caractéristique mesurée objectivement (c'est à dire avec une précision et une reproductibilité suffisantes) et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique ou de l'action des médicaments ». Elle introduit deux notions importantes :

- ✓ un biomarqueur doit être mesuré avec fiabilité et précision ;
- ✓ le caractère potentiellement indirect du biomarqueur qui est porté par un ou plusieurs paramètres biologiques (caractéristiques génétiques, protéines, métabolites...) qui permettent de caractériser un état physiologique, un état pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement.

Le dosage des biomarqueurs peut correspondre à des procédures extrêmement simples comme celui de la glycémie ou du cholestérol ou à des procédures plus récentes et complexes comme l'identification d'une mutation spécifique du génome.(13)

Les biomarqueurs peuvent donc être des paramètres biologiques anatomiques, physiologiques, biochimiques ou moléculaires. Ils sont alors détectés dans un tissu ou un fluide biologique (tel que le sang, le liquide céphalo-rachidien ou l'urine) et dont la présence ou l'absence ou la surexpression ou sous-expression seront les critères observés.

4.2. Objectifs des biomarqueurs

Il existe différentes finalités ou stades d'intervention possibles des biomarqueurs dans le domaine biomédical(9)(14). (Figure3)

➤ **Le diagnostic :**

Le biomarqueur permet d'identifier les sujets sains et des sujets malades. Il est soit associé à la présence de la maladie au stade préclinique (avant que la maladie ne s'exprime) donc a un intérêt pour le dépistage ; ou soit associé à une caractéristique de la maladie donc a un intérêt diagnostique.

Le biomarqueur permet donc de savoir quelle pathologie traiter.

➤ **Le pronostic :**

Le biomarqueur permet de déterminer l'évolution prévisible de la maladie c'est-à-dire la survie des patients : la survie globale, la survie spécifique, la survie sans rechute. Il permet donc de savoir quel patient traiter.

➤ **Le prédictif :** Le biomarqueur est ici associé à la réponse au traitement et permet de savoir comment traiter le patient.(15)

Certains biomarqueurs présentent des objectifs touchant le mécanisme de la pathologie en traduisant sa conséquence clinique (l'efficacité et la toxicité) sur les systèmes in vitro et in vivo. D'autres permettent de faire la distinction entre différents stades d'une pathologie. Aussi lors des essais cliniques, les biomarqueurs permettent une élimination fiable et précoce des mauvais candidats au développement des molécules et un choix de la dose de médicament pour les essais pivot de phase III, une diminution du risque de non démonstration d'effet ou d'effets secondaires trop importants.(16)

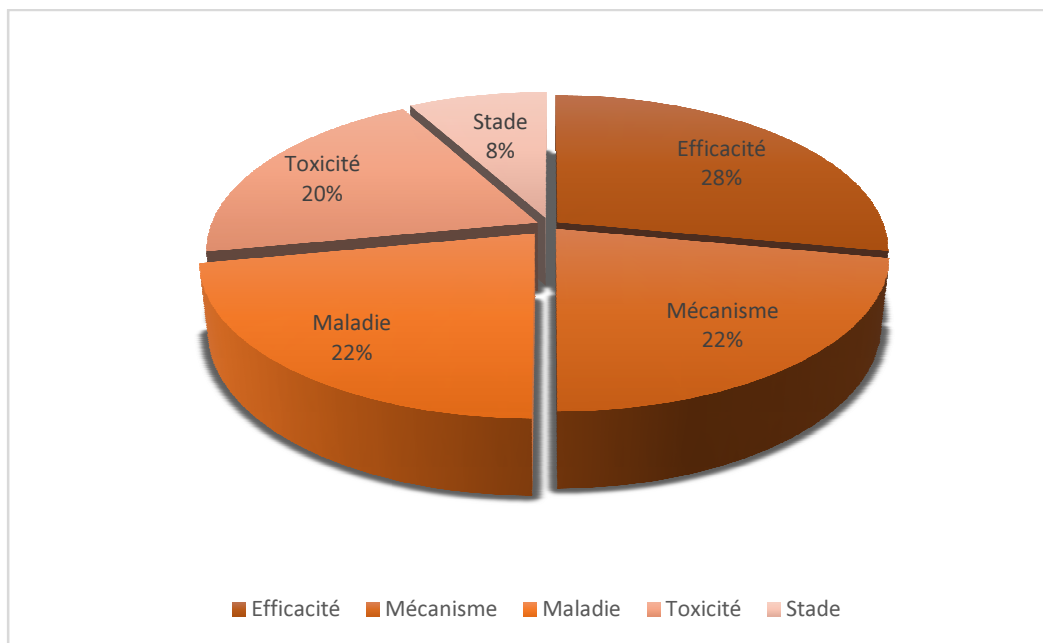


Figure 3: Domaines d'intervention courants des biomarqueurs

4.3. Les biomarqueurs génomiques

Un biomarqueur génomique est une propriété de l'ADN ou de l'ARN révélatrice d'un processus biologique normal ou pathologique et/ou d'une réponse à une thérapeutique ou à une autre intervention (17). Il peut, par exemple, être la mesure :

- ✓ de l'expression d'un gène,
- ✓ de la fonction d'un gène,
- ✓ de la régulation d'un gène.

Un biomarqueur génomique peut consister en une ou plusieurs caractéristiques d'ADN et/ou d'ARN telles un polymorphisme simple de nucléotide (SNP), la variabilité des répétitions de séquences courtes, des haplotypes, des modifications de l'ADN (ex : méthylations), des délétions ou des insertions de nucléotides, des variations du nombre de copies ou des réarrangements cytogénétiques (ex : translocations, duplications, délétions ou inversions).

Ces biomarqueurs doivent présenter certaines qualités requises telles : le polymorphisme ; ils doivent être codominants, non épistatiques, indépendants du milieu, neutres, à répartition uniforme dans le génome, reproductibles, et économique.

Ces biomarqueurs sont ainsi associés à plusieurs domaines de recherche s'appuyant sur le génome.

5. L'ère de la génomique et de la post-génomique

Les progrès considérables réalisés ces dernières années en biologie moléculaire, tant sur le plan cognitif que technologique ont permis de diriger la pratique médicale vers une médecine de plus en plus personnalisée. La masse des données actuellement acquises et de celles à venir ont conduit la biologie moléculaire à se spécialiser progressivement avec l'apparition de nouvelles disciplines : les « omiques ». Ainsi ont vu le jour, la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique ... (18).

5.1. La génomique(19)(20)

La médecine basée sur les « omiques » a débuté avec la science génomique qui se fonde sur des différences individuelles innées du génome.

La génomique est l'étude systématique du génome d'un organisme. Le génome est l'ADN total d'une cellule ou organisme. Le génome humain contient 3,2 milliards de bases et environ 30 000 à 40 000 gènes codant pour des protéines. La génomique regroupe diverses approches d'analyse qui permettront de comprendre la constitution et l'organisation du génome (la génomique structurale) et son fonctionnement (la génomique fonctionnelle).

Traditionnellement, les gènes ont été analysés individuellement, mais la technologie des biopuces (microarrays) a considérablement progressé ces dernières années. Les biopuces à ADN mesurent les différences dans la séquence d'ADN entre les individus et l'expression de milliers de gènes peut être analysée simultanément. Elle a ainsi ouvert la voie aux études de polymorphismes génétiques associés à certaines maladies, a contribué à faciliter une prescription mieux individualisée des médicaments compte tenu de différences, d'origine pharmacogénétique/ pharmacogénomique, dans la réponse aux médicaments, et a conduit vers une médecine personnalisée de plus en plus pointue, qui s'enrichira par l'apport des avancées de l'ère post-génomique(18).

5.2. La transcriptomique(9)(19)

Le transcriptome est l'ensemble des ARN (messagers, ribosomiques, de transfert et autres espèces d'ARN) issus de la transcription du génome.

La transcriptomique est donc l'étude de l'ensemble des ARNm produits lors du processus de transcription d'un génome. Elle repose sur la quantification systématique de ces ARNm, ce qui permet d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données, d'identifier les gènes actifs et de déterminer les mécanismes de régulation de leur expression ainsi que de définir les réseaux d'expression de ces gènes.

Plusieurs techniques permettent l'accès à ces informations ; ce sont les puces à ADN, la réaction en chaîne par polymérase (PCR), le séquençage. Aussi l'utilisation combinée des techniques SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), d'expression différentielle et de microarrays, ainsi que des données de la littérature permettent aussi d'identifier in silico des candidats biomarqueurs transcriptomiques.

5.3. La Protéomique

Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, une partie de cellule (membrane, organite) ou dans un groupe de cellules (organe, organisme) dans des conditions

données et à un moment donné. La taille et la complexité du protéome sont plus importantes que celles du génome car un gène peut coder plusieurs protéines. Ceci est dû à des modifications de la maturation des ARNm, mais aussi à des modifications post-traductionnelles des protéines comme les phosphorylations et les glycosylations.

Le protéome est un reflet dynamique des gènes et de l'environnement Il varie temporellement et spatialement, selon les réponses de l'organisme à des stimuli internes (hormonaux, par exemple), ou en réponse à certains stimuli externes (toxiques ou polluants, par exemple).

La protéomique désigne la science qui étudie les protéomes. On distingue la protéomique structurale et la protéomique fonctionnelle. La première étape de la protéomique consiste à identifier des protéines dont l'expression varie en relation avec des modifications de l'environnement cellulaire ou au cours de processus physiopathologiques. Celle-ci est descriptive et permet de dresser un répertoire qualitatif et quantitatif des protéines impliquées et d'en définir la structure primaire, secondaire et tertiaire. La seconde étape, la protéomique fonctionnelle, consiste à mieux comprendre la dynamique des relations fonctionnelles entre les structures biologiques et des adaptations survenant face à une situation particulière, qu'il s'agisse d'une exposition à un facteur environnemental, d'un processus pathologique ou d'un traitement pharmacologique.

Le protéome peut être analysé par plusieurs techniques :

- ✓ **Le gel d'électrophorèse à 2 dimensions** permet de séparer les protéines en fonction de leur charge et de leur masse et donc de dresser, avec une grande résolution, une carte des protéines exprimées, présentes dans un tissu à un moment donné.
- ✓ **La chromatographie sur des surfaces biochimiquement actives couplée à la spectrométrie de masse** (MALDI-TOF et SELDI-TOF) permet d'identifier une protéine d'intérêt dans un mélange complexe tel que le sérum.
- ✓ **La spectrométrie de masse en tandem** (ESI-IT par exemple) permet une fragmentation des peptides issus de la première fragmentation et une analyse plus détaillée de la séquence d'acides aminés.
- ✓ **La chromatographie d'affinité** permet d'isoler des protéines en fonction de leur affinité pour des molécules organiques fixées sur un support.

- ✓ **Les proteinbiochips** ou puces à protéines (qui peuvent également être des puces à antigènes) permettent un dosage en parallèle de plusieurs protéines et leur principe se rapproche de celui des puces à ADN avec l'utilisation d'anticorps comme sondes.

5.3. La Métabolomique

Le métabolome correspond à l'ensemble des métabolites retrouvés, en concentrations variables, dans un échantillon biologique. IL renferme un grand nombre de molécules très différentes : des intermédiaires du métabolisme (nucléotides), des hormones, des vitamines, des substrats énergétiques (glucides, lipides), etc.

Le métabolome est le dernier produit en aval de la transcription des gènes et, par conséquent, des changements dans le métabolome sont amplifiés par rapport aux changements dans le transcriptome et le protéome. En plus, entant que produit en aval, le métabolome est le plus proche du phénotype du système biologique étudié.

La métabolomique est donc la science qui étudie cet ensemble des métabolites présents dans une cellule, un organe, un organisme. C'est l'équivalent de la génomique pour l'ADN et de la protéomique pour les protéines.

Les biomarqueurs métabolomiques sont séparés par chromatographie (gazeuse ou liquide) et détectés principalement par des techniques de RMN (résonance magnétique nucléaire) et de spectrométrie de masse. L'utilisation de la spectrométrie de masse permet d'obtenir des profils d'expression protéique ou métabolomique, voire d'identifier des protéines ou des métabolites directement à partir de petites quantités de fluides biologiques mais aussi d'extraits tissulaires. (9)

A côté de la métabolomique, en général, se sont progressivement développées des sciences plus spécifiques, comme *la métabonomique, la glycomique, la lipidomique, l'immunomique*, etc.

Toutes ces sciences émergentes ont la caractéristique de générer des données de tailles considérables qui ne pourront être traitées par des méthodes conventionnelles ; d'où la nécessité d'outils informatiques adaptés au domaine pour faciliter l'analyse, le traitement et l'interprétation de ces méga-données appelés « Big Data ».

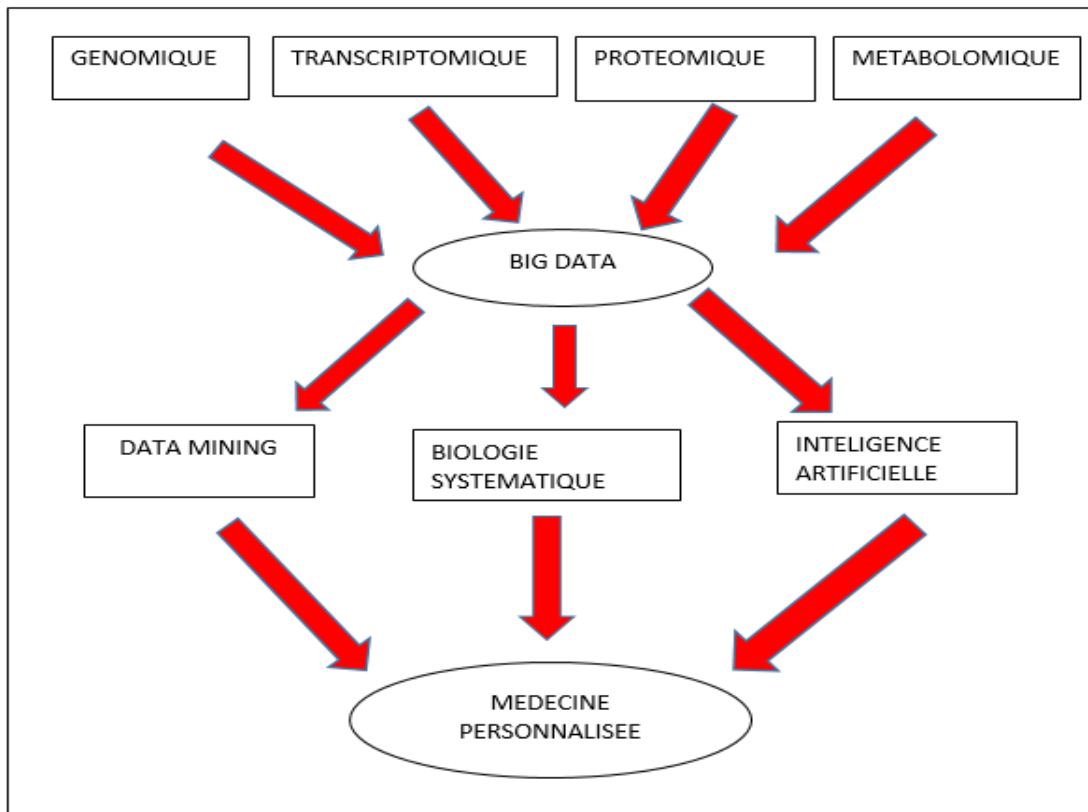


Figure 4: Des approches «omiques» à la médecine personnalisée en passant par les «big data».

5.4. La bio-informatique : le traitement des données.(21)

La bio-informatique et les biostatistiques sont des outils cruciaux dans le traitement des données volumineuses obtenues par la génomique.

La bio-informatique a largement participé au séquençage du génome humain mais elle présente encore des limites. De nombreuses bases de données existent actuellement, comme la « PharmacogenomicKnowledge Base » (www.pharmgkb.org) qui contient des informations relatives à la génomique, aux SNP, à la pharmacodynamique et à la pharmacocinétique, aux allèles, aux phénotypes cliniques, moléculaires et cellulaires, aux molécules et aux réponses aux médicaments.

La bio-informatique se propose actuellement de relever plusieurs challenges.

- **Le traitement à grande échelle de données génomiques robustes**

Le séquençage d'un génome entier ou d'exomes produit un taux considérable de données. Ces données sont extraordinaires de par leur taille et par leur complexité : par exemple chaque nouveau génome séquencé est considéré comme ayant entre 100 000 et 300 000 SNP non encore découverts et moins de 1000 mutations somatiques par génération. A chaque fois qu'un nouveau variant est identifié, il faut vérifier s'il ne s'agit pas d'un faux positif. Ceci nécessite des algorithmes capables de les traiter et de détecter des variations échappant au séquençage à haut débit.

➤ **L'interprétation des effets fonctionnels et de l'impact de la variation génomique**

Une fois que les données génomiques ont été traitées, l'effet fonctionnel et l'impact des variations génomiques doivent être analysés. Depuis quelques années, de nombreuses méthodes informatiques ont été développées pour corréliser les variations génétiques et les traits phénotypiques. Ces méthodes utilisent différentes approches telles que des règles empiriques, des modèles de Hidden Markov, des « réseaux neuronaux », des arbres décisionnels, des forêts d'arbres décisionnels et des séparateurs à vaste marge. Ces algorithmes de prédiction incluent plusieurs paramètres pour prédire l'impact des différentes variations.

➤ **L'intégration des systèmes et des données pour évaluer la complexité**

De nombreux phénotypes étudiés en médecine sont le résultat d'interactions entre gènes ou entre gènes et l'environnement. Il faut alors prendre en compte les systèmes biologiques et leurs interactions induit un problème de complexité en intégrant des données moléculaires à de nombreux niveaux biologiques parmi tels le génome, le transcriptome, le métabolome, le protéome et les réseaux fonctionnels et régulateurs.

➤ **Rendre les données cliniquement pertinentes**

Le dernier challenge est d'appliquer les résultats pour améliorer la prise en charge des patients. Une des aires où la bio-informatique peut avoir le plus d'impact clinique est la pharmacogénomique. La bio-informatique permet également un passage à la clinique grâce à des bases de données comme *PharGKB*, *dbGaP*, *PacDB* et *FDAAERS*.

CHAPITRE II :

LA PHARMACOGENOMIQUE ET LA PHARMACOGENETIQUE

1. Historique

Le domaine de la pharmacogénétique n'a pas été officiellement reconnu jusqu'à la fin des années 1950, bien que les premières observations de réactions inhabituelles de médicaments basées sur l'individualité biochimique aient été notées dans les années 1930.

Le terme «pharmacogénétique a été publié pour la première fois par le médecin allemand Friedrich Vogel en 1959 (21). Ceci a été en réponse à des observations antérieures de la variabilité interindividuelle dans la perception du gène du phénylthiocarbamide et des cas isolés de porphyrie induite par un médicament. Des découvertes scientifiques supplémentaires dans les années 1950 comprenaient :

- l'identification de l'anémie hémolytique induite par la primaquine chez les Afro-Américains (qui a été démontrée par suite d'allèles variant du glucose-6-phosphate déshydrogénase [G6PD](22).
- apnée prolongée induite par succinylcholine pendant l'anesthésie (due à une déficience autosomique récessive de la butyrylcholinestérase(23),
- et des effets indésirables sévères après un traitement antituberculeux avec isoniazide (plus tard démontré par les allèles variant N-acétyltransférase [NAT2](24).

En plus de l'article de Vogel, à cette époque deux autres publications similaires comprenaient l'examen initié par l'American Medical Association des études pharmacogénétiques disponibles par Arno Motulsky(25) et le premier manuel consacré à la discipline en 1962 par Werner Kalow. En 1977, l'oxydase hépatique du cytochrome P450 a été identifiée. Cette enzyme contrôle le métabolisme de la débrisoquine (un médicament antihypertenseur) et spartéine (anti-arythmique) et il est connu pour être l'une des découvertes les plus influentes en pharmacogénétique et son utilité clinique potentielle. Le polymorphisme génétique de cette enzyme métabolisant le médicament a été identifié après des réactions indésirables au médicament. Les effets indésirables des médicaments étaient les événements cliniques qui ont

révélé des variants génétiques d'autres enzymes métabolisant le médicament ou des cibles de médicaments. Ainsi, des polymorphismes génétiques ont été découverts par des observations accidentelles selon lesquelles certains patients ou volontaires ont subi des réactions indésirables et perturbatrices lors d'un traitement médicamenteux lorsqu'ils ont reçu des doses standard de médicaments.

2. Définitions

Les termes «pharmacogénétique» et «pharmacogénomique» sont fréquemment utilisés dans la littérature concernant la médecine personnalisée. Même s'il n'existe encore aucun véritable consensus sur les définitions propres à chacun de ces termes, il est néanmoins possible de dégager certaines caractéristiques permettant de les distinguer.

La pharmacogénomique est un terme qui a été introduit à la fin des années 1990 et qu'on peut définir de manière large comme étant l'étude des variations des effets toxiques ou thérapeutiques des médicaments sur la base d'une analyse des informations contenues dans le génome entier d'un individu. Les études pharmacogénomiques portent aussi bien sur les variations interindividuelles des séquences génétiques elles-mêmes que sur les variations de l'expression des gènes.

La pharmacogénomique selon la définition de l'EMA (European Medicines Agency), est l'influence des variations caractéristiques de l'ADN et de l'ARN sur la réponse des médicaments.

Par contraste, la pharmacogénétique ne s'intéresse qu'à l'influence des variations de séquence d'ADN sur cette réponse aux médicaments. Ce terme est utilisé pour désigner les recherches portant sur des gènes candidats spécifiques susceptibles d'expliquer l'existence de variations dans la manière dont un individu répond à un médicament en termes d'effets indésirables ou d'efficacité clinique.

Aux Etats Unis, les effets indésirables des médicaments sont responsables d'environ 100 000 décès par an, du même ordre que le cancer de poumon. Les coûts sont élevés de 2 à 50 milliards de dollars, selon ce qui est pris en charge ou non dans ces coûts.

En France, 3.2% des hospitalisations sont dues à des effets indésirables des médicaments pour un coût de 320 millions d'euros, sachant que 50% des individus utilisent mal leurs médicaments.

Par ailleurs. L'efficacité des médicaments est aussi très variable. Aussi bien en termes de pharmacocinétique qu'en termes de pharmacodynamie. La caractérisation de la maladie et/ou de la cible définit la stratégie thérapeutique. Efficacité et toxicité sont donc extrêmement variables. La réponse pharmacologique ou toxique d'un organisme à un médicament comprend trois étapes, elles-mêmes variables : le métabolisme et le transport, la cible et la réaction de l'organisme. Elle dépend de facteurs environnementaux et de facteurs endogènes dont les facteurs génétiques.

3. Principes de la pharmacogénomique et de la pharmacogénétique

3.1. Bases moléculaires de la variabilité dans le génome

La variabilité génétique est la conséquence de la variation de la séquence d'ADN dans le génome. En raison de la variation de séquence d'ADN, les gènes peuvent exister sous des formes alternatives appelées allèles. Des ensembles spécifiques d'allèles formant le génome d'un individu sont appelés « génotype », les caractéristiques observables telles que la capacité de métaboliser un médicament ou une réponse médicamenteuse sont appelées « phénotype ». Puisque les chromosomes autosomiques sont appariés, chaque position (locus) est représentée deux fois. Si les deux chromosomes ont le même allèle qui occupe son locus, la condition est appelée homozygote ; et si les allèles des deux loci sont différents, l'individu est hétérozygote pour cet allèle.

Le polymorphisme génétique est l'apparition de deux allèles ou plus dans un locus donné dont l'allèle rare a une fréquence d'au moins 1% ou plus dans une population donnée. (26)

La pharmacogénomique se concentre sur la variation dans le génome humain. Le génome humain est composé de 3,1 milliards de bases nucléotidiques et le nombre de gènes est d'environ 26 000. Chaque personne hérite de deux copies de la plupart des gènes, une de chaque parent. Bien que l'ADN de deux individus soit plus de 99% identique, le nombre de nucléotides est tellement important, environ 3 milliards que des millions de séquences variantes se produisent encore dans la population humaine.(27)

Ces variations sont généralement de deux types : **les polymorphismes de répétition** et ceux atteignant **un seul nucléotide**. Les premiers qui sont les plus fréquents affectent le nombre des répétitions en tandem d'une même séquence nucléotidique, encore appelée minisatellite

(dix à quinze nucléotides) ou microsatellite (un à quatre nucléotides) selon l'étendue de la répétition. Ce nombre est variable d'un individu à l'autre et se transmet héréditairement.

Le type de variante le plus abondant est le polymorphisme nucléotidique unique (SNP)(28). Il s'y ajoute, beaucoup plus rarement, des délétions totales ou partielles du gène aboutissant à un défaut de fonction et des amplifications aboutissant à des gains de fonction.

Les polymorphismes des enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques permettent de distinguer, pour un même médicament, les métaboliseurs lents (défaut d'activité), rapides (activité normale en général) et ultra-rapides (activité excessive).

D'autres types courants sont les suppressions, les insertions et les répétitions en tandem.

La séquence de nucléotides de chaque gène code pour un produit moléculaire, habituellement une protéine. La variation de séquence peut entraîner des altérations dans le produit du gène, ce qui peut avoir un effet sur les phénotypes influençant le produit. Les chercheurs en génétique utilisent plusieurs types d'études pour établir et explorer les relations génotype-phénotype.

- ✓ Les études d'héritabilité peuvent indiquer les contributions relatives des influences génétiques et non génétiques (par exemple, environnementales) à un phénotype particulier.
- ✓ Les études de liaison analysent des pedigrees d'individus et de marqueurs génétiques apparentés pour affiner les régions du génome qui peuvent héberger des gènes associés aux phénotypes d'intérêt.
- ✓ Les études sur les associations de gènes candidats peuvent être utilisées pour analyser les relations génotypiques suggérées par les études de liaison et se concentrer sur les gènes sélectionnés pour leur pertinence physiologique ou pharmacologique pour un phénotype.

3.2. Les variations génétiques

Il existe différents types de variations génétiques. La variation génétique dite à petite échelle comprend les **polymorphismes mononucléotidiques** (SNP), les **polymorphismes multi-nucléotidiques** (MNP) et les **micro-indeaux**. Les MNP sont des variations nucléotidiques consécutives multiples d'une seule longueur commune, telles que les polymorphismes à double nucléotide (DNP) et les polymorphismes à trois nucléotides (TNP) avec deux et trois

nucléotides variables, respectivement (Figure 4). Les micro-inducteurs sont des délétions, des duplications et des combinaisons de ceux-ci impliquant le gain ou la perte de 1 à 50 nucléotides (29).

Le génome humain contient plus de 3 millions de SNP situés à une distance moyenne d'environ 1000 pb(30). La fréquence des DNP et des TNP, les formes les plus courantes de MNP, représente environ 1% du nombre total de SNP (31).



Figure 5 : Les différents types de variations génétiques [31]

Les SNP, les microindèles et d'autres types de variations génétiques à petite échelle sont impliqués dans des maladies monogéniques aussi bien que complexes (32). Ils sont également impliqués dans des réactions médicamenteuses individuelles. Par exemple, les SNP et les micro-enzymes dans les gènes codant pour des enzymes métabolisant les médicaments comme le CYP2D6 peuvent entraîner une perte d'activité enzymatique et un ralentissement du métabolisme de divers médicaments importants. Par conséquent, des efforts importants ont été investis pour développer des techniques de génotypage de variations à petite échelle, en particulier des SNP, aboutissant à l'émergence d'une abondance de techniques à cette fin, y compris la PCR-RFLP.

3.3. Les polymorphismes à un seul nucléotide : SNP

Les polymorphismes affectant un seul nucléotide (single nucleotide polymorphism ou SNP) comme leur nom l'indique, consistent en des variations de base dans un nucléotide, l'une remplaçant l'autre, présents dans plus de 1% de la population(26)(33). Ce sont les variations de séquence d'ADN les plus fréquemment trouvées dans le génome humain (34), par rapport aux variantes non fréquentes, principale cause de troubles génétiques. On pense que les SNPs peuvent contribuer de manière significative au risque génétique pour les maladies courantes. Environ 1 million de SNPs sont susceptibles de se produire dans les gènes humains, avec environ 500 000 SNPs non codants, 200 000 étant des SNPs de codage de remplacement. Les SNPs trouvés dans les régions codantes et réglementaires des gènes sont susceptibles d'être les variantes les plus pertinentes. Les efforts visant à identifier tous les SNPs et leur pertinence pour la susceptibilité à la maladie et les résultats du traitement sont continus et peuvent prendre plusieurs années. Cependant, l'approche adoptée par de nombreux scientifiques à l'heure actuelle est l'approche du gène candidat dans laquelle on examine les SNP du gène choisi susceptibles d'avoir un effet.

3.4. Les polymorphismes génétiques et les enzymes de métabolisme des médicaments

Le métabolisme des médicaments dans le foie est assuré par deux types d'enzymes :

- ✓ Ceux de phase I qui, comme les cytochromes P450, rendent les molécules plus polaires et donc plus hydrophiles par hydroxylation,
- ✓ Et ceux de phase II qui catalysent des réactions de conjugaison avec divers radicaux (glucuronate, sulfate, méthyle, acétyle, glutathion...) et renforcent ainsi le caractère hydrophile des médicaments et leur solubilité dans la bile et l'urine.
- ✓ Il s'ajoute à ces enzymes des protéines de transport de phase III assurant le transfert des métabolites dans la cellule ou hors de la cellule, par exemple la protéine P-gp et les protéines de la famille ABC (« ATP binding cassette ») (35).

La majorité des isoformes du CYP 450 est exprimée dans le foie, tandis que d'autres sont exprimées dans d'autres tissus tels que le système nerveux central, le tractus gastro-intestinal, le poumon, la trachée, la muqueuse nasale et olfactive et la glande surrénale. Les CYP les plus importants impliqués dans le métabolisme des médicaments comprennent le CYP2D6, le

CYP3A4, le CYP2C9 et le CYP2C19. Les mutations génétiques et les polymorphismes dans un gène CYP peuvent entraîner des altérations fonctionnelles, telle qu'une activité accrue ou diminuée. (36) Par exemple, un métaboliseur lent CYP2D6 chez qui de la codéine sera administrée, ne répondra pas au traitement puisque le médicament n'aurait aucun effet. À l'inverse, un métaboliseur rapide CYP2D6 souffrirait probablement des effets secondaires d'une posologie normale (37)(38). CYP2D6 est un enzyme hautement polymorphe avec au moins 70 variants alléliques(39)qui peuvent être classés en quatre classes phénotypiques. L'expression globale du CYP2D6 dans le tissu hépatique est seulement environ 2%, mais des centaines de médicaments sont métabolisés par cette enzyme, y compris les opiacés, les bêtabloquants, les anti-arythmiques, les antidépresseurs tricycliques, les ISRS, les antagonistes 5-HT₃ et neuroleptiques(40). Environ 10% de la population caucasienne des difficultés à métaboliser complètement ces médicaments(41), conduisant à des effets secondaires nocifs(38)(42). Par conséquent, les prescriptions personnalisées seront d'une grande importance(43).

Le tableau I montre les différents polymorphismes touchant les enzymes du cytochrome P450 et leur fréquence d'expression. (Tableau I)

Les enzymes de la deuxième phase intervenant dans le métabolisme sont les transférases qui couplent le médicament ou son métabolite à un radical pour faciliter son élimination. Les polymorphismes reconnus ont, en général, des distributions plus étroites que celles des cytochromes ; mais leurs conséquences peuvent être dramatiques. Un des plus étudiés de ces polymorphismes est celui de la thiopurinéméthyltransférase qui transfère un radical méthyl sur un métabolite de la 6-mercaptopurine(44).

Il est relativement fréquent que les effets d'un médicament dépendent à la fois du polymorphisme des enzymes de son métabolisme et de ceux des enzymes cibles ou des récepteurs. C'est le cas des antagonistes de la vitamine K tels les dérivés coumariniques (Warfarine ou Coumadine® et Acénocoumarol ou Sintrom®). Ces médicaments sont métabolisés dans le foie par le CYP2C9 et ont comme cible la vitamine K époxyde réductase (VKORC1) dont le gène vient d'être récemment identifié (45). Chacun des gènes de ces deux enzymes présente des polymorphismes faisant varier la réponse aux médicaments.

Tableau I: Différents CYP 450 exprimés et leurs fréquents SNP

CYP	ID	Mutation	Amino Acid	Global frequency (%)	CYP	ID	Mutation	Amino acid	Global frequency (%)
3A43	rs45450092	435G>T	M145I	1.5	2F1	rs144315434	1172T>C	L391P	5.4
	rs45621431	825G>A	M275I	2.3		rs146029724	1330A>C	M444L	6.5
	rs680055	1018C>G	P340A	13.4	2W1	rs61746347	557G>A	R188H	2.8
	rs78548296	389G>A	R130Q	1.0		rs117826462	547C>G	L183V	1.4
4A11	rs1126743	1374C>G	I458M	42.6	4F11	rs1060463	1271G>A	R424Q	49.5
	rs4926581	553G>T	V185F	28.1		rs148197835	538C>T	R180C	4.2
	rs61736429	1525C>T	L509F	2.1	rs57519667	438C>T	R148C	1.6	
	rs62618709	553G>T	V185F	1.1	2C18	rs115091705	431G>A	R144H	1.7
4A22	rs112604161	181G>A	G61R	1.6		rs117111102	370C>T	R124W	1.4
	rs113777592	553G>T	V185F	29.6	rs2281891	1154C>T	T385M	19.3	
	rs2056900	388G>A	G130S	29.9	rs41286880	1004G>A	R335Q	2.5	
	rs4926600	1525C>T	L509F	12.9	rs79500998	1324C>T	R442C	1.0	
4A22	rs61507155	311A>T	Y104F	6.6	7A1	rs8192875	1039G>A	D347N	1.6
	rs61736431	1154C>T	P385L	1.2		4F12	rs16995378	47C>T	T16M
	4B1	rs12094024	988A>C	Y329S	2.2		rs57578760	808G>C	V270L
		rs2297809	1123C>T	R375C	18.3	rs76142062	88C>A	L30I	3.4
rs4646487		517C>T	R173W	16.8	11B1	rs11775687	562C>T	P188S	5.7
rs59694031		1109G>C	C370S	4.0		rs9657020	593C>T	T198M	12.7
4F2	rs2074900	515C>T	Thr172I	25.4	4F3	rs118159249	1420G>A	A474T	1.1
	rs2108622	1297G>A	V433M	20.9	2A7	rs111390860	988C>T	R330W	1.0
	rs3093153	554G>T	G185V	3.7		rs184466431	1301G>T	R434L	1.2
	rs3093200	1555C>A	L519M	8.4	rs3869579	778C>T	R260C	46.7	
5A1	rs13306050	1372C>T	R458C	3.3	rs60711313	1259T>C	I420T	3.2	
	rs13306052	679GA	V227M	1.4	rs75152309	1106A>T	K369M	6.6	
	rs6952940	544C>T	P182S	2.4	rs78754793	244G>C	A82P	2.4	
2A6	rs5031017	1436G>T	G479V	1.4	2S1	rs34971233	1397C>T	P466L	1.1
	rs5031016	1412T>C	I471T	5.1	2E1	rs6413419	535G>A	V179I	7.2
	rs28399499	983T>C	I328T	2.3		rs28969387	1370A>T	H457L	6.3
	rs8192709	64C>T	R22C	4.5	2C19	rs17884712	431G>A	R144H	1.4
	rs28399499	383T>C	I128T	2.3		8A1	rs5626	706C>T	R236C
2C8	rs11572103	805A>T	I269F	16.4	2D6	rs2982054	986G>A	R329H	31.2
	rs1058930	792C>G	I264M	4.1		rs1058172	941G>A	R314H	7.9
	rs11572103	805A>T	I269F	16.4	rs59421388	859G>A	V287M	5.3	
2C9	rs28371686	1080C>G	D380E	2.3	rs1065852	100C>T	P34S	25.9	
	rs28371685	1003C>T	R335W	2.0	1A1	rs4646422	134GA	G45D	6.7
	rs2256871	752A>G	H251R	4.0		rs17861094	233T>C	I78Thr	8.3

3.5. Intérêt des polymorphismes

L'étude des polymorphismes de nucléotides peut permettre d'évaluer deux aspects.

➤ **La prévention des risques**

Lors du diagnostic, ils permettront de dépister les patients à risque pour un médicament car ayant une modification du métabolisme pouvant induire des surdosages, permettant ainsi de diminuer les effets secondaires.

Par exemple, la recherche de l'allèle HLA-B*1502 permet d'éviter le traitement des porteurs de cet allèle par la carbamazépine, antiépileptique qui induit chez ces personnes un risque de développer un syndrome de Stevens et Johnson.

➤ **L'augmentation du bénéfice**

L'évaluation de la métabolisation et la recherche de cibles thérapeutiques permettent d'augmenter les bénéfices des traitements pour les patients, d'éviter de chercher des traitements à tâtons, ce qui est une perte de temps, de bénéfice et financière. L'exemple le plus concret est l'évaluation de la protéine HER-2/Neu avant un traitement du cancer du sein par le Trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé recombinant de classe IgG1 dirigé contre le récepteur 2 de ce facteur. En effet, les patientes cancéreuses ne présentant pas de surexpression de cette protéine ne répondront pas à ce traitement alors que son utilisation en combinaison à une chimiothérapie chez les patientes ciblées permet une réduction du risque de 52 % comparé à une chimiothérapie seule. (46)

CHAPITRE III :

L'HEMOSTASE ET LES ANTIVITAMINES K

1. Rappels sur l'hémostase

L'hémostase est le processus physiologique qui regroupe l'ensemble des phénomènes déclenchés par une lésion vasculaire et qui concourt à l'arrêt du saignement, à la prévention des saignements spontanés et des thromboses. Schématiquement, on distingue trois phases qui sont en réalité simultanées et interdépendantes (47):

- ✓ **l'hémostase primaire** qui ferme la brèche vasculaire par la formation du clou plaquettaire ou « thrombus blanc » ;
- ✓ **la coagulation** qui consolide ce premier thrombus en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges (thrombus rouge) ;
- ✓ **la fibrinolyse**, processus limitant, permettant la destruction des caillots ou la limitation de leur extension.

L'hémostase primaire et la coagulation sont très intriquées et pratiquement contemporaines tandis que la fibrinolyse est un phénomène retardé qui se développe lorsque le vaisseau lésé est réparé.

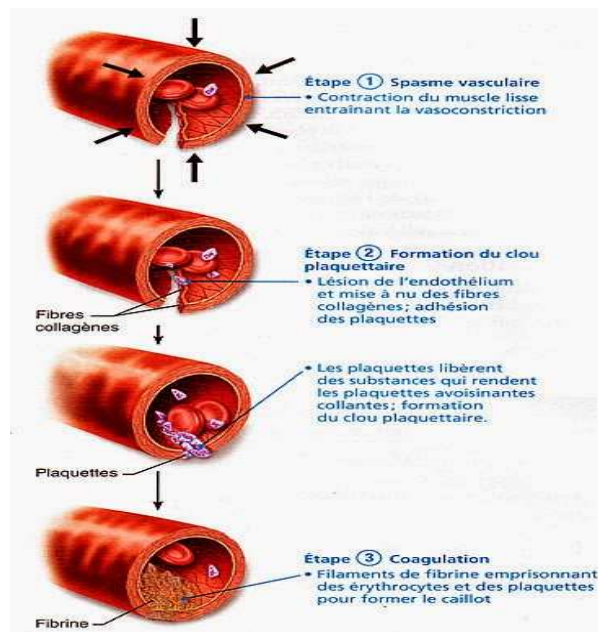


Figure 6: Schéma montrant les différentes étapes de l'hémostase

➤ **L'hémostase primaire**

L'hémostase primaire est l'ensemble des phénomènes qui aboutissent au colmatage initial d'une brèche vasculaire par formation d'un caillot essentiellement plaquettaire.

C'est la première étape d'urgence du contrôle hémorragique, conduisant au thrombus plaquettaire en une durée de 3 à 5 min.

Quatre acteurs principaux dominent cette phase : les composants de la paroi vasculaire, les plaquettes sanguines, et deux protéines plasmatiques qui sont le fibrinogène et le facteur Von Willebrand (VWF). Elle se déroule en deux phases successives :

- ✓ **La phase vasculaire** : cette première étape de l'hémostase primaire est la vasoconstriction liée aux réflexes des vaisseaux lésés.
- ✓ **La phase plaquettaire** : cette seconde phase amène à la création du « clou plaquettaire ». Les plaquettes circulantes adhèrent au sous endothélium, par l'intermédiaire de facteur Von Willebrand (VWF) via gp Ib/IX. Cette adhésion déclenche l'activation de la plaquette. Les plaquettes changent de la forme et libèrent des substances pro-coagulantes contenu dans leurs granules, par suite l'agrégation est permise par le fibrinogène qui crée de véritables ponts adhésifs interplaquettaires par le biais de sa fixation à son récepteur membranaire spécifique, la gp IIb/IIIa(48).

➤ **La coagulation**

Les protéines de la coagulation

La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques impliquant les facteurs de la coagulation. Ces facteurs de coagulations sont des protéines plasmatiques incluent dans l'ensemble des protéines de coagulation, avec les inhibiteurs physiologiques de la coagulation. Ces protéines sont synthétisées dans l'hépatocyte avant d'être sécrétées dans la circulation, à l'exception du *tissue factor pathway inhibitor*(TFPI) qui est produit par l'endothélium vasculaire. Le foie joue donc un rôle-clé dans le maintien d'une hémostase normale. Toutefois, certaines des protéines de la coagulation ne sont pas exclusivement produites par le foie, mais aussi par d'autres organes : c'est le cas pour le facteur VIII, produit également par la rate et le poumon et la protéine S, produite aussi par l'endothélium

vasculaire. Parmi les protéines synthétisées par le foie, certaines subissent des modifications post traductionnelles vitamine K-dépendantes et ces modifications sont indispensables à l'acquisition de leur activité fonctionnelle. Ce sont les facteurs II, VII, IX et X, et les protéines C et S.

La coagulation

La conception classique du phénomène de la coagulation comportait deux voies d'activation : voie intrinsèque et voie extrinsèque, alors que le déroulement de la coagulation in vivo ne respecte pas cette distinction. Cette conception duelle correspond en fait aux processus de la coagulation in vitro.

In vivo, la coagulation est initiée lorsqu'une protéine membranaire, le facteur tissulaire vient au contact du sang, il se lie au facteur VIIa, lui faisant acquérir une activité catalytique (49).

La coagulation se schématise par une cascade de réactions enzymatiques, aboutissant à la génération de la molécule de thrombine, enzyme clé de la coagulation, permettant la transformation du fibrinogène en fibrine et assurant la réactivation et l'amplification du différentes étapes étant de la coagulation que de l'hémostase primaire (50)(51).

Tableau II: Principaux facteurs de coagulation [47][52]

	Masse moléculaire (KDa)	Rôle	Lieu de synthèse	Vit K dépendant
I (Fibrinogène)	340	Substrat	Foie	—
II (Prothrombine)	72	Zymogène	Foie	OUI
III (Facteur tissulaire)	47	Cofacteur	Sous endothélium Cellules sanguines	—
IV (Calcium)		ubiquitaire, provient du plasma		—
V (Accélélerine)	330	Cofacteur	Foie	
VI (non retenu par le comité international de nomenclature)				—
VII (Convertine)	50	Zymogène	Foie	OUI
VIII (Facteur antihémophilique A)	330	Cofacteur	Foie, Rate, Poumon	—
IX (Facteur antihémophilique B)	57	Zymogène	Foie	OUI
X (Facteur Stuart)*	59	Zymogène	Foie	OUI
XI (Facteur Rosenthal)*	160	Zymogène	Foie	—
XII (Facteur Hageman)*	80	Zymogène	Foie	—
XIII (Facteur stabilisant la fibrine)	320	Zymogène	Foie	—
Prékallikréine (facteur Fletcher)*	85	Zymogène	?	—
Kininogène de haut poids moléculaire (facteur Fitzgerald)*	100	Cofacteur	?	—

Tableau III: Principales caractéristiques des inhibiteurs de la coagulation [47][52]

	Masse moléculaire (kDa)	Rôle	Lieu de synthèse	Vit K dépendant
Antithrombine (AT)	65	Serpine	Foie	—
Protéine C (PC)	62	Zymogène	Foie	OUI
Protéine S (PS)	70	Cofacteur	Foie, Endothélium	OUI
HCII*	65	Serpine	Foie	—
TFPI (inhibiteur du facteur tissulaire)	42	Inhibiteur de type Kunitz	Endothélium	—

* : le HCII est une autre serpine capable d'inhiber la thrombine

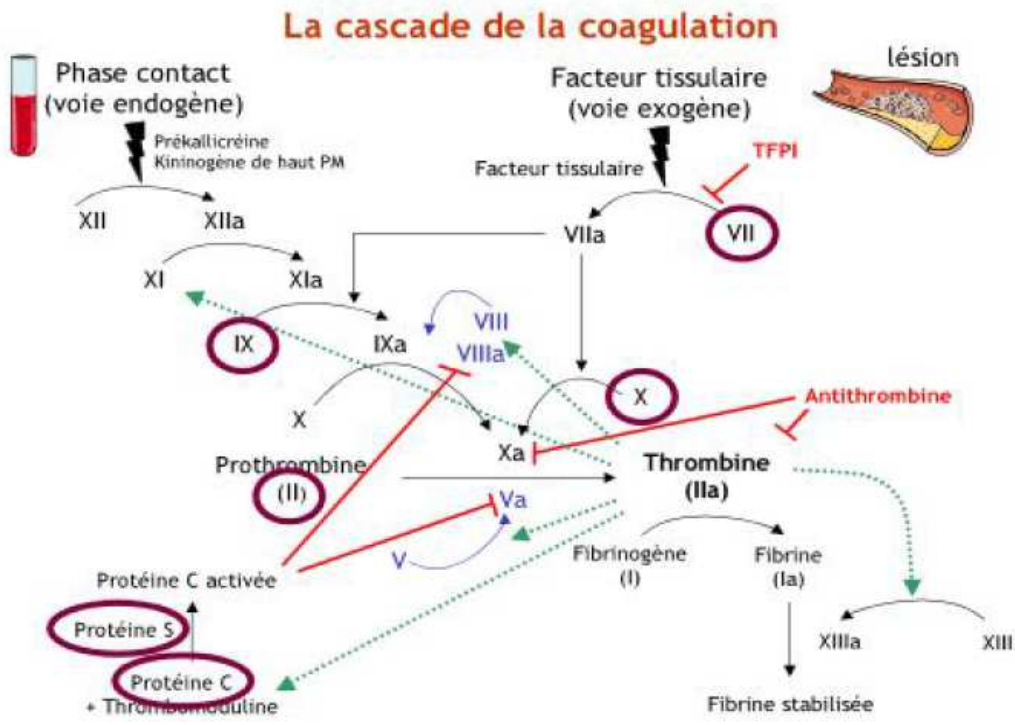


Figure 7 : Cascade de la coagulation et différents inhibiteurs physiologiques.

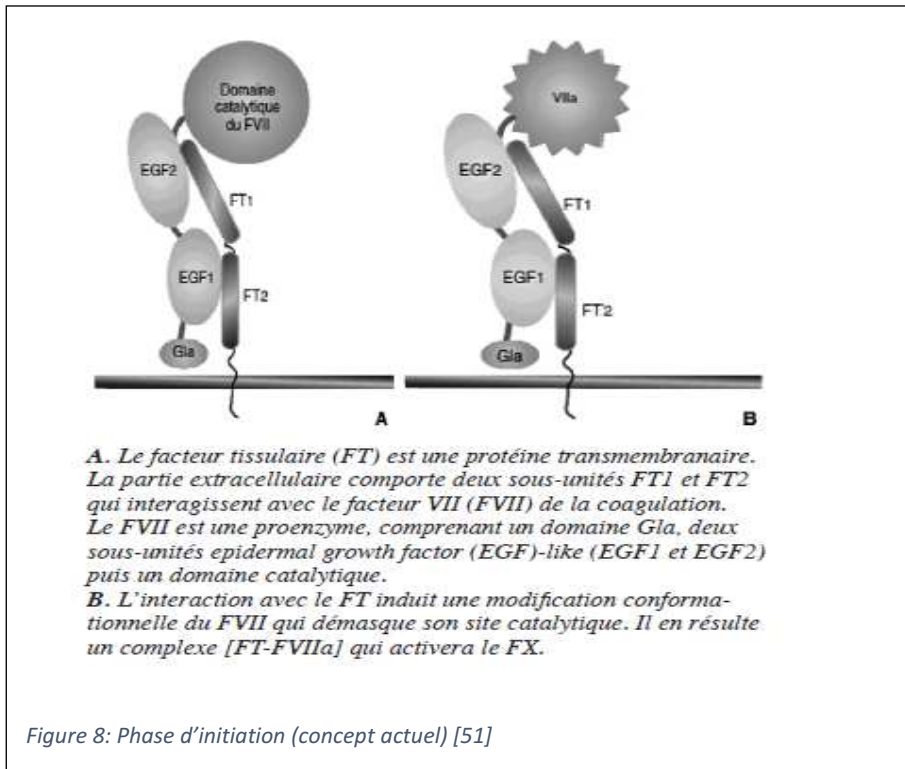


Figure 8: Phase d'initiation (concept actuel) [51]

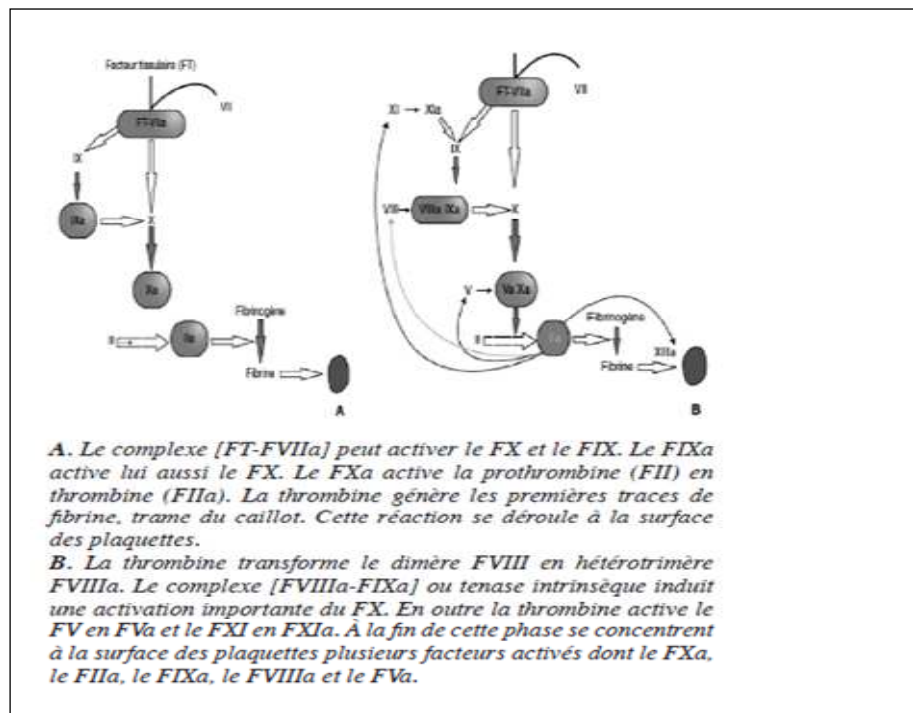


Figure 9: Phase d'amplification de la coagulation (concept actuel) [51]

➤ **La fibrinolyse**

La fibrinolyse fait suite à la coagulation. C'est un processus physiologique qui vise à assurer la reperméabilisation des vaisseaux thrombosés et la restitution de la circulation. Si la fibrinolyse est la dernière étape en hémostase, elle ne démarre pas à la fin du processus de la coagulation mais dès son lancement et ce pour limiter l'extension du caillot de la fibrine. Ce processus fait intervenir le plasminogène, synthétisé dans le foie et présent dans le plasma. Sous l'influence d'activateurs, le plasminogène (zymogène) se transforme en une serine protéase, la plasmine, qui scinde la fibrine en produits de dégradation solubles.

2. Les antivitamines K

Les AVK ont été découverts pour la première fois en 1920, au Canada par F. W Shofield et L.M. Roderick, vétérinaires de l'Alberta. Ils ont observé que l'ingestion de fourrage avarié à base de trèfle rouge et de mélilot, était responsable de la maladie hémorragique chez certains veaux.

En 1940-1941, le docteur Karl Paul Link, au cours de la recherche d'un poison pour rat, isola l'agent responsable : le dicoumarol (méthylène-3, 3'-bis [hydroxy-4] coumarine) et détermina son antagonisme avec la vitamine K.

En 1948, Karl Link synthétise un dérivé qu'il juge utilisable comme raticide et le baptise « warfarin ». En 1951, une recrue de la marine américaine tenta sans succès de se suicider avec de la warfarine. Son rétablissement rapide incita les cliniciens à envisager son application à l'homme du fait de ses propriétés anticoagulantes. En 1953, la warfarine est testée chez des volontaires humains, permettant sa commercialisation en 1954. Ainsi, elle deviendra la première molécule d'une grande classe thérapeutique, les antivitamines K. Des recherches ultérieures ont montré qu'il y a deux structures chimiques de base qui peuvent servir d'antagonistes de la vitamine K : La 4-hydroxycoumarine et la 1,3 –indanedione. (52)(53)

Dès lors jusqu'à ce jour, les AVK sont devenus un élément essentiel de la prise en charge de pathologies thrombotiques courantes (fibrillation auriculaire, valvulopathies, phlébothromboses...). Cependant, toutes les études épidémiologiques ont montré que ces médicaments arrivent en France au premier rang des accidents iatrogènes entraînant une hospitalisation. (54)

Les AVK sont des analogues structuraux de la vitamine K. On distingue :

- ✓ Les dérivés de la coumarine (les 4 hydroxycoumariniques) dont La structure de base est la 4-hydroxy coumarine. Ce sont les monocoumarines: La warfarine, l'acénocoumarol, le tiocloumarol et la phenprocoumone ; et les bicoumarines: Le biscoumacétate d'éthyle, le dicoumarol et le coumétarol.
- ✓ Les dérivés de l'indane-1, 3 – dione : Ils comprennent : La fluindione, la phénindione, l'anisindione et la bromindione.

2.1. La pharmacocinétique(55)(56)(57)

Les AVK sont administrés par voie orale. Leur résorption se fait de façon presque intégrale dans le tractus digestif au niveau de l'estomac et du jéjunum en 3 à 6 heures.

Une fois absorbée, la concentration maximale dans le plasma est atteinte en 2 à 6 heures selon les composés. Les AVK se lient de façon réversible à de l'albumine (plus de 97%) : la fraction liée représente un réservoir alors que l'activité anticoagulante dépend de la fraction libre. Celle-ci détermine le volume de distribution aux sites cellulaires. C'est cette fraction libre qui va gagner les hépatocytes et y exercer son action inhibitrice sur la vitamine K époxyde réductase et la vitamine K réductase.

Le métabolisme des AVK diffère selon qu'il s'agit d'un indanedione ou d'un dérivé coumarinique. Ce dernier groupe ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études. Ces dérivés coumariniques sont majoritairement métabolisés par l'hépatocyte par une mono-oxygénase, l'isoforme 2C9 du cytochrome P450 (CYP2C9) ; mais aussi d'autres comme CYP2C19, CYP3A4, CYP1A2.

L'excrétion se fait soit par la bile sous forme de dérivés inactifs, soit par la circulation sous forme liée à l'albumine qui sera filtrée au niveau glomérulaire. Au niveau de l'intestin, ces substances peuvent être réabsorbées par un cycle entérohépatique, puis excrétées par les urines. L'acénocoumarol n'est pas ou peu dégradé et est excrété sous forme inchangée dans les urines.

Les AVK traversent la barrière placentaire et diffusent dans le lait maternel ; de ce fait, ils peuvent induire des désordres hémorragiques chez le fœtus et des fœtopathies.

Tableau IV: Les AVK commercialisés

Famille pharmacologique	Dénomination commune internationale	Spécialités	Présentation	Demi-vie (heures)
Dérivés coumariniques	Phenprocoumone	Marcoumar®	Cp sécable 3mg	Longue 90 à 160 H
	Warfarine	Coumadine ®	Cp sécable 2mg et 5mg	Longue 35 à 4 H
	Acénocoumarol	*Sintrom ® Mini-sintrom®	Cp sécable 4mg Cp 1mg	Courte 8 à 9 H
Dérivés de l'indanedione	Fluidione	Previscan®	Cp quadriséc 20mg	Longue 30 H

*Seul Sintrom® est commercialisé au Maroc

2.2. La pharmacodynamie

Les AVK sont des composés chimiques de faible poids moléculaire, qui inhibent l'action de la vitamine K au niveau de l'hépatocyte et provoquent ainsi une diminution de l'activité biologique des facteurs vitamine K dépendants de la coagulation, le complexe PPSB : Prothrombine (II), Proconvertine (VII), Facteur antihémophilique B (IX) et le Facteur de Stuart (X).

La vitamine K apportée par l'alimentation ou synthétisée par la flore intestinale saprophyte est absorbée grâce aux sels biliaires. Elle représente, sous forme réduite, le co-substrat essentiel à la gamma-glutamyl-carboxylase, nécessaire à la maturation post traductionnelle des quatre facteurs de coagulation, les facteurs II, VII, IX, X, ainsi que de deux inhibiteurs de la coagulation, la protéine C et la protéine S.

Cette maturation vitamine K dépendante est réalisée dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes et permet la gamma carboxylation des résidus glutamates (Glu) des facteurs vitamines K dépendants en résidus gamma carboxyglutamates (Gla). Ceux-ci sont

indispensables pour permettre la liaison des facteurs via les ions calcium aux phospholipides anioniques des membranes plaquettaires lors de leur activation.

Ainsi, pour chaque résidu glutamate carboxylé en gamma, une molécule de vitamine K réduite (KH₂) est consommée et une molécule de vitamine K époxyde (KO) est formée. Celle-ci devra être recyclée en vitamine K quinone grâce à la sous unité 1 du complexe de vitamine K époxyde réductase (VKORC1), puis en vitamine K réduite (KH₂) sous l'action non encore élucidée de la vitamine K époxyde réductase ou d'une autre réductase.

En l'absence de vitamine K, les facteurs ne sont pas gamma carboxylés et ne peuvent pas se fixer sur ces surfaces qui sont nécessaires aux interactions des facteurs de la coagulation. Par conséquent, la vitesse de coagulation est ralentie. L'activité des antivitamines K repose alors sur l'inhibition du cycle de régénération de la vitamine K.

Les enzymes cibles sont les deux réductases responsables du recyclage de la vitamine K1 époxyde (KO). La formation de vitamine K1 réduite (KH₂) est donc interrompue ce qui inhibe la gamma carboxylation. Ce n'est que récemment que l'on a reconnu l'effet de la vitamine K sur la gamma carboxylation de la protéine C et de la protéine S. Bien qu'il soit difficile d'évaluer l'importance respective de ses effets sur les facteurs de la coagulation et sur ce système inhibiteur, on sait que les malades qui présentent des thromboses en rapport avec un déficit constitutionnel en ces deux inhibiteurs tirent bénéfice d'un traitement anticoagulant par les AVK.

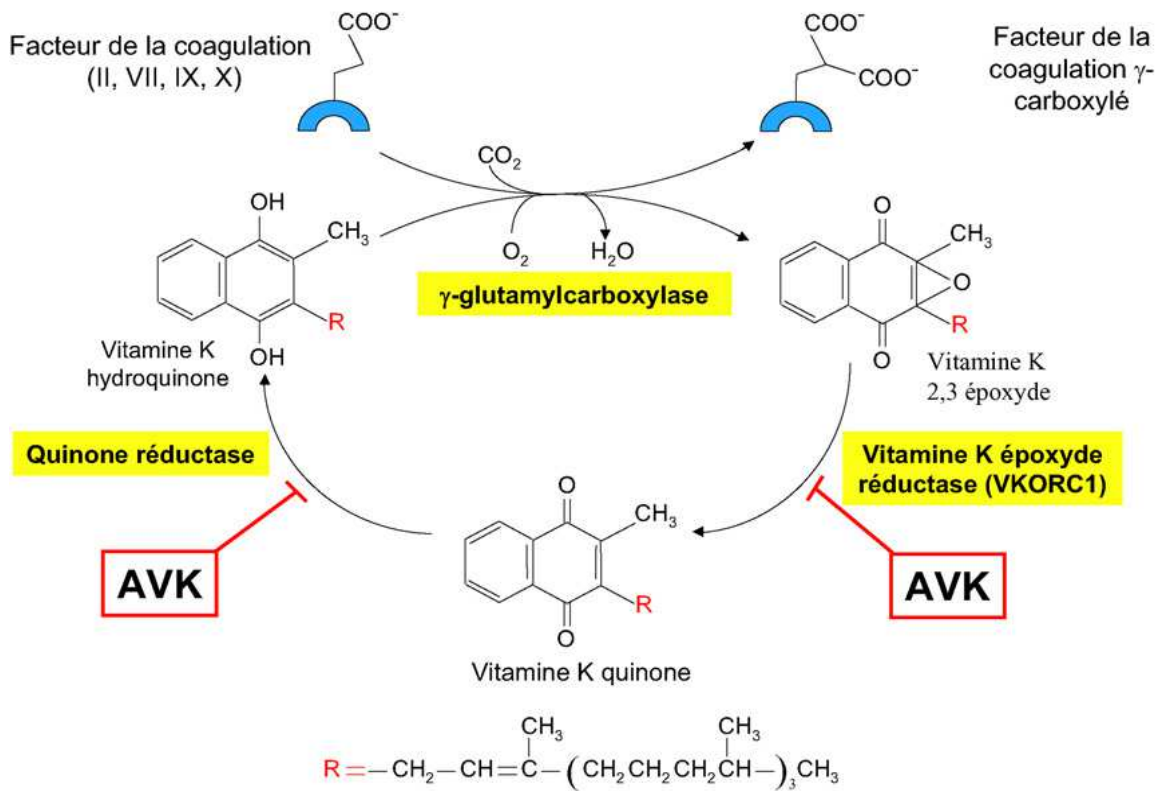


Figure 10 : Cycle de la vitamine K : rôle de VKORC1 et inhibition par les AVK.

2.3. Les indications thérapeutiques

Les AVK sont indiqués dans la prévention des complications thromboemboliques des cardiopathies emboligènes et des infarctus du myocarde compliqués ; et dans le traitement des thromboses veineuses profondes (TVP) et des embolies pulmonaires (EP), ainsi que la prévention de leurs récives.

L'annexe 1 résume les différentes indications, les durées de traitement et les principales recommandations.

2.4. Les contre-indications(58)(59)(60)

Le traitement par les AVK est utilisé dans le cadre de pathologies graves. Mais il peut entraîner des accidents iatrogènes majeurs dont la gravité potentielle oblige, avant l'instauration d'un traitement, à vérifier l'absence de contre-indications. Celles-ci sont de deux types :

➤ Les contre-indications absolues

Parmi lesquelles :

- Allergie connue au médicament ou à l'un des excipients ;
- Hypertension artérielle sévère non stabilisée (pression artérielle systolique >173 mm Hg et/ou pression artérielle diastolique > 110 mm Hg) ;
- Insuffisance rénale grave (clairance de la créatinine < 20 ml/min) ;
- Insuffisance hépatique sévère
- Chirurgie intracrânienne ou traumatisme crânien récent
- Accident vasculaire cérébral récent
- Ulcère gastroduodéal en évolution
- Cirrhose hépatique décompensée
- Varices œsophagiennes
- Premier et troisième trimestre de grossesse
- En cas d'allaitement (cas des indanediones)
- En cas d'intolérance au gluten (certains AVK comme le Previscan contiennent le blé comme excipient)

➤ **Les contre-indications relatives**

- Intervention chirurgicale récente ;
- Sujets âgés (hypocoagulabilité modérée et surveillance fréquente recommandée) ;
- Insuffisances rénale et hépatique modérées ;
- Troubles psychiques graves ;
- En cas de rétinopathie diabétique hémorragique ;
- En cas de pancréatite aiguë ;
- Pour l'acénocoumarol : en cas de galactosémie congénitale, de syndrome de malabsorption du glucose et du galactose ou de déficit en lactase.

Ces contre-indications ne sont jamais formelles, le bénéfice thérapeutique de l'anticoagulation peut être plus important que le risque hémorragique, mais cela doit s'accompagner d'une réduction des doses et d'un suivi biologique accru.

2.5. Les effets indésirables(60)(61)(62)(63)

➤ **Les manifestations hémorragiques**

Les accidents hémorragiques imputables aux AVK représentent la première cause d'accident iatrogène. Les accidents hémorragiques peuvent être majeurs ou mineurs. Selon le tableau suivant.

Tableau V: Les accidents hémorragiques sous AVK

Types d'hémorragies	Localisations	Description
Majeures	Système nerveux central	Il peut s'agir d'hématomes sous duraux, d'hémorragie sous-arachnoïdienne, ou d'hémorragie médullaire(64)
	Digestive	Les hémorragies digestives extériorisées
		Les hématomes intra muraux de l'intestin Les hémorragies hépatiques, spléniques et pancréatiques (rares)
	Parties molles	Les membres (souvent associées à un traumatisme)
		Hématomes des parois de la cavité abdominale
	Hématomes péri rénaux sous antivitamines K (65)	
	Gynécologique	Les ménométrorragies
		Les hémopéritoines
	Hémorragies des séreuses(66)	
	Autres(66)	Nécrose hémorragique des surrénales
Hématomes par piqûre artérielle		
Hémorragies intra pulmonaires		
Hémorragies de la sphère ORL Hématomes du corps caverneux		
Mineures	Epistaxis gingivorragies, crachats hémoptoïques, ecchymoses sous-cutanées et sous-muqueuses, hyperménorrhées et hématurie.	Elles sont fréquentes et constituent un signe d'alarme qui impose une mise au point permettant de réajuster le traitement.

➤ **Les manifestations immuno-allergiques**

Ces effets non-dose-dépendants sont des complications plus rares que les manifestations hémorragiques. Ils s'observent surtout avec les dérivés de l'indanedione qui peuvent induire chez certains patients des états d'hypersensibilité humorale ou cellulaire. Le tableau clinique peut associer différents symptômes :

- Œdème local, œdème de Quincke ;
- Cytopénie par atteinte périphérique ou médullaire (leuconéutropénie, voire agranulocytose, thrombopénie et exceptionnellement pancytopenie) ;
- Insuffisance rénale par néphrite tubulo-interstitielle ou par atteinte glomérulaire secondaire à une vascularite allergique ;
- Augmentation des ALAT, ASAT, phosphatases alcalines voire hépatite avérée le plus souvent mixte à prédominance cholestatique ;
- Rarement une dyspnée peut être le témoin d'une pneumopathie interstitielle ;
- Rarement vascularites cutanées volontiers très purpuriques, stomatite ;
- Fièvre, hyperéosinophilie qui peuvent être isolées et constituer chacune le premier signe du développement d'un état d'hypersensibilité.

L'arrêt du traitement s'impose. Il est en générale suivi d'une guérison sans séquelles. Il est contre-indiqué de réadministrer un autre dérivé de l'indanedione (réaction croisée). Avec les dérivés coumariniques, des effets immuno-allergiques ont également été décrits.

➤ **Les manifestations cutanées**

Les réactions cutanées induites par les AVK doivent être diagnostiquées rapidement en raison de la morbidité potentielle associée.

- Les réactions allergiques :

Des réactions allergiques cutanées aux AVK ont été rapportées, aussi bien avec les coumariniques qu'avec les dérivés de l'indanedione. Elles sont classées comme des réactions retardées de type IV. Elles peuvent être généralisées et prurigineuses et nécessiter l'arrêt du produit. Les réactions croisées entre les deux classes des AVK sont exceptionnelles et l'attitude est tout simplement d'essayer de changer de classe chimique. On peut citer :

- Prurit, urticaire, rash ;
- Eczéma ;

- Exanthème maculo-papuleux.

Ces réactions sont réversibles après arrêt du traitement.

- Les nécroses cutanées

La nécrose cutanée est un effet secondaire rare, mais grave de l'usage des AVK. L'incidence de cette complication est estimée entre 1/1000 et 1/10000 des patients traités par des AVK.

- Le syndrome des orteils pourpres

Le syndrome des orteils pourpres (« *purple toe syndrome* ») est une complication extrêmement rare des AVK, affectant principalement la population masculine. Trois à huit semaines après l'instauration de l'anticoagulant, une coloration violacée apparaît sur les orteils et les bords latéraux des pieds. Ces zones sont sensibles et froides à la palpation alors que le patient se plaint de sensation de brûlure. L'arrêt des AVK entraîne une rapide atténuation des douleurs et des sensations de brûlure. La coloration violacée peut par contre persister plusieurs mois. Des nécroses et gangrènes menant à la perte des membres inférieurs ont en effet été décrites.

➤ **Les fœtopathies**

Les AVK franchissent la barrière placentaire et pourraient donc favoriser des complications hémorragiques chez le fœtus. Ils peuvent par ailleurs être tératogènes lorsqu'ils sont administrés pendant le premier trimestre de la grossesse. La possibilité de fausse couche est rapportée pendant toute la durée de la grossesse. Au 3^{ème} trimestre, une hypocoagulabilité excessive, liée à un surdosage en AVK, pourrait entraîner des morts fœtales *in utero*.

➤ **Autres réactions**

Il a également été décrit d'autres effets indésirables, généralement mineurs, et régressant avec l'arrêt du traitement :

- Des troubles digestifs avec les AVK : nausées, vomissements, éventuellement diarrhée accompagnée ou non de stéatorrhée ;
- Une alopécie : des cas cliniques ont été rapportés sous AVK, les plaques d'alopécie peuvent être étendues nécessitant l'arrêt du traitement, mais sont alors réversibles ;
- Des arthralgies isolées.

3. La surveillance du traitement par les Antivitamines K

3.1. Le temps de Quick(67)

Le temps de Quick représente la mesure du temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes, décalcifié, à 37°C avec l'apport de thromboplastine calcique en excès. Le temps de Quick explore trois facteurs vitamine K-dépendants (II, VII et X) ainsi que les facteurs V et le fibrinogène. Il n'est donc pas spécifique des traitements par les AVK. L'expression du temps de Quick varie et se fait :

- ✓ Soit en seconde (valeur normale= 11 à 13s).
- ✓ Soit en rapport de coagulation : par rapport au plasma témoin d'un sujet en bonne santé. Normalement le rapport est supérieur ou égal à 0,70.
- ✓ Soit en pourcentage d'activité, improprement appelé « taux de prothrombine ». Normalement, le taux de prothrombine est supérieur ou égal à 70 %. Légalement l'expression du taux de prothrombine en pourcentage n'est plus utilisée en France depuis août 2003.

3.2. L'International Normalized Ratio(68)

Ce n'est qu'en 1983 que l'OMS a recommandé l'utilisation de *l'International Normalized Ratio (INR)* pour remplacer l'expression en secondes ou en pourcentages du temps de Quick dans la surveillance des traitements par les AVK. L'INR, a permis d'harmoniser le langage international commun.

$$INR = (M/T)^{ISI}$$

INR : International Normalized Ratio

T : Temps de coagulation d'un pool de plasmas témoins normaux.

M : Temps de coagulation du plasma du malade.

ISI : Index de sensibilité de la thromboplastine utilisée dans le laboratoire local, déterminé par comparaison avec les premières préparations de thromboplastines de référence internationale de l'OMS (dont l'ISI par définition est égal à 1).

3.2.1. Quelle valeur cible pour l'INR ?

En dehors de tout traitement par les AVK, l'INR d'un sujet normal est proche de 1.

Pour la plupart des indications l'INR doit être compris entre 2 et 3 avec une valeur cible de 2,5. Ceci signifie que l'INR idéal vers lequel il faut tendre est 2,5. Un INR inférieur à 2 reflète une anticoagulation insuffisante et un INR supérieur à 3 traduit un excès d'anticoagulation.

Dans certaines indications comme dans la « Prévention des complications thromboemboliques artérielles et veineuses des cardiopathies emboligènes avec les prothèses valvulaires mécaniques », l'INR cible dépend du type de prothèse et des caractéristiques du patient.

Dans tous les cas un INR supérieur à 5 est associé à une majoration du risque hémorragique.(69)

Tableau VI: l'INR en fonction du type de prothèses et des caractéristiques du patient [71]

	Facteurs de risque liés au patient*	
	aucun	≥1
Risque thrombogénique intrinsèque de la prothèse	aucun	≥1
Faible : prothèses ayant fait la preuve de leur efficacité avec une anticoagulation modérée	2,5	3
Elevé : prothèses d'ancienne génération, en particulier à bille	3,5	4
Moyen : toutes les autres prothèses, y compris d'introduction récente	3	3,5

*Facteurs de risque liés au patient : position mitrale, tricuspide ou pulmonaire de la prothèse ; antécédents thromboemboliques ; grosse OG > 50 mm ; sténose mitrale quel que soit le degré ; FE < 35 % ; certains troubles du rythme auriculaire tels que fibrillation auriculaire, flutter, tachycardie atriale.

3.2.2. Quel rythme pour les contrôles biologiques ?(70)

Avant initialisation de traitement, il est recommandé de faire un contrôle de l'INR afin de détecter d'éventuels troubles de la coagulation et de pouvoir ainsi adapter au mieux la posologie initiale.

Le premier contrôle doit s'effectuer après la 3^{ème} prise d'AVK (c'est-à-dire le matin du 4^{ème} jour), pour dépister une hypersensibilité individuelle : un INR supérieur à 2 annonce un surdosage avant l'obtention de l'équilibre et doit faire réduire la dose.

Le deuxième contrôle s'effectue en fonction des résultats du premier INR, pour apprécier l'efficacité anticoagulante (selon les cas, entre 3 à 6 jours après le premier contrôle).

Les contrôles ultérieurs doivent être pratiqués (1 à 2 fois par semaine) jusqu'à stabilisation de l'INR, puis avec un espacement progressif jusqu'à un intervalle maximal de 1 mois. L'équilibre du traitement n'est parfois obtenu qu'après plusieurs semaines.

Après un changement de posologie, le premier contrôle doit être fait 3 jours après une modification de dose, les contrôles doivent être répétés jusqu'à stabilisation (1 à 2 fois par semaine).

4. Les facteurs influençant le traitement par les antivitamines K

4.1. L'influence des facteurs environnementaux

Pendant longtemps, les facteurs environnementaux ont été mis au premier plan pour expliquer les variations de la réponse inter- et intra-individuelle au traitement (figure 8).

Citons les données démographiques du patient (âge, sexe, indice de masse corporelle, les apports alimentaires en vitamine K, les comorbidités (insuffisance hépatique, insuffisance rénale sévère, insuffisance cardiaque, dysthyroïdies...), les pathologies intercurrentes aiguës (fièvre, sepsis, poussée d'insuffisance cardiaque, diarrhées...) et les médicaments coprescrits(71)(72). (Voir annexes 2 et 3)

Les sujets recevant des AVK au long cours sont sensibles aux fluctuations du taux de vitamine K alimentaire, ou d'aliments s'opposant à l'action des AVK (73). (Voir teneur en vitamine K des aliments en annexe 4).

L'ingestion de légumes verts en grandes quantités, permettrait parfois d'atteindre un apport équivalent à 0.5 mg de vitamine K. Sachant que 1 mg per os ou 0.5 mg par voie intraveineuse sont suffisants pour diminuer rapidement l'INR, l'apport en légumes verts doit être parcimonieux chez les patients sous AVK(74). La prise concomitante de produits poly vitaminés : vitamines A, E et C, semble potentialiser l'effet des AVK(75). Des précautions sont à prendre en cas de malabsorption ou d'une alimentation uniquement parentérale sans apport en vitamine K.

Des études multi variées ont permis aux auteurs de montrer que la vitamine K alimentaire est un facteur environnemental important, actif et indépendant. (73)(76)

L'attention doit être attirée sur le rôle des herbes médicinales, des « suppléments botaniques » et des régimes riches en lipides et pauvres en fibres qui augmenteraient l'activité du facteur VII, mais ce rôle reste discuté. On doit y penser lors d'une variation inexplicée de l'INR (77). L'intoxication éthylique aiguë potentialise l'effet des AVK. Il existe au contraire au cours de l'éthylisme chronique une induction enzymatique qui antagonise l'effet du traitement.

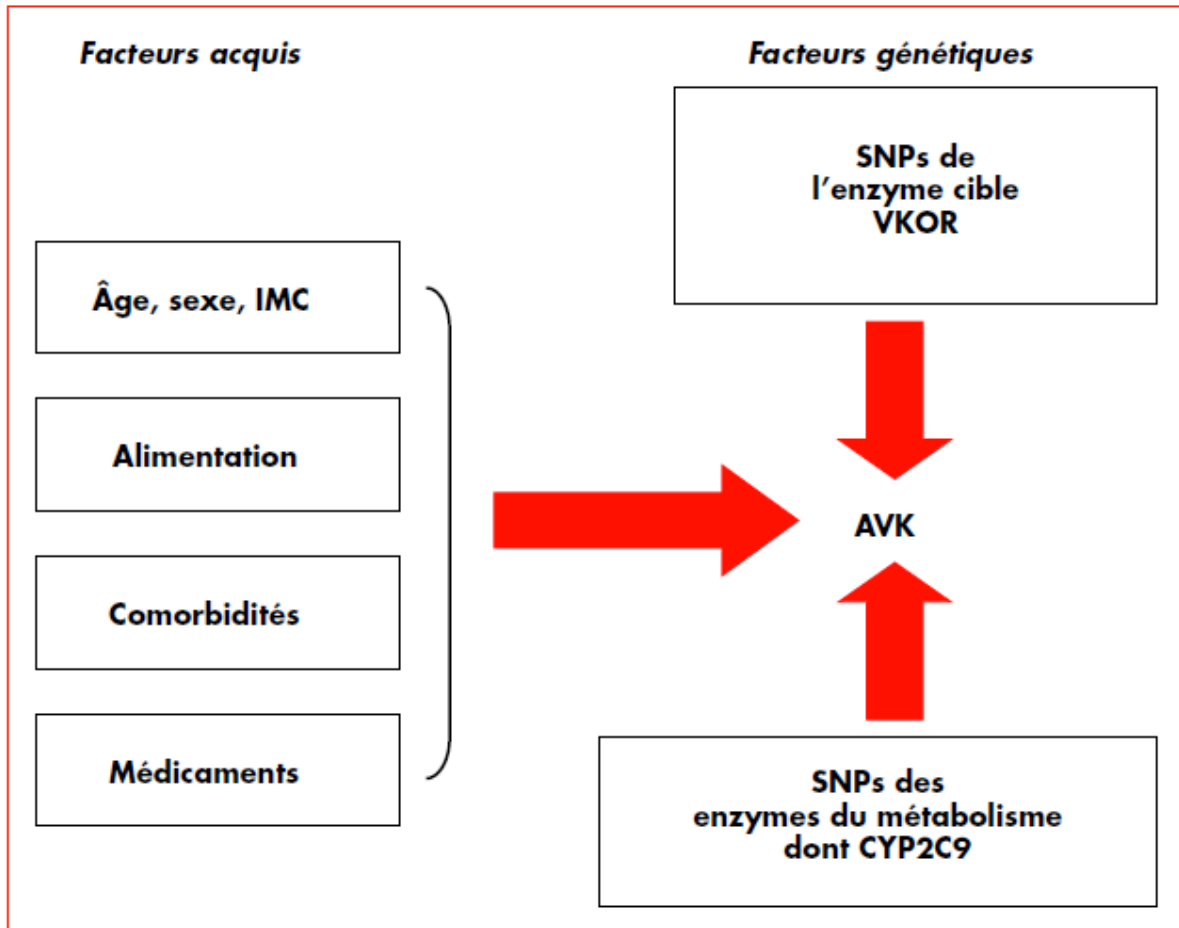


Figure 11: Facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans la variabilité de la dose à l'équilibre chez le patient traité par les AVK.

4.2. L'influence des facteurs génétiques(78)(79)

La pharmacogénétique des AVK a été explorée ces dix dernières années de manière très extensive à travers de grandes études cliniques (plus de 5 000 patients). En effet, la combinaison des polymorphismes de CYP2C9 et de VKORC1 a permis d'expliquer environ 30% de la variabilité individuelle de la posologie à l'équilibre, alors que les facteurs cliniques seuls n'en expliquent que 17 à 21 %.

4.2.1. Facteurs associés à la résistance aux antivitamines K

La résistance aux AVK est une situation rare (< 0,1%) définie par la nécessité d'utiliser des posologies de Warfarine supérieures à 70mg/semaine afin d'atteindre l'INR cible. Elle peut être héréditaire ou acquise(78).

La caractérisation du gène VKORC1 a initialement permis d'expliquer des phénomènes de résistance aux AVK chez des patients nécessitant des doses très élevées de warfarine (posologie supérieure à 15 mg par jour). Des mutations rares dans la région codante du gène ont ainsi été associées à une résistance à la warfarine. Ces mutations aboutissent à un changement d'acide aminé dans la séquence protéique : Val29Leu, Val45Ala, Arg58Gly, Val66Met et Leu128Arg. L'expression des différentes protéines mutantes dans des cellules HEK293 a permis de montrer que l'activité basale de VKORC1 était diminuée et surtout que l'enzyme mutée était moins sensible à l'inhibition par la warfarine, ce qui pourrait être à l'origine de la résistance au traitement anticoagulant.

La prise en charge des patients présentant une résistance aux AVK nécessite soit une augmentation importante des posologies ou une substitution par un autre AVK dans le cadre d'une résistance relative. L'arrivée des nouveaux anticoagulants oraux tels que le rivaroxaban, l'apixaban, ou le dabigatran pourrait constituer une excellente alternatives thérapeutique ou en cas de résistance aux AVK (78)

4.2.2. Facteurs associés à l'hypersensibilité aux antivitamines K

Des polymorphismes fréquents des gènes liés au métabolisme (CYP2C9) et à la cible pharmacologique des AVK, sont associés à une hypersensibilité pouvant aboutir à des surdosages et des accidents hémorragiques potentiellement graves, conduisant à une réduction de posologie.

4.2.2.1. Le polymorphisme génétique du CYP2C9 et dose des AVK

De nombreuses études ont mis en évidence le fait que des diminutions de posologie de la warfarine et de l'acénocoumarol étaient nécessaires chez les sujets porteurs des variants alléliques du CYP2C9 pour obtenir un INR dans la cible thérapeutique (entre 2 et 3).(79)

Il existe une vingtaine de variants pour le CYP2C9, dont les fréquences varient en fonction des ethnies. L'allèle CYP2C9*1 correspond à la forme sauvage et constitue la séquence de référence. Les variants alléliques peuvent être présents à l'état homozygote ou hétérozygote.

Les deux allèles variants du CYP2C9 les plus fréquents dans la population caucasienne sont les allèles CYP2C9*2 (Arg144Cys correspondant à une mutation dans l'exon 3) et CYP2C9*3 (Ile359Leu correspondant à une mutation dans l'exon 7), retrouvés respectivement à des fréquences de 12% et 8%. Ainsi, près de 40% de la population caucasienne est porteuse d'au moins un allèle variant CYP2C9*2 ou CYP2C9*3.

Une étude marocaine menée par SMIRES FZ et al a montré que les fréquences des trois mutations étudiées sont variables, la majorité des patients ayant des mutations CYP2C9*2 et CYP2C9*3 appartiennent au groupe recevant de faibles doses d'acenocoumarol(80). Enfin, comparé à la warfarine, l'influence du polymorphisme génétique CYP2C9*2 semble absent pour l'acénocoumarol(81). Pour la fluindione, il a récemment été montré une influence du CYP2C9*3 sur l'INR au début du traitement (82). Différentes études cliniques ont montré pour les AVK une liaison entre le génotype du CYP2C9 et la dose moyenne à l'état d'équilibre, ainsi que le temps pour atteindre l'équilibre (83)

4.2.2.2. Le polymorphisme génétique de VKORC1 et sensibilité de la réponse aux antivitamines K

Plusieurs polymorphismes génétiques de VKORC1 ont été décrits comme étant associés à une sensibilité aux AVK.

Des polymorphismes localisés dans le promoteur du gène VKORC1 ou dans les séquences introniques, induisent une hypersensibilité.

Un polymorphisme intronique (1173C>T, intron 1) induit une diminution significative (de l'ordre de 50%) des doses chez les porteurs du génotype TT.

Un polymorphisme dans le promoteur (1639G>A), dont les sujets porteurs homozygote AA correspondent à des individus « hypersensibles » aux AVK.(84)

Pour simplifier, la détermination de l'haplotype A, le génotypage du seul SNP VKORC1 – 1639G>A est apparu suffisant pour classer les sujets (85). La fréquence du variant – 1639 A est de l'ordre de 37% dans la population caucasienne, de 85 % chez les Asiatiques et seulement de 9,5 % chez les Afro-Américains (86).

4.2.2.3. L'effet cumulé des polymorphismes de CYP2C9 et de VKORC1

Depuis la découverte du gène codant pour *VKORC1*, les études de pharmacogénétique menées sur les AVK ont cherché à évaluer l'impact cumulé des polymorphismes du *CYP2C9*

et de *VKORC1* sur la variabilité dans la réponse, démontrant alors l'effet additif de ces polymorphismes(84)(85)(86)(87)(88). En effet, les patients porteurs simultanément des deux gènes mutés ont des doses à l'équilibre plus faibles que les porteurs de 0 ou 1 gène muté (réduction de 50 % de la posologie moyenne). De nombreux auteurs ont montré que les patients porteurs d'au moins un allèle muté de *CYP2C9* ou de *VKORC1* étaient plus exposés à un risque de surdosage, à un délai plus long pour la stabilisation du traitement et/ou à un risque accru de saignement(89)(90)(91)(92). Ce risque hémorragique ou de surdosage est particulièrement élevé durant la phase d'instauration du traitement : cette période est une période à haut risque de surdosage chez les porteurs d'au moins deux allèles mutés du *CYP2C9* et/ou de *VKORC1* du fait de doses initiales standardisées trop élevées chez ces patients hypersensibles, d'où des difficultés pour ensuite stabiliser le traitement.

4.2.2.4. Différents gènes candidats et sensibilité de la réponse aux antivitamines K

Un certain nombre de gènes candidats impliqués dans le cycle de la vitamine K ont été analysés (*CYP4F2*, *GGCX*, *EPHX1*, etc.)

- ✓ **Le *CYP4F2*** est une enzyme dont l'action sur le métabolisme de la vitamine K époxyde intervient avant l'étape réalisée par *VKORC1*. Seul un polymorphisme génétique *CYP4F2* (C1347T, rs2108622, fréquence de 24 à 30 % chez les Caucasiens) a été retrouvé comme pouvant expliquer 1,1 % de la variabilité de la dose de warfarine et d'acénocoumarol(93)(94), mais il n'a aucun effet pour la fluindione(95). Le variant 1374T *CYP4F2* a pour conséquence une activité enzymatique *CYP4F2* diminuée, ce qui conduit à une accumulation de la vitamine K époxyde et donc à plus de substrat pour *VKORC1*(94).
- ✓ **La gamma glutamyl carboxylase** (gène *GGCX*). certaines anomalies de ce gène sont associées à des doses quotidiennes de warfarine à l'équilibre significativement diminuées, alors que d'autres sont associées à des doses élevées (3). C'est ainsi que des polymorphismes du gène ont été étudiés chez des patients prenant la warfarine. Un SNP situé dans l'intron 2, rs12714145 G> A, a été associé à une augmentation de 3,3% des besoins en dose de warfarine par allèle A dans une étude suédoise de 201 patients. Plus récemment, *GGCX* rs11676382 C> G, situé dans l'intron 14, corrélé avec des doses plus

faibles de warfarine dans une étude monocentrique de 186 Européens américains, expliquant 2% de la variance totale de la dose d'entretien de la warfarine dans un modèle génétique dominant.

- ✓ **La protéine C** (gène PROC) : protéine inhibiteur de la coagulation vitamine k dépendante. Deux polymorphismes du promoteur et un polymorphisme intronique pourraient expliquer 7 à 9% de la variation de la dose de warfarine .(3)
- ✓ **L'époxyde hydrolase** (gène EPHX1) : cette protéine ferait partie de complexe vitamine k réductase. Certains polymorphismes ont été identifiés et leur présence implique le besoin d'augmenter les doses de warfarine pour obtenir l'INR cible, mais ces résultats ne sont pas statiquement significatifs (3).
- ✓ **CALU** : VKOR est associé à une protéine chaperone liée au Ca²⁺, indispensable à la coagulation, la caluménine, qui a été décrite comme étant un inhibiteur de la gammacarboxylation vitamine k- dépendante, la caluménine se lie notamment à VKOR empêchant la warfarine de se lier à sa cible et se trouve donc responsable d'une sorte de résistance à la warfarine(3).
- ✓ **APOE** : dans le plasma, la vitamine k1 apportée par l'alimentation se lie aux chylomicrons ainsi qu'aux remnants ; ce complexe est ensuite pris en charge pour être métabolisé au niveau du foie ou des tissus périphériques par l'apolipoprotéine E (ApoE). Les patients présentant des mutations du gène codant pour cette protéine nécessitent des doses plus faibles de dérivés coumariniques pour obtenir le même niveau d'anticoagulation (3).



*Partie
expérimentale*

I. Objectifs du travail

Ce travail s'inscrit dans un projet de thèse de doctorat mené par Mr Abdelhak EL KHAZRAJI au sein du laboratoire de biotechnologie médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, portant sur la pharmacogénomique des AVK au Maroc dont le but est de caractériser et déterminer les polymorphismes impliqués dans la réponse aux AVK de Mille et Un patients marocains afin d'établir des algorithmes prédictifs de dose des AVK pour le patient marocain.

Nos objectifs spécifiques sont :

- de donner un aperçu du processus d'une étude pharmacogénétique
- et d'établir un flux de travail regroupant les techniques à appliquer au laboratoire pour réaliser l'étude pharmacogénétique des AVK pour les six SNP impliqués : VKORC1-1639 G>A, VKORC1 1173 C>T, CYP2C9*2 430 C>T, CYP2C9*3 1075 A>C, CYP4F2 1347 G>A et GGCX 12970 C>G.



Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

1. Ethique et consentement

L'approbation éthique pour cette étude a été obtenue auprès du Comité d'Ethique de Recherche Biomédicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohamed V.

Pour chaque patient, une fiche d'information a été complétée avec des données épidémiologiques. Un consentement éclairé écrit a été obtenu de tous les patients après avoir été informé du but de notre travail.

2. Echantillons collectés

Nous avons travaillé sur les échantillons de 102 patients de différentes régions du Maroc. Ce sont des patients ayant consulté dans les différents services cliniques de l'Hôpital militaire Mohamed V de Rabat pour la surveillance de la maladie thromboembolique (TE), de la fibrillation auriculaire (FA) ou des valvules cardiaques.

Les patients avaient 17 ans ou plus et prenaient une dose d'entretien d'anticoagulant pour maintenir un rapport international normalisé (INR) de 2,0-3,0 pour les patients atteints de la maladie TE ou de la FA et de 3,0-4,5 pour les patients valvulaires cardiaques. Les cas qui ont été définitivement retenus dans notre étude étaient ceux dont l'exigence de dose AC a persisté constante pendant au moins quatre visites cliniques successives. Pour chaque patient, un échantillon de sang a été recueilli (4 ml) dans un tube stérile EDTA et conservé à 4 ° C jusqu'à traitement ultérieur pour l'extraction de l'ADN.

L'analyse moléculaire a été menée sur le plateau technique du Laboratoire de Biotechnologie médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat durant la période allant de Décembre 2016 à Mars 2017.

3. L'étude pharmacogénétique

3.1. L'extraction et la purification de l'ADN

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes étude de biologie moléculaire.

Elle se fait en deux étapes :

- Une étape d'extraction : par la digestion des tissus et lyse des cellules,

- Et une étape de purification : qui consiste à la séparation de l'ADN des autres constituants cellulaires.

Nous avons travaillé à partir du sang total recueilli sur des tubes l'EDTA comme anticoagulant. Les échantillons ont été conservés au congélateur à -20°C puis ont subi une décongélation à température ambiante avant le début des tests.

Chaque tube a été identifié par des numéros d'ordre qui leur ont été assignés.

L'extraction a été faite selon deux méthodes : l'extraction par la méthode classique au phénol-chloroforme et par une méthode utilisant un kit d'extraction sur colonne de résine (QIAGEN®).

3.1.1. L'extraction de l'ADN par la méthode au phénol chloroforme

Cette méthode est basée sur le principe de l'extraction liquide-liquide où un soluté est transféré d'une phase **liquide** à une autre phase **liquide** non-miscible à la première. Ce transfert repose sur la différence d'affinité du soluté entre les deux phases.

Les cellules et les membranes nucléaires sont détruites par l'action combinée de la SDS et de la protéinase K active à 56°C. Les débris cellulaires de la lyse, principalement de nature protéique, sont capturés par des solvants organiques tels que le phénol et le chloroforme.

L'ADN, insoluble dans la phase organique (phénol), est présent dans la phase aqueuse non miscible (chloroforme).

L'ADN est précipité dans l'éthanol, lavé, séché et dissout à nouveau en solution, dans de l'eau ultra pure.

❖ **Équipement et matériaux**

- Des tubes Eppendorf de 1,5ml et 2ml
- Des pipettes graduées de 50ml et 100 ml
- Des micropipettes réglables
- Des embouts stériles
- Une centrifugeuse
- Des gants jetables
- Des masques de protection.

❖ **Réactifs et solutions**

À conserver à température ambiante :

- TRIS EDTA
- EDTA
- NaOH (PASTILLE)
- SDS 20%
- L'éthanol absolu
- Phénol
- Chloroforme

À conserver à 4 ° C

- Proteinase K à 20 mg/ml

❖ **Protocole**

L'extraction a été réalisée selon les étapes suivantes

- 1) Prélever 1 ml de sang dans un tube de 5 ml.
- 2) Ajouter Tris/EDTA 20/5 mM.
- 3) Centrifuger à 4500 trs/min pendant 10-15 minutes à 4°C.
- 4) Enlever le surnageant.
- 5) Ajouter du Tris/EDTA
- 6) Centrifuger et répéter l'opération jusqu'à l'obtention d'un culot clair.
- 7) Récupérer le culot et ajouter 300 µl de tampon d'extraction contenant le SDS dans un tube de 2 ml ou 1,5ml.
- 8) Ajouter 20 µl de Protéinase K (20 mg/ml)
- 9) Incuber toute la nuit à 42°C.
- 10) Après l'obtention d'une solution claire, ajouter 300 µl de Phénol.
- 11) Centrifuger à 4500 trs/min pendant 15 min.
- 12) Récupérer le surnageant.
- 13) Ajouter au surnageant 300µl de Phénol.
- 14) Centrifuger à 4500 trs/min pendant 15 min.
- 15) Récupérer le surnageant.
- 16) Ajouter au surnageant 300µl de Chloroforme.
- 17) Centrifuger à 4500 trs/min pendant 15 min.
- 18) Récupérer le surnageant.

- 19) Ajouter 2V (600µl) d'Ethanol absolu.
- 20) Bien agiter à la main jusqu'à obtention de la méduse.
- 21) Récupérer la méduse par la micropipette ou par centrifugation.
- 22) Ajouter 100µl d'eau ultra pure pour redissoudre.
- 23) Congeler à – 20°C.
- 24) vérification de la quantité et de la pureté de l'ADN.

3.1.2. L'extraction de l'ADN par une méthode utilisant les colonnes de résines échangeuses d'ions

Pour l'extraction, nous avons utilisé le Kit de QIAamp® DNA Mini Blood de QIAGEN.(96)

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée selon le spin protocole pour le sang et liquides biologiques.

Nous avons procédé selon les différentes étapes suivantes :

❖ Préparation du matériel

Avant de commencer toute manipulation, il faut :

- ✓ Laisser les échantillons revenir à température ambiante (15-25°C) s'ils ont été préalablement conservés au congélateur ou au réfrigérateur.
- ✓ Faire chauffer le bain-marie à 56 ° C pour l'étape 4.
- ✓ Ramener le tampon AE à température ambiante pour l'élution à l'étape 11.
- ✓ Reconstituer les tampons AW1 et AW2 et la protéinase K.
- ✓ S'assurer que les tampons AW1, AW2 et la Protéinase K ont été bien reconstitués.
- ✓ Identifier correctement les échantillons, les tubes collecteurs, les colonnes et les tubes Eppendorf correspondants.

❖ Reconstitution des réactifs

- 🧪 Le tampon de lavage 1 (AW1) : À l'aide d'une éprouvette, ajouter 25 ml d'éthanol (96 à 100 %) dans le flacon contenant 19 ml de tampon de lavage 1 (AW1) concentré. Conserver le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué à température ambiante (15 à 25 °C).
- 🧪 Le tampon de lavage 2 (AW2) : À l'aide d'une éprouvette, ajouter 30 ml d'éthanol (96 à 100 %) dans le flacon contenant 13 ml de tampon de lavage 2 (AW2) concentré.

Conserver le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué à température ambiante (15 à 25 °C).

✚ Protéinase K : elle est fournie dans le coffret sous forme lyophilisée avec solvant de protéase (PS) pour la reconstitution. La protéinase K est reconstituée en rajoutant 1,2 ml de solvant sur le lyophilisat. On obtient une solution de 20 mg/ml. La protéinase K reconstituée se conserve entre 2 et 8°C.

❖ **Mode opératoire :**

- 1) Pipeter 20 µl de protéinase K dans le fond d'un tube Eppendorf de 1,5 ml.
- 2) Ajouter 200 µl d'échantillon (sang total)
- 3) Ajouter 200 µl du tampon de lyse AL à l'échantillon. Mélanger par vortex. Pour assurer une lyse efficace, il est essentiel que l'échantillon et le tampon AL soient bien mélangés pour donner une solution homogène.
- 4) Incuber pendant 10 à 15 min à 56 ° C.
- 5) Centrifuger brièvement pendant 5 secondes les tubes à vitesse maximale pour enlever les éventuelles gouttelettes d'eau sur les parois intérieurs des tubes et du couvercle.
- 6) Ajouter 200 µl d'éthanol absolu à l'échantillon et mélanger à nouveau par vortex et centrifuger brièvement le tube de mini centrifugeuse.
- 7) à l'aide d'une micropipette, récupérer soigneusement la totalité du mélange et la transférer dans les colonnes sans mouiller la jante. Fermez le capuchon et centrifuger à 6000 x g (8 000 tr / min) pendant 1 min. Retirer la colonne et placer la dans un tube de collection propre et jeter le tube contenant le filtrat.
- 8) Faire une seconde centrifugation à pleine vitesse (environ 20 000 x g ou 14000 tr/min) pendant 1 minute pour éliminer le filtrat résiduel.
- 9) Ouvrir soigneusement chaque colonne et ajouter 500 µl de tampon de lavage AW1 sans mouiller la jante. Fermer le capuchon et centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min.

Changer de tubes de collection en plaçant les colonnes dans de nouveaux tubes de collecte propres et jeter les tubes de collecte contenant le filtrat.

- 10) Ouvrir soigneusement chaque colonne et ajouter 500 µl de tampon de lavage AW2 sans mouiller la jante. Fermer les capuchons et centrifuger à pleine vitesse (20 000 x g; 14 000 tr / min) pendant 6 min.
- 11) Placer les colonnes dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml correspondants pour chaque échantillon, et jeter le tube de collecte contenant le filtrat.
Ouvrir soigneusement chaque colonne et ajouter 100 µl de tampon d'élution AE ou d'eau distillée.
- 12) Incuber à température ambiante (15-25 ° C) pendant 5 min, puis centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min.
L'incubation pendant 5 min à température ambiante avant la centrifugation, augmente généralement le rendement de l'ADN.
Une seconde étape d'élution peut être faite afin d'augmenter les rendements de l'extraction.
- 13) Stocker l'ADN à -20°C
- 14) Doser la concentration de l'ADN.

3.2. Evaluation de la qualité de l'ADN génomique extrait

L'évaluation de la qualité de l'ADN extrait repose sur plusieurs critères : la taille des fragments d'acides nucléiques, le rendement de l'extraction, la pureté et la rapidité.

Pour notre travail nous avons évalué le rendement et la pureté des extraits d'ADN par spectrophotométrie en utilisant le NanoVue™ Spectrophotometer.



Figure 12: présentation générale du NanoVue™ Spectrophotometer utilisé au laboratoire de biotechnologie de la FMPR

❖ **Principes de la détermination spectrophotométrique de l'ADN(97)**

La détermination spectrophotométrique de l'ADN est une spectrométrie d'absorption moléculaire. Les molécules absorbent de l'énergie radiante à une longueur d'onde spécifique à partir de laquelle il est possible d'extrapoler la concentration d'un soluté à l'intérieur d'une solution. Selon la loi de Beer-Lambert, il existe une relation linéaire entre l'absorption A (également appelée densité optique, DO) et la concentration de la macromolécule qui est donnée par l'équation suivante :

$$A = OD = \epsilon lc,$$

Où ϵ est égal au coefficient d'extinction molaire, c indique la concentration et l représente la longueur de parcours de la cuvette. Les protéines et les acides nucléiques absorbent la lumière dans la plage des ultraviolets dans des longueurs d'onde comprises entre 210 et 300 nm.

Le spectrophotomètre utilise la transmission de la lumière à travers une solution pour déterminer la concentration d'un soluté à l'intérieur de la solution. L'appareil fonctionne suivant un principe simple dans lequel de la lumière d'une longueur d'onde connue traverse un échantillon et où la quantité d'énergie lumineuse transmise est mesurée à l'aide d'une cellule photoélectrique placée de l'autre côté de l'échantillon.

Comme le montre la Figure 10, la conception du spectrophotomètre à simple faisceau implique l'utilisation d'une source lumineuse, d'un prisme, d'un support d'échantillon et d'une cellule photoélectrique. Les mécanismes électriques ou mécanismes adéquats pour contrôler l'intensité d'éclairage, la longueur d'onde et la conversion d'énergie reçue au niveau de la cellule photoélectrique à diverses tensions sont reliés à chacun des composants.

Dans les spectrophotomètres UV / visibles conventionnels, l'échantillon est habituellement contenu à l'intérieur d'une cuvette en verre ou en silice qui est placée dans le faisceau.

❖ **Mesure des concentrations d'ADN(98)**

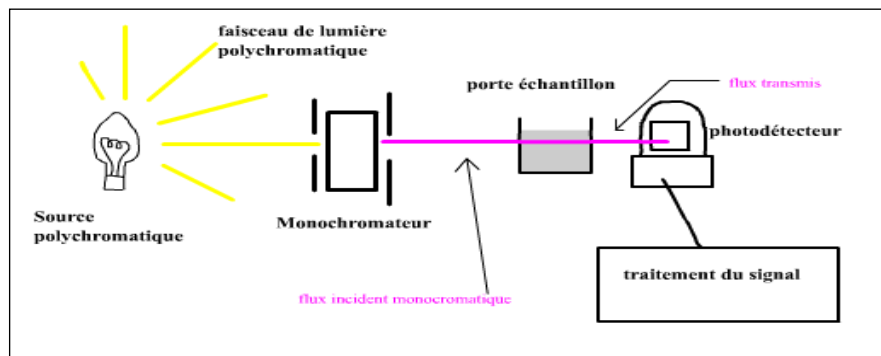


Figure 13: Structure et principe d'un spectrophotomètre mono faisceau

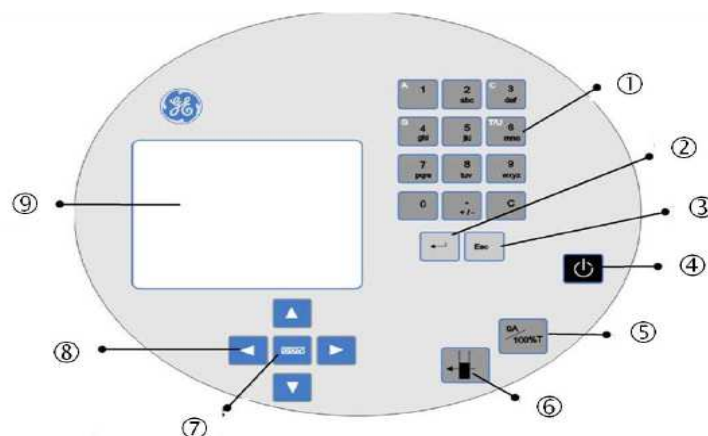


Figure 14: Tableau de commande du Nanovue

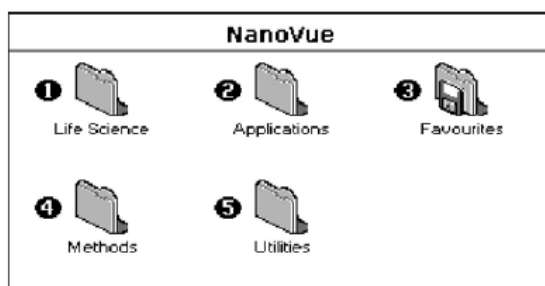


Figure 15: Présentation de l'écran d'accueil du Nanovue

Le rendement de l'extraction : la concentration de l'ADN extrait a été déterminée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm sur Nanovuespectrophotometer selon le protocole suivant :

- 1) brancher l'appareil au secteur
- 2) allumer l'appareil en pressant la touche (4) (fig. 14). L'appareil réalise alors une série d'autodiagnostic. Puis l'écran d'accueil s'affiche (fig. 15)
- 3) presser la touche « 1 » sur le clavier numérique ((1) fig. 14) pour afficher le dossier « Life Sciences »
- 4) Dans le dossier « Life Sciences », presser « 1 » pour doser l'ADN, « 2 » pour doser l'ARN. Une fenêtre d'affichage des paramètres apparaît : Le déplacement dans les différents paramètres s'effectue grâce aux flèches du clavier (8) (fig. 14) Sélectionner les paramètres par défaut pour les mesures de routine. Presser sur OK (touche (2) fig. 11)
- 5) Soulever le couvercle et essuyer avec du papier non abrasif (papier de soie ou papier Joseph) la zone de dépôt et l'intérieur du couvercle
- 6) Déposer 2 μ L de la solution de référence pour réaliser le blanc (eau distillée ou tampon dans lequel l'échantillon est conservé) sur la zone de dépôt (fig. 12) en évitant tout contact avec l'appareil. Veiller à ce qu'il n'y ait pas de bulles dans la goutte déposée. Refermer le couvercle
- 7) Presser la touche (5) (fig. 14). L'appareil réalise le « blanc ». Une fenêtre s'affiche ensuite pour demander de réaliser un second « blanc ». Ne pas presser la touche (3) (fig. 14). Mais procéder à une nouvelle mesure du « blanc » soit à partir d'un nouveau

dépôt (après avoir essuyé la zone de dépôt et le dessous du couvercle) soit à partir du même échantillon, et presser la touche ⑤.

- 8) Déposer 2 μ L d'échantillon d'acide nucléique à doser au niveau de la zone de dépôt. Refermer le couvercle.
- 9) Presser la touche ⑥ (fig. 14). L'appareil effectue le dosage et affiche les résultats sur l'écran.
- 10) Nettoyer délicatement la zone de dépôt et le dessous du couvercle entre chaque mesure. En fin d'utilisation, éliminer le dernier dépôt puis nettoyer la zone de dépôt et le dessous du couvercle à l'aide d'un papier non abrasif légèrement humidifié à l'eau distillée ou de l'isopropanol.
- 11) Eteindre l'appareil en pressant la touche ④ (fig. 14)
- 12) Débrancher l'appareil

La pureté a été déterminée sur la même méthode : par mesure de l'absorbance à 260 et à 280 nm.

3.3. L'analyse des gènes impliqués dans la pharmacogénétique des AVK par PCR-RFLP (Polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism)

3.3.1. La PCR

3.3.1.1. Principe

La PCR ou Polymerase Chain Reaction est une technique d'amplification enzymatique qui permet à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir un grand nombre de copies identiques de ce même fragment. Elle conduit à l'amplification in-vitro de plusieurs millions de fois une séquence spécifique d'acide nucléique qui peut être minoritaire voir très rare (10^{-2} pg). Elle exploite le processus de la réplication et fait appel, pour cela, à la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, des amorces ou primers s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. Cette configuration permet à l'ADN polymérase de répliquer les 2 monobrans dans le sens 5' vers 3' et ainsi aboutir à la synthèse de nouveaux ADN doubles brins.

La PCR s'effectue sur 3 étapes : (voir figure 16)

La dénaturation thermique de l'ADN : à 95°C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.

- **Hybridation des amorces :** le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrins d'ADN est comprise entre 50°C et 65°C. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.
- **L'élongation :** intervention de la Taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 72°C.

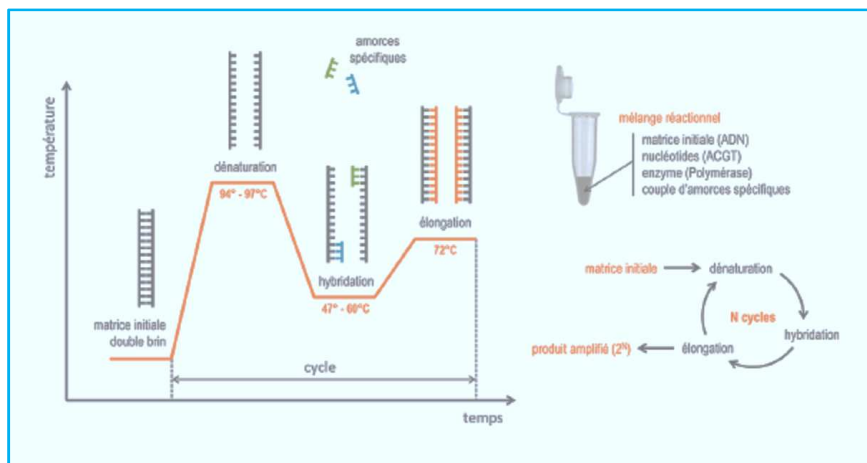


Figure 16: Principe de la PCR. L'amplification en trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

3.3.1.2. Les locaux

L'analyse PCR peut être divisée en trois phases : une phase comportant les manipulations qui précèdent l'amplification (pré-PCR), la réaction d'amplification proprement dite, et une autre phase pour les étapes suivant l'amplification (post-PCR) ; le processus se déroulant ainsi à sens unique dans des compartiments distincts et séparés. Nous avons donc travaillé dans différentes pièces du laboratoire :

- Une salle de pré-PCR destinée aux manipulations avant l'amplification
- Une salle pour la PCR

- Une salle post-PCR

NB : Il est fréquent de voir la salle pour la PCR confondue à la salle post-PCR, comme dans notre cas.

3.3.1.3. Matériel et réactifs

En général on utilise les réactifs et le matériel indispensables et adaptés à chacune des phases de l'analyse PCR. Ils sont listés selon la figure suivante :

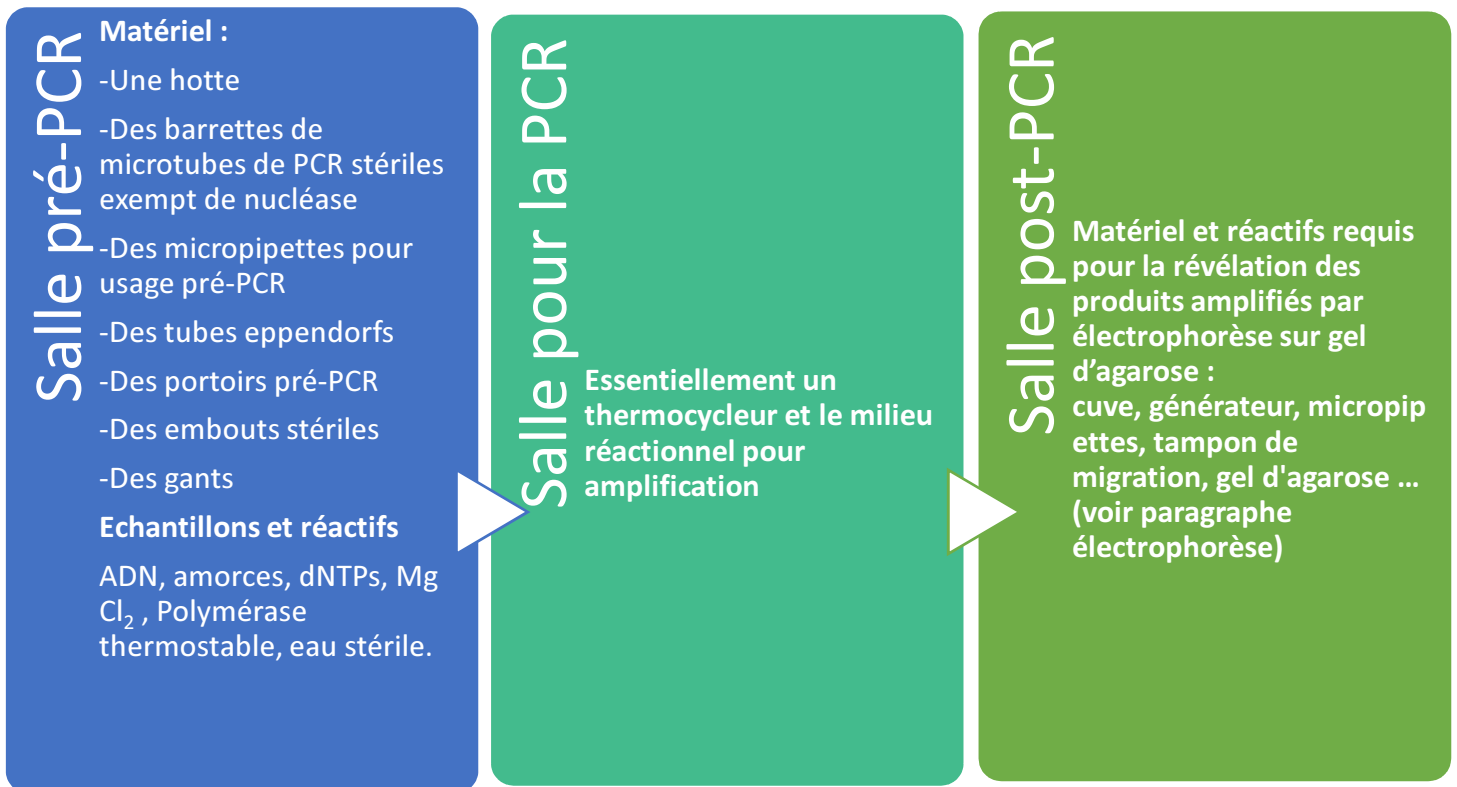


Figure 17: Répartition du matériel et des réactifs par compartiment de la chaîne de l'amplification

Les dNTPs (desoxynucléotides) que sont : *dATP (désoxy-adénine tri-phosphate)*, *dCTP (désoxy-cytosine tri-phosphate)*, *dGTP (désoxy-guanine tri-phosphate)*, *dTTP (désoxy-thymine tri-phosphate)*, le *MgCl₂*, la *Taq polymérase* et le *tampon à pH 8.6* à 25°C, sont fournis en un mélange sous forme de Mastermix.

3.3.1.4. La pré-PCR

Les étapes pré-PCR comprennent deux parties : le mélange des réactifs (reconstitution et dilution des amorces), ainsi que le traitement et l'addition de l'échantillon.

❖ **Reconstitution des amorces**

La reconstitution des amorces se fait suivant les indications retrouvées sur les fiches techniques accompagnant les réactifs (amorces F et R), et pour les amorces présentées sous forme lyophilisée.

- Concentration initiale 100 μ M
- Diluant de reconstitution : Eau ultra pure stérile

NB : On préconise de repartir des petits volumes d'eau distillée dans des tubes Eppendorf pour éviter la contamination du flacon source d'eau pure.

Mode opératoire

- 1) Pipeter à l'aide de micropipettes le volume d'eau nécessaire à la reconstitution de chaque amorce (voir tableau)
- 2) Vortexer les flacons d'amorces pour homogénéiser
- 3) Faire une centrifugation short spin pour descendre les gouttelettes de la paroi des tubes.

❖ **Dilution des solutions mères d'amorces**

L'objectif de cette manipulation est d'obtenir des amorces avec une concentration de **10 μ M** pour un volume final $V_f = 200\mu L$

La dilution se fait dans des tubes Eppendorf stériles sur lesquels sont inscrits : ***nom du gène-type d'amorce (F pour Forward et R pour Reverse)- concentration de la dilution- date de préparation (tableau suivant)***

Ex : CYP4F2-F / 10 μ M / 27-12-2016.

Mode opératoire

- 1) Pour chaque amorce F et R, appliquer la formule $C_i V_i = C_f V_f$ pour le calcul du volume initial V_i de solution mère à prélever, puis compléter à l'eau distillée stérile.
- 2) Vortexer les tubes pour homogénéiser
- 3) Faire une centrifugation short spin pour descendre les gouttelettes de la paroi des tubes (étape non obligatoire)

NB : Conserver les amorces (solutions mères et diluées) à **-20°C**.

❖ Préparation des échantillons d'ADN

Les échantillons d'ADN préalablement extraits et conservés à **-20°C** sont décongelés à température ambiante.

En fonction de leur concentration initiale, certains échantillons d'ADN seront dilués.

Pour notre travail, nous avons fixé la concentration d'ADN à **50ng/μl**.

La dilution des échantillons se fera selon la formule $C_i V_i = C_f V_f$ pour atteindre une concentration de **50ng/μl**.

❖ Préparation des milieux réactionnels pour PCR

Les milieux réactionnels pour la PCR doivent contenir :

- ✓ ADN à 100ng
 - ✓ Amorces F/R à 10μM
 - ✓ dNTPs
 - ✓ MgCl₂
 - ✓ Taq polymérase
 - ✓ Tampon
- } **Mastermix**

La préparation des milieux réactionnels se fait sous une hotte à flux laminaire et dans des barrettes de micro tubes pour PCR. Nous disposons de barrettes de 8 microtubes. Les 7 premiers tubes contenaient les échantillons d'ADN et le dernier de l'eau ultra pure à titre de contrôle négatif.

Dans le but d'optimiser la réaction, nous avons préparé des milieux réactionnels de 50 μl puis 25 μl et enfin 12,5 μl. (tableau ci-dessous)

Nous avons procédé de la manière suivante :

- 1) Etablir un plan de travail au préalable. On y précisera le gène à amplifier et l'ordre de dépôt des différents constituants du mix réactionnel.
- 2) Disposer les barrettes dans un portoir adapté. Identifier chaque micro tube et signaler le premier micro tube. (Figure 15)
- 3) Préparer un mix dans un tube Eppendorf stérile. Il contient les amorces F et R, le mastermix et l'eau ultra pure, dans les volumes requis pour le nombre d'échantillon à passer.

- 4) Les échantillons d'ADN sont décongelés à température ambiante. Avec une micropipette munie d'embouts stériles, on pipete 2 μ l d'ADN de chaque échantillon dans les microtubes correspondants.
- 5) Rajouter le volume de mix requis pour le volume de réaction souhaité :
 - Soit 48 μ l de mix pour un volume de réaction de 50 μ l
 - Soit 23 μ l de mix pour un volume de réaction de 25 μ l
 - Soit 10,5 μ l pour un volume de réaction de 12,5 μ l
- 6) Fermer hermétiquement les barrettes pour éviter toute évaporation lors de la réaction dans le thermocycleur.
- 7) Homogénéiser correctement le mélange et s'assurer qu'il n'y pas de gouttelettes sur les parois.
- 8) Transporter dans un portoir adapté vers une salle destinée à la PCR.

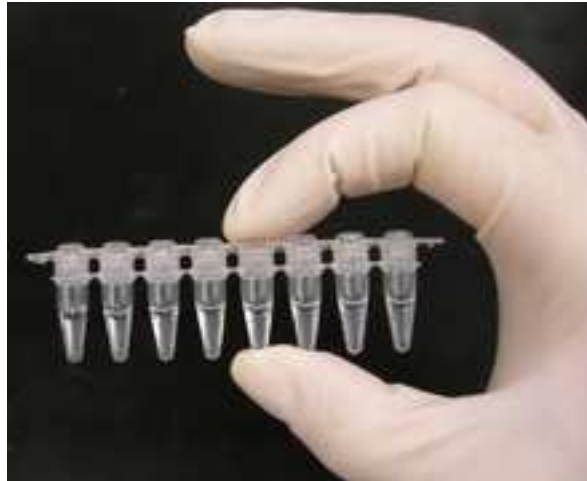


Figure 18: Barrette à 8 microtubes pour PCR

Tableau VII: Composition des milieux réactionnels pour la PCR à 50 μ l, 25 μ l et 12.5 μ l

Composition Du milieu réactionnel	Volume à 50 μ l	Volume à 25 μ l	Volume à 12,5 μ l	Concentration finale
Echantillon d'ADN	2 μ l	2 μ l	2 μ l	100 ng
Amorce F	1 μ l	1 μ l	1 μ l	10 μ M
Amorce R	1 μ l	1 μ l	1 μ l	10 μ M
Mastermix	25 μ l	12,5 μ l	6,25 μ l	
Eau ultra pure	QSP 50 μ l	QSP 25 μ l	QSP 12,5 μ l	

3.3.1.5. La PCR proprement dite

Cette étape se déroule dans une salle de PCR séparée de la salle pré-PCR.

La réaction d'amplification d'ADN se déroule dans les milieux réactionnels préparés dans les microtubes PCR. Ces microtubes sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur pour PCR classique dont les paramètres sont réglés à l'avance selon un programme défini. (Tableau VIII)

Le thermocycleur ou cycleur thermique est un appareil qui réalise automatiquement la réaction de PCR classique. Il est muni d'un bloc thermique avec des puits où l'on peut insérer les tubes contenant le mélange réactionnel de la PCR. Cet appareil a la capacité de chauffer et de refroidir de façon alternative à des températures allant de +4°C à 99°C et capable de réaliser plusieurs cycles des différentes étapes de la PCR : la dénaturation (entre 94°C et 96°C), l'hybridation (entre 50°C et 65°C) et l'élongation (autour de 72°C).

L'appareil dont nous disposons comporte 96 puits au niveau du compartiment chauffant, et est muni d'un clavier et un écran servant à la programmation des conditions de PCR. (Figures 19 et 20)



Figure 19: Thermocycleur utilisé au Laboratoire de Biotechnologie médicale

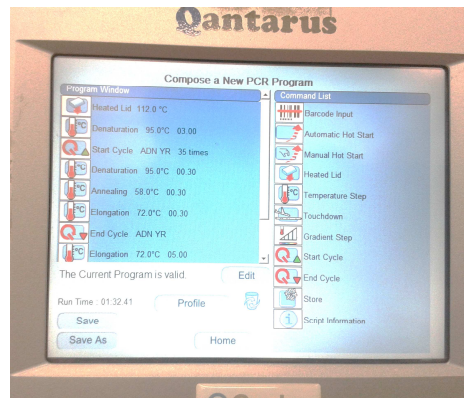


Figure 20: Ecran de programmation des conditions de la PCR

Les conditions d'amplification ont été enregistrées pour chaque gène suivant le tableau suivant.

Tableau VIII: Les conditions d'exécution de la PCR

SNP	Séquences des amorces	Conditions de PCR
VKORC1 (1639 G>A)	F-5'GAGCCAGCAGGAGAGGGAAATAT 3' R-5'GTTTGGACTACAGGTGCCTGCC 3'	95°C / 30 sec 58°C / 30 sec 72°C / 30 sec
VKORC1 (1173 C>T)	F-5'CTAAGATGAAAAGCAGGGCCTAC3' R-5'CTGCCCCGAGAAAGGTGATTTCC3'	
CYP2C9*2 (430 C>T)	F-5'TCCTAGTTTCGTTTCTCTTCCTGT3' R-5'ATAGTAGTCCAGTAAGGTCAGTGA3	
CYP2C9*3 (1075 A>C)	F-5'CACGAGGTCCAGAGATGCATTG3' R-5'CTTCGAAAACATGGAGTTGCAGT3'	
CYP4F2 (1347 G>A)	F-5'TGAAGGAGGCCTTCTCCTGACTG3' R-5'CCAGCCTTGGAGAGACAGACAG3'	
GGCX (12970 C>G)	F-5'GCTTCTTGTTGCGAAAGCTCTAT3' R-5'CAAACACTGGGAACAGTTAGCT3'	

Une fois les barrettes placées dans le thermocycleur, l'appareil est hermétiquement fermé. On peut alors lancer le programme pour la PCR. La réaction commence par un chauffage du bloc à 112°C. Une fois cette température atteinte, une étape de dénaturation initiale est entamée. Cette étape a pour but de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases, de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution. Elle se fait à 95°C pendant 3 minutes.

Après cette étape de dénaturation initiale, 35 cycles d'amplification commencent, chacune comportant une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une phase d'hybridation à 58°C pendant 30 secondes, et une phase d'élongation à 72°C pendant 30 secondes.

Une fois les cycles complétés, une étape d'élongation supplémentaire est effectuée à 72° C pendant 5 minutes. La température est ramenée dans le thermocycleur à 4°C.

Une fois la réaction terminée, les produits d'amplification vont subir une électrophorèse sur gel d'agarose pour contrôler si l'ADN a été amplifié. (Voir paragraphe sur l'électrophorèse)

3.3.2. La purification

Cette étape consiste en la purification des produits amplifiés en éliminant les restes d'amorces, de dNTPs, et de polymérase, des détergents, des colorants, des additifs et d'autres contaminants restant dans le milieu réactionnel.

Pour se faire nous avons utilisé un kit de purification sur colonne de silice ISOLATE II PCR and Gel Kit.

❖ Composants du kit (pour 50 Tests):

- Colonnes50
- Tubes de collection (2ml).....50
- Tampon de liaison CB (concentré)2 x 25ml
- Tampon de lavage CW.....20ml
- Tampon d'élution C15ml

❖ Équipement et réactifs non fournis avec le kit :

Puisque nous manipulons des produits chimiques, il est primordial de porter toujours une blouse de laboratoire appropriée, des lunettes de protection et des gants jetables.

- Ethanol à 96- 100%
- Tubes à microcentrifugation (1,5 ml)
- Embouts stériles exempts de DNase
- Pipettes
- Microcentrifugeuse
- Vortex

❖ Préparation du tampon et paramètres

➤ Préparation du tampon de lavage CW

Ajouter 96 - 100% d'éthanol (non fourni) au tampon de lavage concentré CW : 80 ml pour le kit de 50 tests.

➤ Tampon d'élution C

L'ADN sera élué avec un tampon d'élution (pH 8,5), fourni avec le kit.

❖ Protocoles

Avant de commencer il faut s'assurer que le tampon de lavage est préparé comme décrit ci-dessus.

1) Préparation de l'échantillon

Pour les volumes < 3µl, ajuster le volume à 50 - 100µl avec de l'eau ; puis mélanger 1 volume d'échantillon avec 2 volumes de tampon de liaison CB : dans notre cas nous avons mélangé 50 µl d'échantillon avec 100µl du tampon de liaison CB.

2) Lier l'ADN

Pour chaque préparation, placer une colonne dans un tube de prélèvement (2 ml) et charger l'échantillon.

Centrifuger pendant 30 secondes à 13 000 trs /min et jeter le déchet. Réutilisez le tube de collecte pour l'étape 3.

3) Lavage de la membrane de silice

Ajouter 700 µl de tampon de lavage CW à la colonne et centrifuger pendant 30 secondes à 13 000 trs /min. jeter le tube de collection et son contenu et replacer la colonne dans le tube de collecte.

Faire un deuxième lavage.

4) Séchage de la membrane de silice

Centrifuger pendant 1 min à 13 000 trs /min à sec, pour éliminer l'éthanol résiduel. Placer la colonne dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml.

5) Elution de l'ADN

Ajouter 15 - 30µl Elution Buffer C directement sur la membrane de silice. Incuber à température ambiante pendant 1 min. Centrifuger 1 minute à 13 000 trs /min.

On obtient de l'ADN amplifié et purifié.

3.3.3. La restriction enzymatique

❖ Principe(99)

Le polymorphisme de longueur de fragment de restriction ou Restriction Fragment Length Polymorphism en anglais (RFLP) est une technique en biologie moléculaire permettant de différencier les variations mineures de séquences nucléotidiques dans des fragments homologues d'ADN. La technique repose sur la spécificité des endonucléases de restriction,

qui sont hautement spécifiques de la séquence et ne coupent l'ADN double brin qu'à leurs sites de reconnaissance. L'action des enzymes de restriction produit des longueurs variables de molécules d'ADN homologues contenant des variations de séquence mineures ou des polymorphismes et les fragments clivés dans l'ADN digéré peuvent être séparés par des techniques électrophorétiques. (Figure 21)

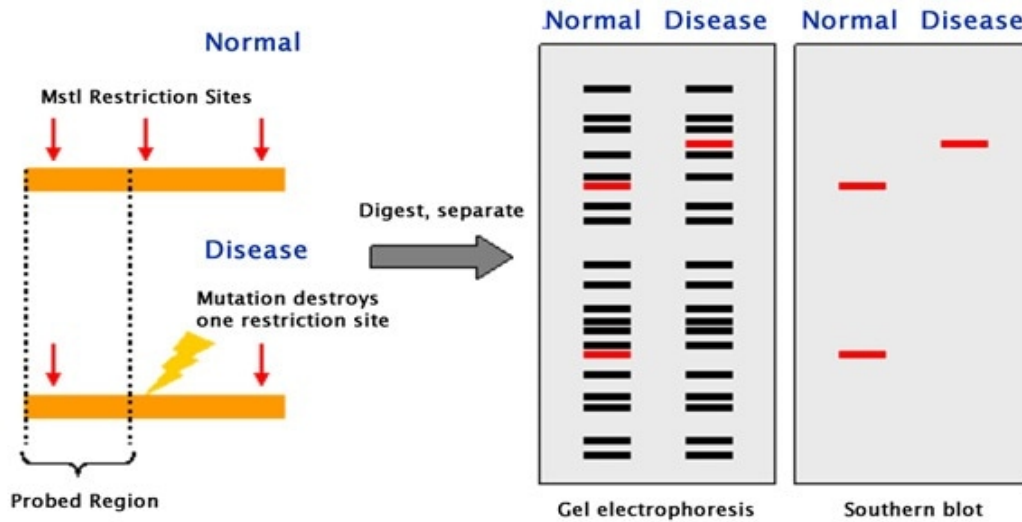


Figure 21: Principe de la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)[100]

❖ Matériel et réactifs

La restriction enzymatique a été réalisée sur pour les six variations des gènes d'intérêt VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 et GGCX, dans la pharmacogénétique des AVK portant les polymorphismes. Les enzymes de restriction utilisés sont résumés dans le tableau IX.

Pour ce faire nous avons utilisé le matériel et les réactifs suivants :

- Bain marie à 37°C
- Flotteurs
- Tubes Eppendorf stériles
- Micropipettes
- L'ADN amplifié purifié ou non
- Enzymes de restriction avec le Tampon 10 X
- Micropipettes
- Eau stérile

Tableau IX: Séquences d'amorces, enzymes de restriction utilisée et fragments d'ADN trouvés pour les variations des gènes VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 et GGCX

SNP	Séquences des amorces	Taille du produit de PCR	Enzymes de restriction	Taille des produits de la restriction enzymatique
VKORC1 (1639 G>A)	F-5'GAGCCAGCAGGAGAGGGGAAATAT3' R-5'GTTTGGACTACAGGTGCCTGCC 3'	291 pb	Msp I	WT-167 pb+ 124 pb Htz-291 pb+ 167 pb+ 124 pb Mut-291 pb
VKORC1 (1173 C>T)	F-5'CTAAGATGAAAAGCAGGGCCTAC3' R-5'CTGCCCCGAGAAAGGTGATTTCC3'	201 pb	Sty I	WT-127 pb+ 74 pb Htz-201 pb+ 127 pb+ 74 pb Mut-201 pb
CYP2C9*2 (430 C>T)	F-5'TCCTAGTTTCGTTTCTCTTCCTGT3' R-5'ATAGTAGTCCAGTAAGGTCAGTGA3	221 pb	Ava II	WT-122 + 99 pb Htz-221 pb+ 122 pb+ 99 pb Mut-221 pb
CYP2C9*3 (1075 A>C)	F-5'CACGAGGTCCAGAGATGCATTG3' R-5'CTTCGAAAACATGGAGTTGCAGT3'	135 pb	Nsi I	WT-116 pb+ 19 pb Htz-135 pb+ 116 pb+ 19 pb Mut-135 pb
CYP4F2 (1347 G>A)	F-5'TGAAGGAGGCCTTCTCCTGACTG3' R-5'CCAGCCTTGGAGAGACAGACAG3'	232 pb	PvuII	WT-146 pb + 86 pb Htz-232 bp+ 146 pb+ 86 pb Mut- 232 pb
GGCX (12970 C>G)	F-5'GCTTCTTGTTGCGAAAGCTCTAT3' R-5'CAAACACTTGGGAACAGTTAGCT3'	1288 pb	Hind III	WT-1206 pb+82 pb Htz-1288 pb+ 1206 pb

❖ Protocole

La restriction enzymatique a été réalisée selon les étapes suivantes :

1) Préparation d'un mix de digestion enzymatique

Les enzymes de restriction sont livrés avec un tampon de réaction à une concentration de 10 U/µl accompagnées du tampon à 10 X.

Le mix de digestion enzymatique est un mélange contenant l'enzyme de restriction, le tampon et de l'eau ultra pure stérile. Les quantités de chaque constituant du mix ont été adaptées pour chaque enzyme et selon le volume final du milieu réactionnel.

Dans le but d'une optimisation de la RFLP, différents mix ont été préparés en variant le volume de l'enzyme. (Voir tableau X)

Le volume final de réaction a été maintenu à 50 µl et les conditions de digestion ont été maintenues à 37°C pendant 2 heures pour toutes les réactions.

2) Mélange du mix aux échantillons d'ADN

L'ADN amplifié été utilisé à des volumes de 25 µl et 10 µl selon le volume du produit de PCR. Les produits issus d'une PCR faite avec 12.5 µl de volume, une dilution au 1/5^{ème} (2 µl d'ADN + 8 µl d'eau distillée stérile) été effectuée. (Voir tableau X)

3) Incubation au bain marie à 37°C pendant deux heures des tubes après les avoir chargés sur un flotteur et recouverts de film pour sécuriser.

4) Les produits digérés, au bout de 2 heures, subissent une électrophorèse sur gel d'agarose avec révélation à l'UV.

Tableau X: Mélanges pour restriction enzymatique

Composition	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4
Enzyme (µl)	1	0.5	0.5	0.5
Tampon (µl)	5	5	5	2
Eau distillée stérile (µl)	19	19.5	4.5	8
ADN à digérer (µl)	25	25	10	10*

*ADN dilué au 1/5^{ème}

3.3.4. L'électrophorèse

3.3.4.1. Principe

En milieu basique, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Soumises à un champ électrique, elles migrent, dans un gel (agarose ou polyacrylamide), de la cathode vers l'anode.

Le but de cette électrophorèse sur gel est de séparer les fragments d'acides nucléiques, d'ADN et d'ARN, et de les détecter par coloration avec un agent intercalant et visualisation sous lumière UV. Le processus de séparation est facilité par un courant électrique et basé sur le poids moléculaire et la charge. Le milieu le plus couramment utilisé dans les gels horizontaux est l'agarose.

Dans notre analyse génomique nous avons fait une électrophorèse sur gel d'agarose des produits de l'amplification et des produits de la restriction enzymatique.

3.3.4.2. Matériel et réactifs

➤ Échantillons :

Les échantillons d'ADN produits de la PCR et Les produits de la restriction enzymatique et marqueurs de taille d'ADN

➤ Tampons et solutions :

- Agarose
- Tampon TBE (Tris-borate-EDTA) (10 X et 1 X)
- Colorant intercalant (MaestrosafeNucleic Acid loadingdye)

• Tampon de charge

➤ Équipement et consommables :

- Four micro-ondes
- Balance
- Agitateur magnétique
- Pipettes
- Tubes Eppendorf
- Cuve pour électrophorèse et alimentation
- Le support du gel
- Les peignes
- Transilluminateur
- appareil photo
- Barres d'agitation
- Flacons en verre de 500 ml ou flacons Erlenmeyer
- Gants
- Ruban
- Embouts de pipette



Figure 22: appareillage pour électrophorèse utilisé au laboratoire de Biotechnologie.

3.3.4.3. Protocole

La mise en place de l'électrophorèse de l'ADN implique un certain nombre d'étapes pour obtenir une séparation et une analyse optimales des échantillons d'ADN. Les principales étapes de l'électrophorèse sur gel que nous avons effectué sont les suivantes :

- ❖ Préparation du tampon de migration et du gel
- La préparation du tampon TBE à 10X et dilution à 1X

TBE= Tris + Acide borique (Borate) + EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) (pH8.3)

- **TBE 10X**

TBE en poudre (lyophilisé).....1 sachet

Eau distillée.....1 L

Chauffer sur une plaque en agitation douce avec un barreau magnétique jusqu'à ce que la préparation devienne limpide.

- **TBE 1X**

TBE 10X.....10 ml

Eau distillée.....1L

On conserve ces tampons au réfrigérateur à +4°C.

- La préparation du gel d'agarose

Nous avons préparé du gel d'agarose à différents pourcentages : 2% et 3%. Pour se faire nous avons appliqué la formule et le protocole suivants :

Agarose (poudre) 2g ou 3g

TBE 1X.....100ml

- 1) Ajouter l'agarose pesé dans un erlenmeyer et rajouter au fur et à mesure le tampon
- 2) Placer au four à micro-ondes pendant 1 min à 2 min à intensité moyenne et contrôler le chauffage.
- 3) Laisser la préparation revenir à 60°C environ.
- 4) couler le gel sur le support prévu à cet effet et y plaçant le peigne à l'endroit prévu. Eviter les bulles d'air sinon les chasser à l'aide d'un cône après avoir coulé le gel.
- 5) Laisser reposer le gel 15 à 20 minutes pour qu'il se solidifie.
- 6) Retirer délicatement le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie préalablement de tampon TBE 1X.

Tableau XI: Pourcentages du gel d'agarose préparé selon les tailles des fragments d'ADN amplifiés et digérés par restriction enzymatique

SNP	Taille produit PCR	de	Pourcentage du gel	Taille des produits de la restriction enzymatique	Pourcentage du gel
VKORC1 (1639 G>A)	291 pb			WT-167 pb+ 124 pb Htz-291 pb+ 167 pb+ 124 pb Mut-291 pb	
VKORC1 (1173 C>T)	201 pb			WT-127 pb+ 74 pb Htz-201 pb+ 127 pb+ 74 pb Mut-201 pb	
CYP2C9*2 (430 C>T)	221 pb		3% (3g/100ml)	WT-122 + 99 pb Htz-221 pb+ 122 pb+ 99 pb Mut-221 pb	3% (3g/100ml)
CYP2C9*3 (1075 A>C)	135 pb			WT-116 pb+ 19 pb Htz-135 pb+ 116 pb+ 19 pb Mut-135 pb	
CYP4F2 (1347 G>A)	232 pb			WT-146 pb + 86 pb Htz-232 bp+ 146 pb+ 86 pb Mut- 232 pb	
GGCX (12970 C>G)	1288 pb		2% (2g/100ml)	WT-1206 pb+82 pb Htz-1288 pb+ 1206 pb	2% (2g/100ml)

❖ Les échantillons et les réactifs utilisés

➤ Les échantillons : L'ADN amplifié a subi une électrophorèse pour la vérification de la réaction de la PCR. Ceci nous a permis de valider la réaction en vérifiant la présence des bandes d'ADN et la taille correspondant à celle du gène amplifié.

L'électrophorèse des produits de digestion a pour but de révéler les résultats du génotypage par RFLP en recherchant la présence et la taille des différents fragments d'ADN expectés.

➤ L'échelle d'ADN ou marqueur de taille : la taille des séquences est vérifiée grâce à l'utilisation d'une échelle d'ADN servant de marqueur de taille d'ADN. Ce marqueur de taille est un mélange d'ADN de différentes tailles connues que l'on fait migrer avec les échantillons dans les mêmes conditions d'électrophorèse. Dans notre étude, nous avons utilisé deux échelles d'ADN : HyperLadder™ 50bp pour des tailles allant de 50 pb à 2000 pb ; et HyperLadder™ 100 bp Plus pour des tailles allant de 100 pb à 2531pb comme le montre la figure 23.

➤ Le colorant d'ADN et le tampon de migration : Nous avons utilisé comme colorant de l'ADN le MaestroSafeNucleic Acid loadingdye. Il représente une nouvelle classe de colorants d'acide nucléique sans danger pour la visualisation de l'ADN dans les gels d'agarose. Il remplace le bromure d'éthidium toxique (EtBr, un puissant mutagène), couramment utilisé dans l'électrophorèse sur gel. (100)

Le tampon de migration était le TBE 1X.

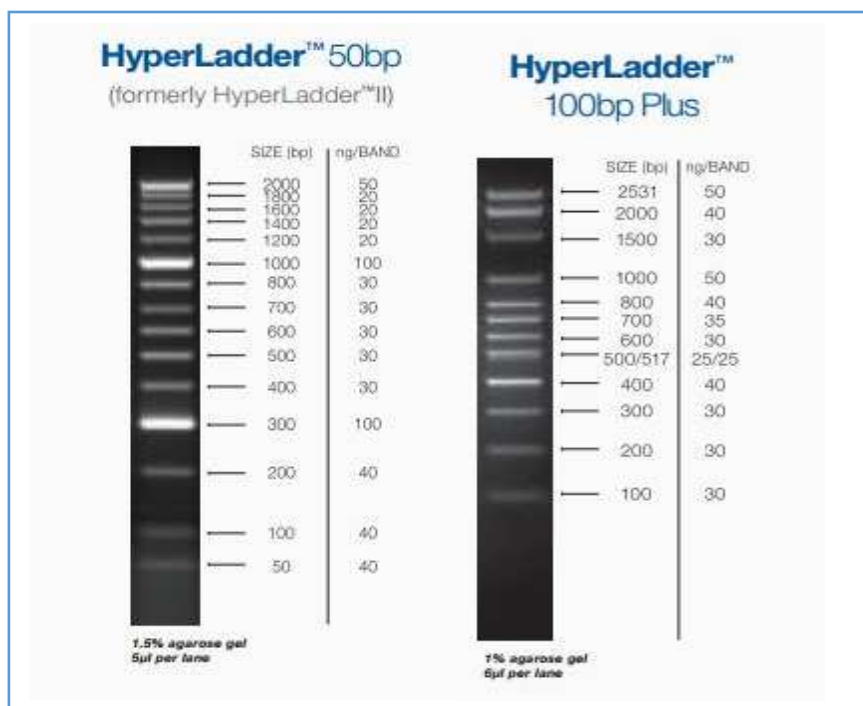


Figure 23 : Marqueurs de taille d'ADN utilisés

Les échantillons et le marqueur de taille d'ADN sont préparés dans des tubes eppendorfs, mélangés avec le tampon de charge fourni dans le coffret hyperLadder, et le MaestroSafeDye, selon le tableau suivant :

Tableau XII: Composition des échantillons d'ADN amplifié, d'ADN digéré par RFLP et marqueur de taille pour la migration électrophorétique

Constituants des mélanges	ADN amplifié	ADN digéré par RFLP	Marqueur de taille
Tampon de charge (µl)	3	4	4
Colorant d'ADN (µl)	1	2	1
ADN (µl)	7	14	5

❖ La migration électrophorétique

La migration électrophorétique se fait dans les cuves prévues à cet effet remplies du tampon de migration et dans des conditions précises. (Tableau XIII)

- 1) Placer le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode (pôle noir).
- 2) prélever le mélange avec une micropipette réglée sur le volume approprié en changeant de cône à chaque prélèvement.
- 3) Remplir les puits en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette.
- 4) Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension. Régler le voltage, l'ampérage et le temps de migration
- 5) S'assurer du sens de migration (cathode vers l'anode)
- 6) Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 40 min à 100V).



- 7) Couper l'alimentation, débrancher les connections et récupérer le gel dans son support

Attention au transport : le gel glisse très facilement de son support !

Tableau XIII: Résumé des conditions d'électrophorèse

Conditions	Produits de la PCR	Produits de la restriction enzymatique
Gel d'agarose*	2% et 3%	
Tampon de migration	TBE 1X	
Voltage	100 V	
Ampérage	100 mA	
Puissance	8 W	
Temps de migration	40 min	

*Le pourcentage du gel d'agarose dépend de la taille des fragments d'ADN.

❖ La visualisation des échantillons et documentation des gels

La visualisation de l'ADN et la documentation de l'ADN a été réalisée par le TransilluminatorSlider LED Imager. La figure ci-dessous montre l'appareil avec ses différents constituants.(101)

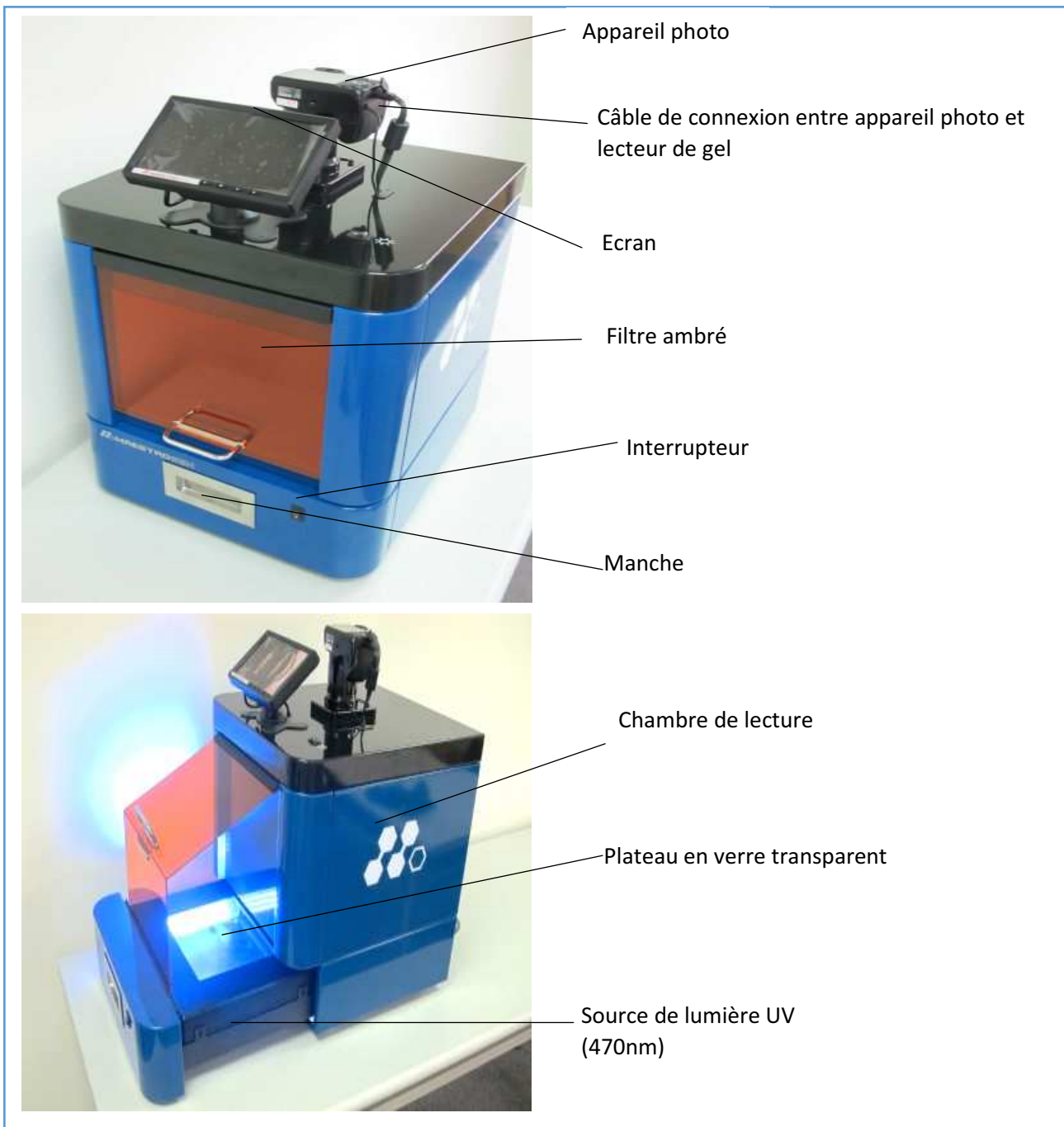


Figure 24: présentation du Transilluminatorslider LED imager utilisé au laboratoire de biotechnologie

Après la migration électrophorétique terminée, le gel est transporté sur son support vers le lecteur de gel. On tire la manche pour pouvoir poser le gel sur le plateau en verre en évitant

les bulles d'air en dessous qui pourraient gêner la lecture. Une fois le gel d'agarose posé délicatement, on ferme le plateau et on allume les lampes, l'écran, et l'appareil photo pour les captures.

Le filtre ambré protège le manipulateur contre les rayonnements UV et pendant la lecture.

Les captures d'images sont enregistrées dans une carte mémoire intégrée à l'appareil photo, qui pourra être retirée et exploitée sur un ordinateur après la manipulation.

Une fois la lecture terminée, on retire le gel du plateau et on le nettoie.



Résultats

III. RESULTATS

1. Quantification de l'ADN génomique extrait

L'ADN génomique extrait à partir des échantillons de sang et dosé par spectrophotométrie a donné les résultats suivant pour les deux méthodes utilisées ; à savoir l'extraction au phénol/chloroforme et l'extraction sur une résine échangeuse d'ions.

1.1. L'ADN extrait par la méthode au phénol/chloroforme

Les 44 premiers échantillons ont été extraits par la méthode classique au phénol/ chloroforme. Les concentrations trouvées par spectrophotométrie et le calcul du rapport entre la densité optique mesurée à 260 nm puis à 280 nm sont inscrits dans le tableau ci-dessous.

Tableau XIV: Tableau des concentrations de l'ADN extrait par méthode au phénol/ chloroforme

Numéro des échantillons	Concentration en ng/ml	Rapport DO 260/280 nm	Numéro des échantillons	Concentration en ng/ml	Rapport DO 260/280 nm
1	93	1,700	23	190	1,600
2	269	1,840	24	228	1,866
3	97	2,109	25	231	1,700
4	242	1,661	26	150,5	1,688
5	517	1,747	27	160,5	1,500
6	699,5	1,717	28	131,5	1,655
7	134,5	1,804	29	151,5	1,700
8	437	2,061	30	530	1,643
9	209,5	2,061	31	190	1,490
10	161,5	1,800	32	211	1,500
11	104	2,100	33	161	1,490
12	283	2,032	34	89	1,728
13	347,5	1,992	35	220	1,777
14	144	2,120	36	131	2,091
15	220	1,770	37	117	1,911
16	131	2,091	38	22	1,648
17	117	1,911	39	195	1,516
18	22	1,648	40	363,5	1,791
19	195	1,816	41	123	1,850
20	96,5	1,66	42	118,5	1,623
21	172,5	1,570	43	73,5	2,042
22	174	1,687	44	135,5	1,549

1.2. L'ADN extrait par la méthode utilisant des colonnes de résines échangeuses d'ions

Le tableau ci-dessous montre les concentrations de l'ADN obtenu par extraction sur colonne de résine échangeuses d'ions ; et le rapport DO 260nm /DO 280nm.

Tableau XV: Concentrations de l'ADN extrait sur colonnes de résines échangeuses d'ions

Numéro des échantillons	Concentration en ng/ml	Rapport DO 260/280 nm	Numéro des échantillons	Concentration en ng/ml	Rapport DO 260/280 nm
45	16	1,835	74	14	1,840
46	10	1,818	75	17	1,859
47	23	1,819	76	21,5	1,798
48	18,5	1,760	77	39	1,814
49	28	1,783	78	50	1,786
50	28	1,763	79	31,5	1,750
51	24,5	1,763	80	23	1,691
52	21	1,790	81	26,5	1,688
53	31	1,824	82	28	1,692
54	11,2	1,890	83	19	1,652
55	30,5	1,848	84	35	1,792
56	23	1,840	85	26,5	1,710
57	50,5	1,870	86	28,5	1,727
58	24,5	1,914	87	55	1,833
59	20	1,893	88	44	1,833
60	28	1,812	89	40	1,778
61	29	1,867	90	39	1,773
62	26	1,825	91	32,5	1,711
63	21,5	1,937	92	38,5	1,676
64	48,5	1,865	93	124,5	1,665
65	34	1,835	94	31,5	1,722
66	30	1,893	95	42	1,836
67	41,5	1,886	96	43,5	1,851
68	37,5	1,947	97	56	1,836
69	43	1,911	98	43	1,870
70	42	1,909	99	43,5	1,812
71	95,5	1,64	100	30	1,706
72	25	1,824	101	32	1,800
73	40	1,860	102	47,5	1,760

2. Résultats de la PCR

Les résultats de la PCR montrent les gènes amplifiés sous forme de bandes fluorescentes sur gel d'agarose après l'électrophorèse. Ils sont présentés sous forme d'images de gel prises à partir du TransilluminatorSlider LED Imager.

3. Résultats de la restriction enzymatique des SNP impliqués dans la pharmacogénétique des AVK

Les résultats de la PCR obtenus après révélation par fluorescence observée à l'UV à 470 nm après électrophorèse des produits d'amplification sur gel d'agarose.

3.1. Produits de la restriction enzymatique du SNP VKORC1 (1639 G>A) par le *Msp I*

Les tailles des fragments de la restriction enzymatique du VKORC1 (1639 G>A) par le *Msp I*, correspondants aux différents phénotypes sont :

- **Phénotype sauvage (Wild type) [GG] : 167 pb+ 124 pb**
- **Hétérozygote [GA] : 291 pb+ 167 pb+ 124 pb**
- **Muté [AA] : 291 pb**

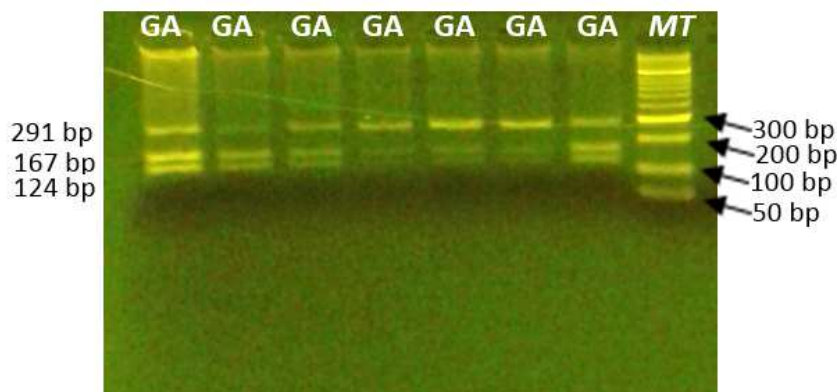


Figure 25: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de VKORC1-1639G> A. Echantillons avec allèle G (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par *MspI*, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé.

3.2. Produits de restriction enzymatique du SNP VKORC1 (1173 C>T) par le *Sty I*

Les tailles des fragments de la restriction enzymatique du VKORC1 (1173 C>T) par le *Sty I*, correspondants aux différents phénotypes sont :

- **Phénotype sauvage (Wild type) [CC] : 127 pb+ 74 pb**

- **Hétérozygote [CT] : 201 pb+ 127 pb+ 74 pb**
- **Muté [TT] :201 pb**

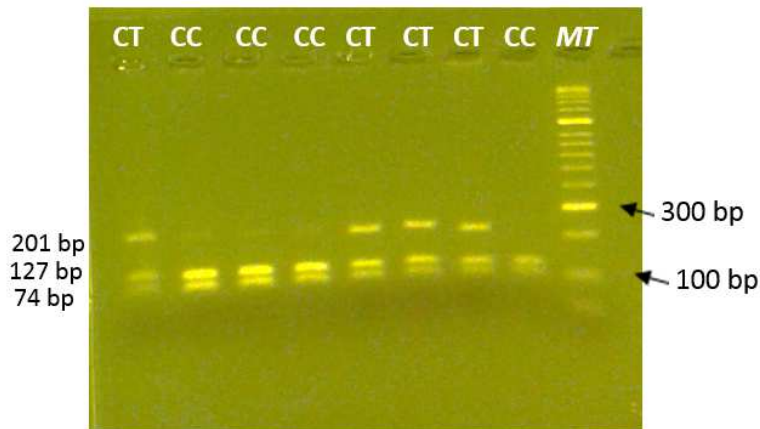


Figure 26: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de VKORC1-1173 C> T. Echantillons avec allèle C (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par StyI, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé.

3.3. Produits de restriction enzymatique du SNP CYP2C9*2 (430 C>T) par *Ava II*

Les tailles des fragments de la restriction enzymatique du CYP2C9*2 (430 C>T) par *Ava II*, correspondants aux différents phénotypes sont :

- **Phénotype sauvage (Wild type) [CC] : 122 + 99 pb**
- **Hétérozygote [CT] : 221 pb+ 122 pb+ 99pb**
- **Muté [TT] :221 pb**

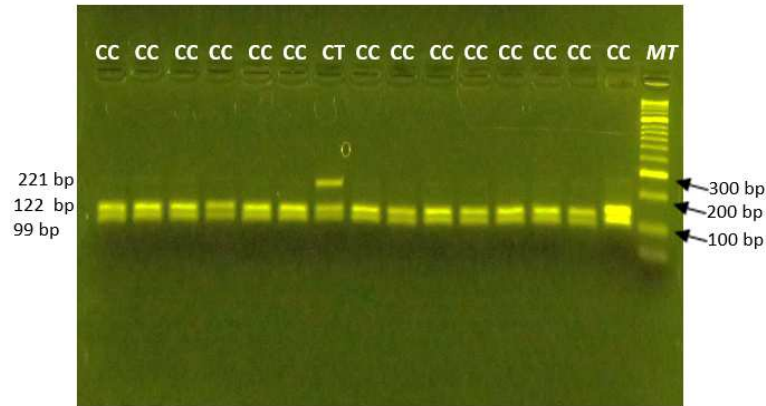


Figure 27: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de CYP2C9*2 (430 C> T). Echantillons avec allèle C (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par *Ava II*, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé

3.4. Produits de restriction enzymatique du SNP CYP2C9*3 (1075 A>C) par *Nsi I*

Les tailles des fragments de la restriction enzymatique du CYP2C9*3 (1075 A>C) par *Nsi I*, correspondants aux différents phénotypes sont :

- **Phénotype sauvage (Wild type ou WT): 116 pb+ 19 pb**
- **Hétérozygote : 135 pb+ 116 pb+ 19pb**
- **Muté : 135 pb**

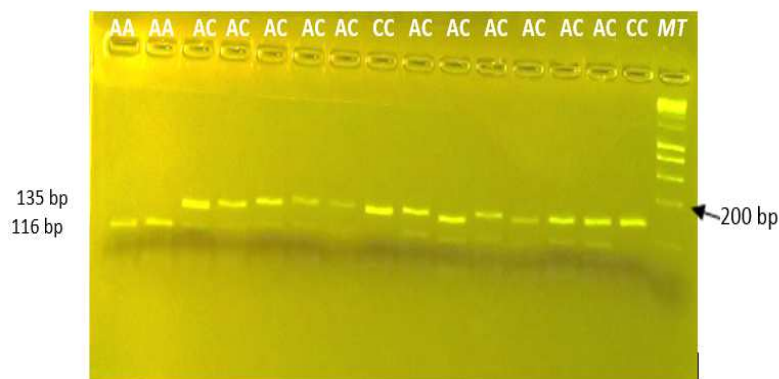


Figure 28: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de CYP2C9*3 (1075 A> C). Echantillons avec allèle A (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par *Nsi I*, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé.

3.5. Produits de restriction enzymatique du SNP CYP4F2 (1347 G>A) par *PvuII*

Les tailles des fragments de la restriction enzymatique du CYP4F2 (1347 G>A) par *PvuII*, correspondants aux différents phénotypes sont :

- **Phénotype sauvage (Wild type) [GG] : 146 pb + 86 pb**
- **Hétérozygote [GA] : 232 bp+ 146 pb + 86 pb**
- **Muté [AA] : 232 pb**

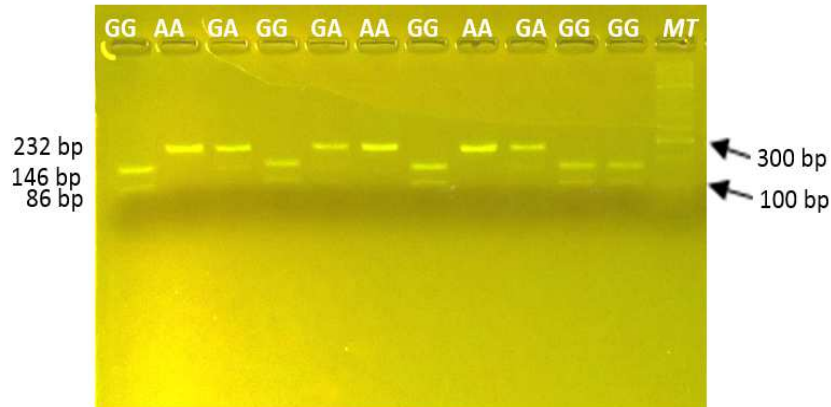


Figure 29: Gel d'agarose à 2% des résultats RFLP de CYP4F2 (1347 G>A). Echantillons avec allèle G (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par *Pvu II*, tandis que l'allèle muté donne un amplicon non coupé.

3.6. Produits de restriction enzymatique du SNP GGCX (12970 C>G) par *Hind III*

Les tailles des fragments de la restriction enzymatique du GGCX (12970 C>G) par le *Hind III*, correspondants aux différents phénotypes sont :

- **Phénotype sauvage (Wild type) [CC] : 1206 pb+ 82 pb**
- **Hétérozygote [CG] : 1288 pb+ 1206 pb**

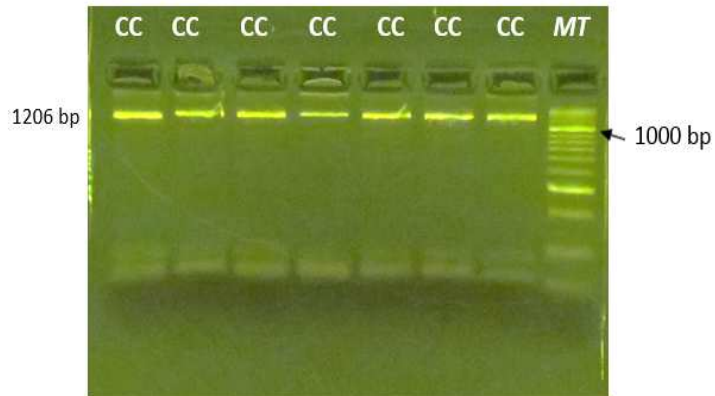


Figure 30 : Gel d'agarose à 3% des résultats RFLP de GGCX (12970 C> G). Echantillons avec allèle G (allèle de type sauvage) produit deux bandes digérées par Hind III.



Discussion

IV. DISCUSSION

1. L'échantillon

Le choix de l'échantillon a été fait selon le type d'analyse moléculaire prévu pour l'étude pharmacogénétique.

Le type de l'échantillon dans une analyse biologique et sa qualité est un facteur déterminant pour la faisabilité et la fiabilité de l'analyse à réaliser.

Pour une étude moléculaire, l'échantillon doit répondre en premier lieu à un type de recherche donnée. Un échantillon inadapté ne permettrait pas de réaliser l'analyse. Dans l'analyse pharmacogénétique que nous avons effectué, l'ADN outil de cette analyse a été extrait et amplifié à partir des cellules sanguines nucléés du sang des patients recueilli sur des tube avec anticoagulant : l'EDTA (éthylène diamine tétra-acétique).

Contrairement aux autres anticoagulants, l'EDTA a l'avantage de ne pas inhiber la PCR.

2. Les méthodes d'études du polymorphisme génétique

Les techniques d'analyse des polymorphismes sont multiples. Elles sont réalisées sur de l'ADN génomique provenant de sang total (pour l'étude des polymorphismes constitutionnels) ou de tumeur (pour les polymorphismes somatiques). Il faut différencier les méthodes d'étude des polymorphismes connus de celles visant à identifier des polymorphismes encore inconnus.

Parmi les techniques d'analyse des SNPs répertoriés, on peut citer :

2.1. Les polymorphismes de taille de fragments de restriction ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

On appelle polymorphisme de taille de fragments de restriction une variation individuelle de la séquence de l'ADN révélée par une modification de la carte de restriction (apparition ou disparition d'un site de coupure pour un enzyme de restriction spécifique)(102)

Les méthodes de mise en évidence montrent des différences individuelles dans la taille des fragments obtenus après digestion par une enzyme de restriction puis révélation. Un RFLP est donc défini par une enzyme de restriction (ou couple enzyme de restriction/sonde) et correspond à un emplacement strictement défini sur le génome : un locus génétique.

Chez un hétérozygote, les deux allèles sont visibles : les RFLP sont donc des marqueurs codominants. Cette technique nécessite l'identification d'un site de restriction renfermant le polymorphisme et un ADN génomique de très bonne qualité, avec des fragments de grande taille. La méthodologie, longtemps exclusivement basée sur la méthode de Southern, s'est enrichie et a connu un progrès majeur avec la technique d'amplification par PCR (réaction en chaîne par polymérase [22]). Ainsi la technique des RFLP a évolué en PCR + RFLP (103)

De ce fait, pour un polymorphisme identifié, créant ou entraînant la disparition d'un site de restriction pour un enzyme de restriction donné, il est possible d'amplifier par PCR un segment d'ADN spécifique de la région d'intérêt contenant la mutation ponctuelle étudiée, à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques, situées de part et d'autre de cette région. Le produit d'amplification est alors digéré par un enzyme de restriction adéquat et les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. Les profils de digestion permettent de constater la présence ou l'absence d'une coupure enzymatique du produit amplifié, révélant la présence ou l'absence du polymorphisme (voir images des gels dans les résultats).

2.2. PCR et séquençage

À partir du produit d'amplification d'un fragment d'ADN renfermant le polymorphisme étudié, il est possible de réaliser un séquençage de ces petits fragments de PCR selon la technique de Sanger, permettant ainsi de confirmer la présence de ce polymorphisme et d'en obtenir la position exacte. Cette technique est précise mais requiert un équipement bien plus coûteux qu'une simple analyse par digestion enzymatique. Toutefois, lorsqu'aucun site de restriction ne permet de discriminer l'allèle sauvage de l'allèle variant, cette technique se révèle être un bon atout.(104)

2.3. Le pyroséquençage

Encore appelé séquençage de 2^{ème} génération, est basé sur un principe de séquençage par synthèse en opposition avec le séquençage par terminaison (méthode Sanger). C'est le séquençage d'un ADN monobrin par synthèse du brin complémentaire, base par base, en détectant à chaque étape l'activité de la polymérase par une autre enzyme chimiluminescente : la luciférase (105)(106)

2.4. PCR et hybridation spécifique d'allèle(104)

Le principe de cette technique repose sur le fait que le mésappariement d'une base lors d'une hybridation spécifique est suffisant pour déstabiliser l'hybride formé entre une sonde et une séquence-cible. La réussite de cette opération repose sur le choix de la sonde (spécifique de la zone où se trouve le SNP) qui doit permettre une bonne discrimination.

Selon les techniques, on peut soit immobiliser la sonde spécifique de l'allèle sur un support solide ou immobiliser le produit PCR. On réalise ensuite une hybridation avec les échantillons d'ADN marqués par radioactivité ou par fluorescence, amplifiés par PCR et dénaturés. Lorsque ce sont les produits de PCR qui sont immobilisés, on réalise l'hybridation avec des sondes marquées. Des séries de lavages permettent d'éliminer tout ce qui n'est pas parfaitement hybridé, et seule une hybridation parfaite du SNP recherché donnera un signal.

2.5. Mesure du point de fusion par PCR en temps réel (rt-PCR)(104)

La technique de PCR en temps réel (rt-PCR) repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction. Le signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés. En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice). Les produits d'amplification peuvent être détectés selon deux grands principes : par marquage non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin et par marquage spécifique à l'aide de sondes fluorescentes (Sondes TaqMan ou balises moléculaires).

2.6. Extension d'amorce

L'extension d'oligonucléotides est une technique robuste de discrimination allélique car une ADN polymérase, ne possédant pas d'activité 3' → 5' exonucléasique, ne peut allonger un oligonucléotide que si celui-ci est parfaitement complémentaire en 3' de la séquence cible. Dans ce cas, selon l'amorce oligonucléotidique discriminante utilisée, il y aura formation ou non d'un produit d'amplification de l'ADN lors de la PCR (107).

D'autres techniques comme le TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes), la PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms), La denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC), le SNP mining et même le séquençage sont utilisées dans l'analyse des SNP inconnus.

3. L'optimisation

3.1. Définition et objectifs

L'optimisation est un acte, un processus ou une méthodologie visant à rendre quelque chose (comme une conception, un système ou une décision) aussi fonctionnel ou efficace que possible. Dans le cas de cette étude pharmacogénétique, il s'agit d'établir les meilleures conditions pour une extraction d'ADN, une amplification, une restriction enzymatique et une électrophorèse optimales.

3.2. Optimisation de l'extraction de l'ADN

Lors d'une analyse génétique, l'une des étapes critiques est l'extraction de l'ADN. L'ADN extrait doit répondre à un certain nombre de critères de qualité et être en concentration suffisante pour permettre la réalisation des techniques de biologies moléculaires. L'extraction et le dosage s'intègrent alors dans la phase pré-analytique du processus de l'analyse de l'ADN et sont considérés comme critiques compte tenu de leur haute importance pour la réalisation des étapes ultérieures. (108)

Plusieurs méthodes existent et se différencient par les moyens de lyse cellulaire et de purification. (Tableau XVI)

Tableau XVI: Méthodes de lyse et de purification utilisées dans les techniques d'extraction de l'ADN

Méthodes de lyse	Méthodes de purification
<ul style="list-style-type: none">• Rupture mécanique : broyage, lyse hypotonique• Traitement chimique : lyse par des détergents, agents chaotropiques, réduction des thiols• Digestion enzymatique	<ul style="list-style-type: none">• Extraction/ précipitation• Chromatographie• Centrifugation• Séparation par affinité

Dans un processus d'optimisation, le choix de la technique repose alors sur différents critères, à savoir :

- ✓ L'acide nucléique cible
- ✓ L'organisme source
- ✓ Le matériel de départ (tissu, feuille, graine, ...)
- ✓ Les résultats escomptés (rendement, pureté, temps de purification requis,...)
- ✓ Technicité (qualification du manipulateur, toxicité des produits,...)
- ✓ Coût
- ✓ L'application en aval (PCR, clonage, séquençage,...)

Dans notre étude, nous avons travaillé sur l'ADN génomique humain extrait des cellules sanguines nucléées, destiné à une PCR-RFLP.

Les éléments pris en compte sont :

La méthode de lyse ; la méthode de purification ; le temps de manipulation, la toxicité des produits, le rendement en concentration d'ADN extrait, et la pureté de l'ADN extrait.

3.2.1. La méthode de lyse utilisant la protéinase K

La protéinase K (PK) est une sérine protéase qui a été isolée à l'origine du bouillon du champignon *Engyodontium album* et qui digère la kératine, d'où son nom. La PK reste active en présence de dénaturants de protéines, ce qui la rend très utile pour dégrader les protéines susceptibles de contaminer les mélanges d'acides nucléiques. L'utilisation de la PK devient un moyen standard d'assurer l'élimination de la DNase, de la RNase et des protéines des préparations d'acides nucléiques.(109)

Une étude réalisée par Qamar et al, sur l'optimisation des conditions d'extraction, a montré que le volume de protéinase K utilisé peut influencer la pureté de l'ADN extrait (par détermination du rapport de DO 260/280).(110)

3.2.2. Le temps de manipulation

Nous pouvons aisément remarquer que la méthode d'extraction au phénol/ chloroforme semble plus fastidieuse, délicate et longue. Ainsi dans notre étude, nous avons pu la résumer

en 24 étapes tandis que la méthode d'extraction sur colonne de silice s'est faite en 14 étapes sur environ 3 heures de temps.

3.2.3. La toxicité des produits

Il faut noter qu'aucun produit chimique ou biologique utilisé en biologie moléculaire n'est sans risque de toxicité. Toutefois, les niveaux de toxicité varient selon la nature des produits, le type et le temps d'exposition. Une extraction d'ADN par la technique au phénol / chloroforme exposerait plus le manipulateur à des risques à cause de l'utilisation du phénol qui est un produit corrosif, toxique et cancérigène ; et du chloroforme aussi cancérigène.

3.2.4. Le rendement et la pureté de l'ADN extrait

Les concentrations d'ADN obtenues après extraction par le phénol/ chloroforme sont plus élevées, variant de 22 à 699.5 ng/ml avec une moyenne de 199.7 ng/ ml ; tandis que la méthode utilisant les colonnes de résine donne des concentrations plus faibles, allant de 10 à 124.5 ng/ ml avec une moyenne de 34.5 ng/ ml

Quant à la pureté de l'ADN, exprimée par le rapport DO 260nm/ 280 nm, on remarque des valeurs allant de et une moyenne de 1.8 dans la méthode d'extraction sur colonnes de résine ; et un plus grand intervalle de variation dans la méthode au phénol/ chloroforme avec des valeurs allant de et une moyenne de 1.7.

Une étude menée par T. Bienvenu et al, a révélé que les concentrations d'ADN extrait sont plus élevées dans les techniques utilisant les solvants organiques (phénol/ chloroforme) ; tandis que pour le rapport de DO 260/ 280nm sont plutôt proches dans les deux techniques.(111)

3.3. L'optimisation de la RFLP

3.3.1. Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases c'est-à-dire des nucléases capables de rompre des liaisons phosphodiester internes entre deux nucléotides de la chaîne de l'acide nucléique.

3.3.2. Nomenclature

La convention de dénomination prend en compte trois caractéristiques de l'origine organique de l'enzyme - le genre, l'espèce et la souche ou le sérotype - pour développer un nom abrégé

suivi de chiffres romains pour représenter plusieurs enzymes de restriction de la même souche.(112)

Le tableau XVII résume les enzymes utilisées dans notre étude, leur source, les séquences reconnues, les coupures et les extrémités après coupures.

Tableau XVII: Sources et séquences reconnues des différentes enzymes de restriction utilisées.

Enzyme	Source	Séquence reconnue	Coupure
<i>Msp I</i>	<i>Moraxella sp</i>	5' CCGG 3' GGCC	5' ---C CGG--- 3' ---GGC C---
<i>Sty I</i>	<i>Salmonella typhi</i>	5' CCWWGG 3' GGWWCC	5' ---C CWWGG--- 3' ---GGWWC C---
<i>Ava II</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	5' GGWCC 3' CCWGG	5' ---G GWCC--- 3' ---CCWG G---
<i>Nsi I</i>	<i>Neisseria sicca</i>	5' ATGCAT 3' TACGTA	5' ---ATGCA T--- 3' ---T ACGTA---
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	5' CAGCTG 3' GTCGAC	5' ---CAG CTG--- 3' ---GTC GAC---
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenza</i>	5' AAGCTT 3' TTCGAA	5' ---A AGCTT--- 3' ---TTCGA A---

*W= A ou T.

3.3.3. Classification des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont classées en quatre classes, en fonction de leur complexité structurelle, de la séquence de reconnaissance, de la position du site de clivage et de l'exigence du cofacteur. Le tableau XVIII résume les caractéristiques distinctives de ces classes.(113)

Tableau XVIII: Caractéristiques des différentes classes d'enzymes de restriction

Classes d'enzymes	Caractéristiques
Type I	<ul style="list-style-type: none"> • Protéines multi-sous-unité avec des activités de restriction et de méthylation • Exigence en ATP • Site de clivage à distance variable du site de reconnaissance
Type II	<ul style="list-style-type: none"> • Séquence de reconnaissance spécifique • Site de clivage à l'intérieur ou à proximité de la séquence de reconnaissance • Génère des extrémités 5' phosphate et 3' hydroxyle au site de clivage • Exigence en Mg₂₊ pour la plupart
Type III	<ul style="list-style-type: none"> • Séquence de reconnaissance en deux parties en orientations inverses • Site de clivage à une distance spécifique de l'une des séquences de reconnaissance • Exigence en ATP
Type IV	<ul style="list-style-type: none"> • Clivage d'ADN seulement méthylé • Site de clivage à environ 30 paires de bases du site de reconnaissance

En raison des caractéristiques spécifiques des enzymes de restriction de type II, celles-ci sont devenues les plus couramment utilisées dans de nombreuses applications de recherche. Le profil de coupe spécifique de ces enzymes a conduit à leur utilisation dans l'analyse du polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP). Ainsi tous les enzymes utilisés dans notre étude sont de type II. (114)

3.3.4. Conditions générales de réaction enzymatique de restriction

Lors de la mise en place de réactions de digestion de restriction, il est important de suivre les recommandations des fournisseurs d'enzymes pour des conditions de réaction optimales. Les paramètres importants à considérer comprennent les quantités de substrat (ADN) et d'enzyme, le volume de réaction et le temps d'incubation. Par définition conventionnelle, dans des

conditions optimales, une unité enzymatique de restriction clive 1µg d'un substrat défini, en une heure et dans un volume de 50 µl.

Il faut noter que divers substrats d'ADN en présence de la même quantité d'enzyme de restriction peuvent avoir des exigences optimales différentes basées sur la fréquence de la séquence de reconnaissance dans le substrat d'ADN et les types de substrat utilisé. Souvent en pratique, les fournisseurs d'enzymes recommandent un excès d'enzyme de 5 à 20 fois (ou 1 µL d'enzyme par réaction de digestion) pour une digestion complète, en raison des variations potentielles de qualité, de quantité et de nature des échantillons d'ADN.

3.3.5. Qualité des réactifs

Pour une réaction enzymatique de restriction, il est aussi important d'avoir des réactifs de bonne qualité (ADN, enzymes de restriction).

Pour assurer une activité efficace des endonucléases de restriction, elles doivent être correctement stockées et utilisées avant leur date d'expiration, conformément aux recommandations du fournisseur. En général, les enzymes doivent être conservées à -20 ° C dans un congélateur sans givre, de préférence en petites aliquotes, pour maintenir l'activité et minimiser les cycles de congélation-décongélation. Les échantillons d'ADN doivent être exempts de contaminants tels que les nucléases, les sels, les solvants organiques (par exemple, le phénol, le chloroforme ou l'alcool) et les détergents qui peuvent inhiber les enzymes et provoquer d'autres effets indésirables.

3.3.6. Temps et température d'incubation

Ces paramètres sont généralement spécifiés par le fournisseur et dépendent du type d'endonucléases à savoir si ce sont des enzymes de restriction « classiques » ou « rapides ».

Dans le cas de ces dernières qui sont conçues pour une digestion en 5 à 15 minutes, il est important que la réaction atteigne la température désirée et que cette température reste constante durant le temps d'incubation.

Pour assurer une activité efficace des endonucléases de restriction, elles doivent être correctement stockées et utilisées avant leur date d'expiration, conformément aux recommandations du fournisseur. En général, les enzymes doivent être conservées à -20 ° C dans un congélateur sans givre, de préférence en petites aliquotes, pour maintenir l'activité et minimiser les cycles de congélation-décongélation. Les échantillons d'ADN doivent être

exempts de contaminants tels que les nucléases, les sels, les solvants organiques (par exemple, le phénol, le chloroforme ou l'alcool) et les détergents qui peuvent inhiber les enzymes et provoquer d'autres effets indésirables.

3.3.7. Les problèmes de la digestion enzymatique

Lors de la visualisation des résultats de la digestion enzymatique par électrophorèse, on peut observer quelques problèmes de digestion, tels que : une digestion incomplète ou absence de digestion, un schéma de clivage inattendu ou des bandes d'ADN diffuses.

3.3.7.1. La digestion incomplète

Une digestion incomplète peut subvenir lorsque trop ou trop peu d'enzyme est utilisée. La présence de contaminants dans l'échantillon peut inhiber la digestion enzymatique. Des conditions de réaction sous-optimales telles que la composition du tampon, le temps d'incubation et la température de réaction sont également des causes fréquentes de digestion incomplète.

L'annexe 5 résume les causes possibles d'une absence de digestion ou une digestion incomplète, avec les recommandations pour y remédier.

Sur gel d'électrophorèse, l'ADN mal digéré présente plusieurs bandes intermédiaires de faibles intensités s'insérant entre les bandes attendues.

3.3.7.2. Le schéma de clivage inattendu

Une cause fréquente de clivage inattendu est les mutations qui peuvent être introduites dans l'ADN du substrat pendant la propagation et l'amplification. Une mutation peut détruire un site de restriction connu ou en créer un nouveau, produisant des résultats inattendus. Le séquençage de l'ADN par Sanger est une méthode utile pour déterminer si une mutation est la cause d'un clivage inattendu de l'ADN substrat.

Il existe d'autres causes, à savoir la contamination de l'ADN par d'autres ADN, la contamination de l'enzyme par d'autres enzymes, etc.

Les causes et recommandations concernant le clivage inattendu sont résumées dans l'annexe 6.

3.3.7.3. Les bandes d'ADN diffuses

La présence de bande diffuses peut s'expliquer par une mauvaise qualité de l'ADN, la contamination des réactifs ou encore une migration lente de l'ADN. (Annexe 6)

3.4. Optimisation de l'électrophorèse

Lors d'une électrophorèse, les différentes étapes, depuis la sélection et la préparation jusqu'à la documentation des gels, peuvent avoir une incidence de séparation de l'acide nucléique. De même, des éléments relatifs aux échantillons, aux réactifs et aux paramètres de migration interviennent pour une séparation et une analyse optimales des acides nucléiques.

3.4.1. Sélection et préparation des gels

L'agarose et le polyacrylamide sont les deux matrices de gel les plus courantes utilisées dans la séparation électrophorétique des acides nucléiques. Le choix entre ces deux matrices dépend principalement de la plage de tailles et de la résolution souhaitée de la séparation des échantillons d'acides nucléiques.

L'agarose forme des matrices avec des tailles de pores idéales pour séparer les molécules d'acides nucléiques dans la plage de 0.1 à 25 Kb. Le polyacrylamide en revanche, forme des pores plus petits, qui résolvent des molécules d'acides nucléiques inférieures à 1 Kb.

En ce qui concerne le pourcentage de gel, en général, les gels à pourcentage plus élevé permettent de meilleures séparation et une résolution des fragments plus petits. Le tableau suivant présente les pourcentages recommandés en gel d'agarose pour la séparation de fragments d'ADN de différentes longueurs.(115)

L'épaisseur du gel et la taille des puits peuvent également influencer sur les résultats de l'électrophorèse. Les gels plus épais peuvent provoquer la diffusion des bandes et une mauvaise visualisation. La taille des puits, définie par la forme du peigne à gel, affecte non seulement la quantité d'échantillon pouvant être chargée mais aussi la résolution des bandes.(116)

Tableau XIX: Pourcentage recommandé des gels d'agarose pour la séparation de fragments d'ADN

Pourcentage de gel	Gamme de séparation efficace (pb)
0.5	2000 à 50 000
0.6	1000 à 20 000
0.7	800 à 12 000
0.8	800 à 10 000
0.9	600 à 10 000
1.0	400 à 8 000
1.2	300 à 7 000
1.5	200 à 3 000
2.0	100 à 2 000
3.0	25 à 1000
4.0	10 à 500
5.0	10 à 300

3.4.2. La qualité des échantillons

La notion de la qualité des échantillons dans l'électrophorèse des acides nucléiques sous-entend la séquence et la conformation des acides nucléiques.

Selon les principes de base de l'électrophorèse, les échantillons d'acides nucléiques ont des mobilités qui diffèrent selon la taille. Cependant les acides nucléiques ayant le même nombre de nucléotides mais une composition et une conformation différentes peuvent avoir des mobilités différentes lors d'une électrophorèse.

Ainsi, l'ADN riche en AT peut migrer plus lentement l'ADN riche en GC de la même taille. Aussi les molécules plus compactes migrent plus vite, suivies des molécules flexibles linéaires et des circulaires ouvertes.(117)(118)

3.4.3. La qualité des réactifs

Mis à part le choix et la qualité du gel, le tampon de migration joue un rôle important dans la réussite de l'électrophorèse des acides nucléiques.

Le Tris- acétate EDTA (TAE) et le Tris- borate EDTA (TBE) sont les deux tampons couramment utilisés dans la préparation de gel et la migration électrophorétique des acides nucléiques. Les échantillons de faibles poids moléculaires sont mieux séparés avec du TBE, tandis que le TAE favorise une meilleure séparation des échantillons de plus grandes tailles.(119)

Le bromure d'éthidium (BET) est un colorant fluorescent couramment utilisé en biologie moléculaire pour permettre la visualisation des bandes d'ADN. A cause de sa toxicité et de son pouvoir mutagène, il est de plus en plus remplacé par d'autres colorants moins toxiques.

3.4.4. Les paramètres de migration

Ces paramètres sont : la tension (V), l'intensité di courant (I) et la puissance (P).

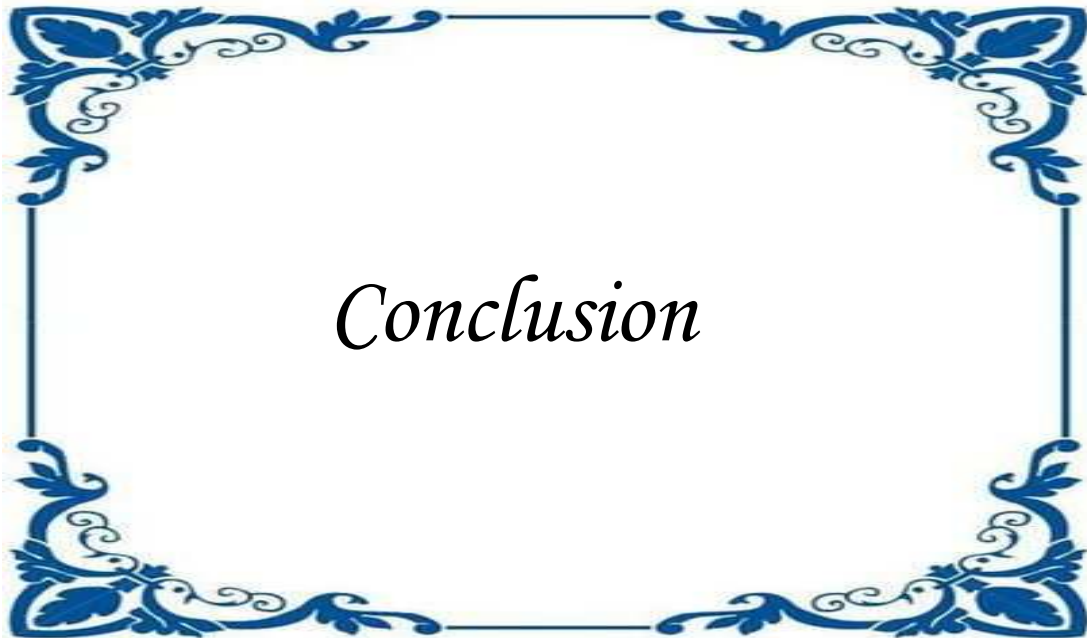
Les équations suivantes dérivées de la loi d'Ohm, peuvent être utilisées pour expliquer comment ces trois paramètres peuvent agir sur les résultats de l'électrophorèse.

Tension = intensité x résistance ou $V = I \times R$

Puissance = intensité x tension ou $P = I \times V$ ou $P = I^2 \times R$

À basse tension, le taux de migration de l'ADN est proportionnel à la tension appliquée, c'est-à-dire que plus la tension est élevée, plus l'ADN se déplace rapidement. La tension est également limitée par le fait qu'il chauffe le gel et peut provoquer sa fusion si un gel est utilisé à haute tension pendant une période prolongée, en particulier pour le gel d'agarose à bas point de fusion.

L'électrophorèse à haute tension produit de la chaleur et l'accumulation de chaleur peut générer des artefacts de gel tels que des fronts de migration en forme de S, et lors d'une électrophorèse prolongée, le gel d'agarose peut même fondre.



V. CONCLUSION

Dans la prise en charge de certaines maladies cardiovasculaires, l'efficacité des antivitamines K n'est plus à prouver. Toutefois, bien que très efficaces, ces médicaments possèdent des effets indésirables qui peuvent être non négligeables : les accidents hémorragiques et thromboemboliques.

La grande variabilité interindividuelle des effets et la variation intra individuelle dépendant de la dose administrée dépendent des facteurs liés au médicament lui-même mais aussi au patient. Ainsi, la marge thérapeutique étroite des AVK leur confère la particularité d'être difficilement manipulables en thérapeutique au risque de se retrouver en zone d'inefficacité ou en de toxicité. Mais aussi la diversité génétique chez l'homme avec les nombreuses mutations qui touchent des gènes sensibles dans le parcours du médicament dans l'organisme jouent un rôle encore plus prépondérant.

La découverte et l'étude des polymorphismes atteignant les gènes qui codent pour les enzymes cibles du métabolisme de la vitamine K et des AVK, ont permis depuis quelques années d'expliquer ces variabilités et de faire la corrélation entre les différents gènes impliqués et l'hypersensibilité ou la résistance aux AVK.

Notre objectif étant de pouvoir mettre en place un outil technique pour l'étude de ces polymorphismes au sein de la population marocaine, nous avons choisi d'analyser les six SNP d'intérêt dans ces variations de réponse et dans la prescription des doses et la réponse thérapeutique.

Cette étude a permis d'explorer les différentes techniques et méthodes (d'extraction, d'amplification et de typage) s'inscrivant dans une démarche d'étude pharmacogénétique. Ainsi dans un processus d'optimisation, nous avons retenu l'extraction de l'ADN sur des colonnes de résine échangeuses d'ions à cause de la meilleure qualité de l'ADN extrait. Et pour le typage, la technique de la PCR – RFLP à cause de sa simplicité d'application, son adéquation pour la recherche des SNP et de son coût abordable.

Les résultats ont révélé avant tout la faisabilité et la fiabilité de cette étude à petite échelle mais aussi à grande échelle, malgré son caractère délicat et fastidieux. L'utilisation des techniques simples (PCR classique, électrophorèse sur gel d'agarose, restriction enzymatique) avec du matériel de qualité (coffret d'extraction rapide) et des réactifs proposant des

préparations prêtes à l'emploi sont des atouts. Cela nous a aussi permis d'éviter certaines manipulations qui augmentent les risques d'erreur et de contamination et qui rendent l'analyse moléculaire plus longue et coûteuse. L'analyse des différents SNP impliqués dans la pharmacogénétique des AVK est une étape décisive pour un processus de prise en charge personnalisée des patients. Notre étude, dans le projet où elle s'insère est prometteuse dans le cadre où elle peut se prolonger par des analyses génomiques et des études biostatistiques, pour l'établissement d'un algorithme de prédiction de dose d'acenocoumarol propre au profil marocain.

Le but ultime est de mettre à disposition des cliniciens des techniques de dépistage des polymorphismes impliqués dans plusieurs autres thérapeutiques, maîtrisées au niveau local, et des outils pour la prescription du bon médicament, à la bonne dose, au bon moment et au bon patient. Ainsi la médecine personnalisée ne serait plus un concept, mais une pratique intégrée dans la pratique médicale marocaine.



RESUME

Titre : Mise en place d'un workflow pour l'étude pharmacogénétique des Antivitamines K

Auteur : NAHM-TCHOUGLI Christiana Philippa Linanipo

Mots clés : Pharmacogénétique, PCR-RFLP, Antivitamines K ; SNP, Optimisation

L'avènement des « OMICS » et la maîtrise des biomarqueurs tels que les SNP impliqués dans les différents processus physiopathologiques ont impacté la pratique médicale en permettant une prise en charge personnalisée du patient

Bien que l'on ait identifié des associations entre des polymorphismes génétiques, la dose et la réponse aux antivitamines K, leurs applications ne sont pas encore intégrées dans la pratique médicale au Maroc faute du coût, du délai associés aux tests génétiques, de la disponibilité des tests, des considérations éthiques et du manque de données probantes.

L'objectif de notre étude est de mettre en place un processus intégrant tout le flux des techniques qui entrent dans la réalisation du génotypage des six polymorphismes impliqués dans la pharmacogénétique des antivitamines K (l'acenocoumarol) au sein de la population marocaine. Il s'agit de : VKORC1-1639 G>A, VKORC1 1173 C>T, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP4F2 1347 G>A et GG CX 12970 C>G.

Nous avons procédé à l'analyse des six SNP à partir de l'ADN génomique des patients sous acenocoumarol. Le processus inclut une étape d'extraction à partir du sang par deux méthodes : une classique au phénol/ chloroforme et une autre par chromatographie échangeuse d'ions. Les gènes ont été amplifiés par PCR classique. Les amplicons purifiés ont été génotypés pour tous les SNP étudiés en utilisant la technique RFLP. Les produits après digestion enzymatique par des endonucléases ont été analysés sur un gel d'agarose à 2% et 3%.

Les résultats après électrophorèse des produits digérés ont montré des bandes de fragments d'ADN traduisant des phénotypes soit sauvages (WT), (soit) mutés (Mut) ou hétérozygotes (Htz) pour chacun des gènes.

Cette méthode d'étude appliquée à grande échelle dans la population marocaine servirait à établir un algorithme de prédiction de dose de l'acenocoumarol ou d'autres médicaments.

ABSTRACT

Title: Implementation of a workflow for the pharmacogenetic study of Antivitamins K

Author: NAHM-TCHOUGLI Christiana Philippa Philippa Linanipo

Keywords: Pharmacogenetics, PCR-RFLP, Antivitamins K; SNP, Optimization

The advent of "OMICS" and the control of biomarkers such as SNPs involved in the various pathophysiological processes have had an impact on medical practice by allowing personalized patient management.

Although associations have been identified between genetic polymorphisms, dose and response to antivitamins K, their applications are not yet integrated into medical practice in Morocco due to the cost, delay associated with genetic testing, test availability, ethical considerations and lack of evidence.

The objective of our study is to set up a process integrating all the flow of techniques involved in the genotyping of the six polymorphisms involved in the pharmacogenetics of anti-vitamins K (acenocoumarol) in the Moroccan population. It is about : VKORC1-1639 G>A, VKORC1 1173 C>T, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP4F2 1347 G>A and GG CX 12970 C>G.

We analyzed the six SNPs from the genomic DNA of patients on acenocoumarol. The process includes a step of extraction from blood by two methods: a conventional phenol/chloroform method and an ion exchange chromatography method. The genes were amplified by conventional PCR. Purified amplicons were genotyped for all SNPs studied using the RFL.P technique. The products after enzymatic digestion by endonuclease were analysed on a 2% and 3% agarose gel.

The results after electrophoresis of the digested products showed strips of DNA fragments translating either wild (WT), mutated (Mut) or heterozygous (Htz) phenotypes for each of the genes.

This method of study applied on a large scale in the Moroccan population would be used to establish a dose prediction algorithm for acenocoumarol or other drugs.

ملخص

العنوان: تنفيذ سير العمل لدراسة pharmacogenetic الخاصة بمضادات الفيتامين ك

المؤلف: NAHM-TCHOUGLI Christiana Philippa Linanipo

الكلمات المفتاحية: pharmacogenetics، PCR-RFLP، مضاد الفيتامين ك، SNP، التحسين

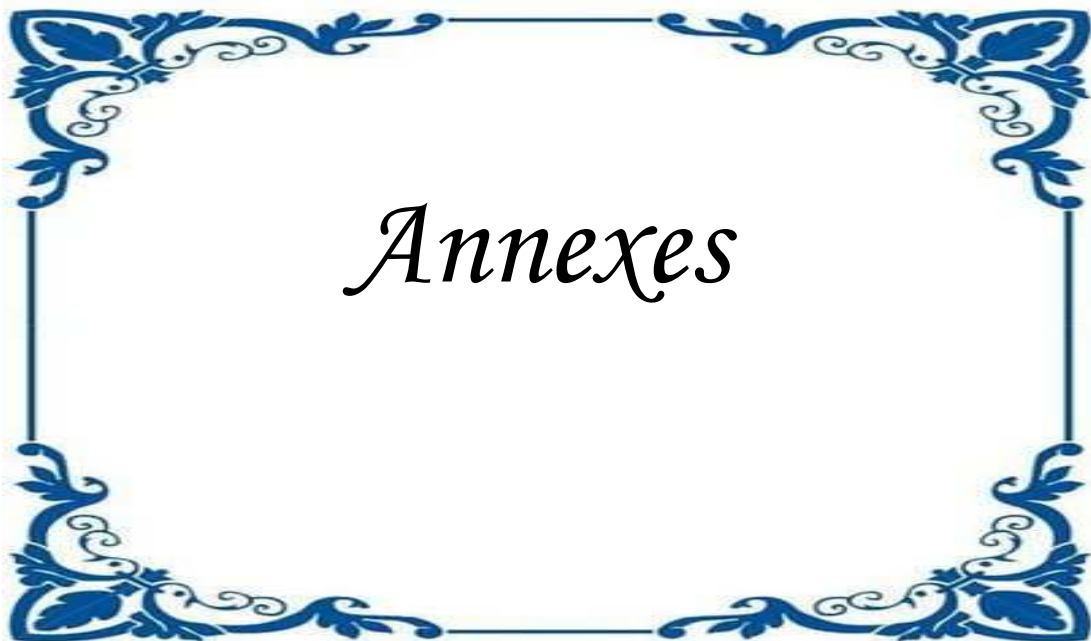
مع رسم خريطة الجينوم البشري والتقدم التكنولوجي في بداية القرن، مع ظهور "الأوميكس"، تتمثل الأهداف الجديدة في الانتقال من الطب السكاني إلى الطب الفردي، في العلاج ولكن أيضا الوقاية. وهكذا تم استكشاف المؤشرات الحيوية مثل عدد الأشكال الوراثية لتحقيق هذه الغاية. في العلاج الدوائي للقلب والأوعية الدموية، فإن التنوع الكبير بين جرعات مضادات فيتامين ك والاستجابة معروف جيدا. على الرغم من تحديد الارتباطات بين تعدد الأشكال الجينومية الجرعة والاستجابة لمضادات فيتامين K، إلا أن تطبيق هذه المعرفة لم يُدمج بعد في الممارسة الطبية في المغرب. والتكلفة والوقت المرتبط بين الاختبارات الجينية، وتوافر الاختبارات، والاعتبارات الأخلاقية، ونقص الأدلة، هيمن بين العوائق التي تحول دون الاستخدام الأكثر انتشارًا للاختبارات الصيدلانية.

والهدف من دراستنا هو تطوير عملية تدمج جميع التقنيات المستخدمة لأداء التنميط الجيني لستة الأشكال تشارك في علم الوراثة الدوائي الخاص بمضادات الفيتامين ك (اسينوكومارول) الخاص بالشعب المغربي. وهذه هي $VKORC1-1639 G > A$ ، $VKORC1 1173 > T$ ، $CYP2C9 * 2$ ، $CYP2C9 * 3$ ، $CYP4F2$ ، $GGCX 12970 > G$ و $1347 G > A$ المشاركة في الجرعة و / أو حساسية في الاستجابة لهذه الفئة من الأدوية.

قمنا بتحليل ستة SNPs بواسطة طريقة PCR-RFLP من الحمض النووي الجيني للمرضى تحت acenocoumarol. وتشمل العملية خطوة استخراج الفينول / كلوروفورم القياسية والكروماتوغرافي التبادل الأيوني عمود الأيون. تم تضخيم الجينات عن طريق تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR) التقليدي الذي استخدم mastermix تجاري. تم تنميط amplicons المنقى لجميع SNPs باستخدام RFLP. تم تحليل منتجات هضم الانزيمات المقيدة على هلام الاغاروز 2% و 3%.

وأظهرنا لنتائج بعد الرحلان الكهربائي للمنتجات المهضومة أشرطة من شظايا الحمض النووي المطابقة للنتائج المتوقعة.

هاته الطريقة المطبقة على نطاق واسع على السكان المغاربة مكنت من إنشاء خوارزمية توقع الجرعة من acenocoumarol أو أدوية أخرى وتسمح بإعطاء الدواء المناسب، الجرعة المناسبة، إلى المريض الصحيح و الوقت الصحيح.



Annexes

Annexe 1 : Tables des différentes indications des Antivitamines K, les durées de traitement et les principales recommandations.

Indications	INR cible	Durée du traitement	Grade de recommandation
* Thrombose veineuse profonde (TVP) :			
-Traitement initial de la TVP Démarrer les AVK le premier jour en même temps que l'héparine non fractionnée ou les héparines à bas poids moléculaire.		• 4 à 6 semaines en cas de TVP distale postopératoire avec disparition du facteur de risque ont pu être proposées	Grade 1A
-Traitement à long terme de la TVP -Premier épisode secondaire à un facteur de risque réversible ou temporaire (chirurgie, traumatisme, immobilisation, utilisation d'œstrogènes) incluant la thrombose d'une veine proximale ou des veines caves. Premier épisode de TVP idiopathique ¹	2,5 (entre 2 et 3)	• 3 à 6 mois dans la majorité des cas • traitement supérieur à 6 mois en cas de récurrence ou si persistance du risque thromboembolique.	Grade 1A
-Premier épisode de TVP et présence d'un syndrome des antiphospholipides ou de 2 ou plus facteurs thrombophiliques (facteur Leiden et mutation 20210 du gène de la prothrombine)	2,5 (entre 2 et 3)		
-Deuxième accident idiopathique ou associé à une thrombophilie sévère en particulier homozygote ou combinée ou AT hétérozygote.		12 mois	Grade 2B
-Patients avec anticorps lupiques en l'absence de risques thromboemboliques et s'il n'y a pas d'échec du traitement.	3 (entre 2,5 et 3,5)		
-Accidents thromboemboliques récidivants ou autres facteurs de risques thromboemboliques.			Grade 2C
-TVP et cancer	2,5 (entre 2 et 3)	A vie ou jusqu'à résolution du cancer	Grade 1C

1. Ces patients peuvent être candidat à une anticoagulation à vie. Pour certains auteurs 3-6mois sauf si risque thromboembolique important (déficit en antithrombine, anticorps lupiques, déficit homozygote, récurrence de l'épisode spontané).

Indications	INR cible	Durée du traitement	Grade de recommandation
* Fibrillation auriculaire (FA) :			
-Patients en ACFA paroxystique avec facteurs de risques thromboemboliques (antécédent d'AVC ou d'embolie systémique, âge supérieur à 75 ans, fonction systolique du ventricule gauche altérée et/ou insuffisance cardiaque congestive, HTA, diabète.)	2,5 (entre 2 et 3)	À vie (ou tant que dure la FA)	Grade 1A
-Patient en ACFA chronique avec âge entre 65 et 75 ans sans autres FDR	2,5 (entre 2 et 3)	À vie (ou tant que dure la FA)	Grade 1A
* Flutter auriculaire :	Idem	Idem que pour ACFA	Grade 2C
* FA et sténose mitrale :	2,5 (entre 2 et 3)		Grade 1C+
* FA après chirurgie cardiaque :	2,5 (entre 2 et 3)	À poursuivre plusieurs semaines	Grade 2C
* Cardioversion d'une FA ou d'un flutter auriculaire :			
-Durée de la FA > 48H, cardioversion pharmacologique ou électrique programmée	2,5 (entre 2 et 3)	3 semaines avant et au moins 4 semaines après une cardioversion réussie	Grade 1C+
-Cardioversion programmée en urgence	2,5 (entre 2 et 3)	À poursuivre 4 semaines ¹	Grade 2C
-Cardioversion d'un flutter auriculaire	2,5 (entre 2 et 3)	Idem que pour FA	Grade 2C

1. Poursuivre les antivitamines K au-delà de 4 semaines si facteurs de risques thromboemboliques et antécédent de fibrillation auriculaire.

Indications	INR cible	Durée du traitement	Grade de recommandation
* Pathologie valvulaire :			
-Valve mitrale rhumatismale avec fa antécédent d'embolie systémique.	2,5 (entre 2 et 3)	À long terme	Grade 1C+
-Valve mitrale rhumatismale, avec une oreillette gauche de diamètre 5.5cm.	2,5 (entre 2 et 3)	À long terme	Grade 2C
-Prolapsus de la valve mitral.	2,5 (entre 2 et 3)	3 semaines avant et 4 semaines après	Grade 2C
-Prolapsus de la valve mitral avec ait à répétition ou embolie systémique documenté malgré la prise d'aspirine (160mg/j).	2,5 (entre 2 et 3)	À long terme	Grade 2C
-Calcification mitrale annulaire avec embolie systémique non calcifié.	2,5 (entre 2 et 3)	À long terme	Grade 2C
-Anomalies de la valve et des cordages aortiques : si athérome mobile et plaque aortique 4mm.			Grade 2C
* Prothèses mécaniques :			
-Valve saint Jude en position aortique.	3,7 (entre 3 et 4,5)	À vie	Grade 1A
-Valves en position mitrale.	3,7 (entre 3 et 4,5)	À vie	Grade 1C+
-Valves en position aortique, OG de taille normale.	2,5 (entre 2 et 3)	À vie	Grade 1C+
-Valves à bille.	3 (entre 2 et 3)	À vie	Grade 1C+
-Valve et autres facteurs de risques thromboemboliques (fibrillation auriculaire, oreillette gauche dilatée, lésion de l'endocarde, basse fraction d'éjection...).	3 (entre 2 et 3)	À vie	Grade 2A
-Valve mécanique avec survenue d'embolies systémiques (et INR dans l'intervalle thérapeutique).	3 (entre 2 et 3)	À vie	Grade 1c+

Indications	INR cible	Durée du traitement	Grade de recommandation
* Bioprothèses :			
-En position mitrale.	2,5 (entre 2 et 3)	pendant 3 mois	Grade 1C+
-En position aortique. ¹	2,5 (entre 2 et 3)	pendant 3 mois	Grade 2C
+Si antécédent d'embolie systémique.		Prolonger le traitement jusqu'à 12 mois	Grade 1C
+Si fibrillation auriculaire associée.		Prolonger le traitement (long terme) ²	Grade 1C
+Si sous AVK, survient un accident thromboembolique ou si atteinte coronaire associée.			(niveau 1)
+Si endocardite sur valve mécanique.		Continuer AVK à long terme	Grade 2C
* Pathologie coronarienne :			
-Patient à haut risque d'accident coronarien (âge, facteurs de risques cardiovasculaires) et en prévention primaire.	INR cible= 1,5		Grade 2A
* Occlusion artérielle périphérique :			
-Traitement de l'embolie, en relais de l'héparinothérapie.		Long terme	Grade 1C
-Pontage infra inguinal avec facteurs de risques emboliques et de perte de membres.			Grade 2B
* Accidents cérébraux :			
-Prévention des accidents vasculaires cérébraux d'origine non cardioembolique uniquement chez les patients avec désordres prothrombotique documentés.			Grade 2C
-Thrombose veineuse cérébrale	2,5 (entre 2 et 3)	Pendant 3 à 6 mois	Grade 1C

1. Aspirine (80-100mg/j) est plus recommandée : grade 1C.

2. La société française de cardiologie recommande un traitement à vie.

Indications	INR cible	Durée du traitement	Grade de recommandation
* Chirurgie à risque :			
-Chirurgie orthopédique.	2,5 (entre 2 et 3)	Durée fonction du risque thromboembolique, à évaluer au cas par cas. Traitement à démarrer préopératoire ou le soir de l'intervention.	Grade 1A
-Arthroplastie élective de la hanche.	2,5 (entre 2 et 3)	Durée fonction du risque thromboembolique, à évaluer au cas par cas. Traitement à démarrer préopératoire ou le soir de l'intervention.	Grade 1A
-Arthroplastie élective du genou.	2,5 (entre 2 et 3)	Pendant au moins 28 à 35 jours	Grade 2B ¹
-chirurgie des fractures de hanche.	2,5 (entre 2 et 3)	Pendant au moins 28 à 35 jours	Grade 1A
-Remplacement total de hanche.	2,5 (entre 2 et 3)	Pendant au moins 10 jours	Grade 1A
-Arthroplastie totale du genou traumatisé. ²	2,5 (entre 2 et 3)	Durée fonction du risque thromboembolique, à évaluer au cas par cas.	Grade 2B
-Hématomes vertébro-médullaires, durant la phase de réhabilitation.	2,5 (entre 2 et 3)	Durée fonction du risque thromboembolique, à évaluer au cas par cas.	Grade 1C

1. Pour l'anticoagulation poste opératoire, AVK=grade 1C+.

2. Après la sortie de l'hôpital et uniquement pour les patients avec mobilité limitée.

Annexe 2 : Médicaments potentialisant les antivitamines K (liste non exhaustive)

Médicaments potentialisant :	Niveau de preuve	Mécanisme *	Observations
Acide étacrynique		b	
Acide nalidixique	III	b	
Acide oxalinique		b	
Acide tiénilique		a, b	
Allopurinol	I	a	Pas d'effet sur la warfarine ?
Amiodarone		a	
Amoxicilline		b, g	En état de malnutrition
Aspirine	III	b, d	
Chloramphénicol		c, e, g	
Cimétidine	I	a, c, e	Pas d'effet sur phenprocoumone
Ciprofloxacine	II	g	
Cotrimoxazole		a	
Clofibrate	I	b	
Clotrimazole		c	
Corticoides		a, c	
Diazépam		a	Démontré pour phenprocoumone
Disulfirame	II	e	
Érythromycine	I	e	
Fluconazole	I	e	
Glucagon		?	
Hormones thyroïdiennes		f	
Indométacine	IV	d	
Isoniazide	IV	e	
Metronidazole	I	a, d	Pas d'effet sur phenprocoumone ?
Miconazole	I	d	
Phénylbutazone	I	a, b, c, d	À éviter absolument
Phénytoïne	II	b	Action biphasique avec inhibition tardive
Piroxicam	I	b, d	
Quinidine	II	?	
Salicylates	III	c, d	
Stéroïdes anabolisants	I	b, e	
Sulfinpyrazone	I	b, e	
Sulfonamides		b, c	
Tolbutamide		b	

- a. Inhibition de la clairance hépatique.
- b. Déplacement de la liaison avec les protéines transporteuses.
- c. Inhibition des modifications métaboliques des coumarines.
- d. Inhibition de la fonction plaquettaire.
- e. Inhibition enzymatique.
- f. Diminution de la synthèse des facteurs vitamine K dépendants.
- g. Diminution de la production endogène de vitamine K (flore bactérienne).

Annexe 3 : Médicaments *inhibant les antivitamines K (liste non exhaustive)*

médicaments inhibiteurs :		Niveau de preuve	Mécanisme *	Observations
Neuroleptiques	Carbamazépine	I	a CYP3A4	
	Barbiturique	I	a CYP3A4	
	Phénytoïne		a CYP3A	
	Hydantoïne		a	
	Méprobamate		a	
Antibiotiques	Rifampicine	I	a	
	Nafciline	I	a CYP3A4	
	Dicloxaciline	II	a	
	Azathioprine	III	a	
Médicaments de l'appareil digestif	Antiacides	I	c	Ne pas administrer simultanément (2 h d'intervalle)
	Charbon activé		c, d	
	Cholestyramine	I	c, d	
	Laxatifs	I	c	
Divers	Chlordiazepoxide		a	son usage jusqu'à 3 fois/j est sans effet
	Cyclosporine	III	?	
	Éthanol		a ?	
	Etrétinate	III	?	
	Gluthétimide		a CYP2B1	
	Griséofulvine	I	a inconnue	
	Œstroprogestatifs		b	
	Phénazone		a	
Trazodone	III			
Vitamine K	I	b		

* Signification :

- b. Induction enzymatique (accélération du métabolisme et de la clearance hépatique).
- c. Augmentation de la synthèse des facteurs vitamine K dépendants.
- d. Diminution de l'absorption des AVK.
- e. Augmentation de l'élimination par interruption du cycle entérohépatique.

Annexe 4 : Teneur en vitamine K dans les produits alimentaires.

Aliments	Vitamine K (mg)/100g
<i>Teneur élevée :</i>	
Épinards	3,0
Choux-fleurs	3,0
Choux de Bruxelles	1,0
Tomates (vertes)	0,8
Foie de porc	0,6
Huile de tournesol	0,5
Choux verts et feuilles vertes de chou blanc	0,4
Tomates (mûres)	0,4
Petits pois, haricots- verts	0,3
Foie de bœuf	0,2
Viandes (bœuf, porc, mouton)	0,2
Soja	0,18
Foie de veau	0,15
Asperges	0,1
Foie (cabillaud, morue)	0,1
Fraises	0,1
Fruits de l'églantier (cynorhodons)	0,1
<i>Teneur moyenne :</i>	
Pommes de terre	0,08
Son de froment	0,07
Flocons d'avoine	0,07
Huile de germes de maïs	0,05
Germes de blé	0,035
Miel	0,025
Œufs (environ 50 g)	0,02
<i>Teneur faible :</i>	
Carottes	0,01
Champignons	0,01
Grains de maïs	0,01
Lait de vache	0,002

Annexe 5 : causes et recommandations lors d'une digestion incomplète ou une absence de digestion enzymatique

Causes possibles	recommandations
Enzyme inactive	<ul style="list-style-type: none">• Vérifiez la date d'expiration de l'enzyme.• Vérifiez que l'enzyme a été stockée à -20 ° C. En dessous de cette température, l'enzyme peut geler et devenir inactive.• Évitez plusieurs cycles de congélation-décongélation (pas plus de trois cycles). Utilisez un refroidisseur de paille pour stocker et transporter les enzymes.• Ne stockez pas l'enzyme dans un congélateur sans givre ou dans les étagères de la porte du congélateur.
Protocole de digestion sous-optimale	<ul style="list-style-type: none">• Suivez le protocole recommandé par le fabricant pour l'enzyme de restriction et le type d'ADN substrat.• Vérifiez que tous les additifs ou cofacteurs (par exemple, DTT, Mg²⁺, ATP, S-adénosylméthionine) sont présents dans la réaction. Certaines enzymes de restriction nécessitent ces activités (par exemple, DTT pour Esp3I).• Utilisez le tampon de réaction recommandé fourni avec l'enzyme. Pour les digestions doubles, suivre les recommandations du fabricant concernant la compatibilité du tampon et d'autres conditions de réaction.• Effectuer la réaction à la température optimale spécifiée par le fabricant. Pour les digestions doubles avec des enzymes nécessitant des températures différentes, effectuez d'abord la digestion à basse température, puis effectuez la deuxième digestion à la température la plus élevée.• Assurez-vous que l'évaporation n'a pas réduit le volume de réaction pendant l'incubation, ce qui a entraîné une augmentation des concentrations de sel pouvant réduire l'activité enzymatique. Pour les enzymes thermophiles, utilisez un thermocycleur avec un couvercle chauffant.
Mauvaise dilution des enzymes	<ul style="list-style-type: none">• Évitez de pipeter de petits volumes (<0,5 µL). Faire un plus grand stock de travail pour s'assurer que la quantité d'enzyme ajoutée à chaque réaction est précise.• Faire le stock de travail de l'enzyme en utilisant un tampon de dilution recommandé par le fabricant.• Ne diluez pas les enzymes de restriction dans l'eau ou dans le tampon de réaction 10X.

Mauvais assemblage de réaction	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter l'enzyme de restriction en dernier lieu à la réaction. Mélanger le tube de réaction après l'ajout de l'enzyme pour s'assurer que l'enzyme ne se dépose pas au fond en raison de la densité du glycérol.
Excès de glycérol dans le milieu réactionnel	<ul style="list-style-type: none"> Maintenir la concentration de glycérol dans le mélange réactionnel à <5%. Le volume d'enzyme de restriction ajouté à la réaction ne doit pas dépasser 1/10 du volume réactionnel total, en particulier pour les doubles digestions. Assurez-vous que l'évaporation ne réduit pas le volume de la réaction, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de glycérol.
Concentration d'ADN sous-optimale	<ul style="list-style-type: none"> Gardez la concentration d'ADN dans le mélange de digestion à la gamme optimale de 20-100 ng / μL.
Contaminants dans la solution d'ADN	<ul style="list-style-type: none"> Éliminer le SDS résiduel, l'EDTA, les protéines, les sels ou les nucléases par purification sur colonne de silice, ou par extraction au phénol: chloroforme et précipitation à l'éthanol. Laver le culot d'ADN avec 70% d'éthanol glacé pour éliminer l'EDTA et les sels. Pour la digestion des produits PCR non purifiés, mettre en place la réaction de digestion avec le mélange PCR ne dépassant pas 1/3 du volume réactionnel final (par exemple, 10 μL de mélange PCR dans 30 μL de réaction totale de digestion). Si l'ADN a été purifié en utilisant des suspensions de silice ou de résine, éliminer toutes les particules restantes par centrifugation pendant 10 minutes à $\geq 10\ 000 \times g$. Ne transportez pas les résines lors du transfert de la solution d'ADN dans un nouveau tube.
Séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction manquante dans l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> Revérifiez ou séquencez le modèle d'ADN. Si la séquence de reconnaissance a été introduite par des amorces de PCR, vérifiez que la séquence d'amorce contient le site de reconnaissance et 4 à 8 bases supplémentaires à l'extrémité 5'. Vérifiez si l'enzyme de restriction nécessite plus d'un site de reconnaissance par cible pour l'activité complète. L'addition d'un oligonucléotide d'ADN contenant la séquence de reconnaissance, ou la spermidine, peut améliorer l'activité des enzymes de restriction qui nécessitent au moins deux sites pour une digestion optimale (par exemple, AarI, SfiI).
Effets de méthylation	<ul style="list-style-type: none"> Vérifiez la sensibilité à la méthylation de l'enzyme de restriction. Si l'enzyme de restriction est inhibée par méthylation de son site de reconnaissance, rechercher un néoschizomère ou un isoschizomère qui n'est pas affecté par la méthylation (par exemple MvaI pour EcoRII).

	<ul style="list-style-type: none"> • Pour éviter la méthylation de l'ADN, propager les plasmides dans les hôtes <i>E. coli</i> qui sont dam^- / dcm^-. • Si l'enzyme de restriction nécessite une méthylation au niveau de sa séquence de reconnaissance de l'activité (par exemple, DpnI ou SgeI), propager les plasmides dans les souches dcm^+ / dam^+ <i>E. coli</i>. En variante, rechercher un néoschizomère ou un isoschizomère de l'enzyme de restriction qui digère l'ADN non méthylé (par exemple, MboI pour DpnI).
Structure de l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Pour l'ADN plasmidique surenroulé, dans lequel les sites de restriction peuvent être enterrés, utiliser des enzymes qui ont été certifiées pour digérer les plasmides intacts. Ajouter plus d'enzyme de restriction (par exemple, 5-10 unités d'enzyme par microgramme d'ADN) si nécessaire. • Pour l'ADN linéaire avec des sites de restriction près des extrémités, vérifiez les bases supplémentaires requises par les enzymes pour une digestion complète. • Si vous effectuez une double digestion au sein du site de clonage multiple (MCS) d'un vecteur, vérifiez la proximité des séquences cibles et le nombre requis de bases entre les sites pour une activité de 100%. La digestion avec la première enzyme peut avoir un effet négatif sur l'activité de la seconde enzyme. • Vérifiez si l'enzyme de restriction nécessite plus d'un site de reconnaissance par cible pour l'activité complète. L'addition d'un oligonucléotide d'ADN contenant la séquence de reconnaissance, ou la spermidine, peut améliorer l'activité des enzymes de restriction qui nécessitent au moins deux sites pour une digestion optimale (par exemple, AarI, SfiI).
Impureté dans l'eau	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuger environ 1 ml d'eau (10 minutes, 10 000 x g) pour granuler et visualiser les contaminants qui peuvent être présents. • Effectuer une digestion témoin négatif avec de l'eau à la place de l'enzyme pour déterminer la présence de nucléases ou de contaminants bactériens dans l'eau. • Envisagez d'utiliser de l'eau fraîche de qualité biologique exempte de nucléase provenant d'une source commerciale fiable.

Annexe 6 : causes et recommandations lors d'un clivage inattendu dans une réaction de restriction enzymatique

Causes possibles	recommandations
Activité étoile de l'enzyme de restriction	<ul style="list-style-type: none"> • N'utilisez pas plus que la quantité d'enzyme recommandée (par exemple, 10 unités d'enzyme par microgramme d'ADN). Réduire la quantité d'enzyme dans la réaction, si nécessaire. • Éviter l'incubation prolongée de la réaction de digestion. • Utilisez le tampon de réaction recommandé. Une faible concentration en sel, un pH sous-optimal et des cations divalents autres que les ions Mg^{2+} peuvent provoquer une activité stellaire. • Vérifiez qu'il n'y a pas plus de 5% de glycérol dans la réaction. • Assurez-vous que l'évaporation n'a pas réduit le volume de la réaction, entraînant une augmentation des concentrations de glycérol (> 5%) et de sel.
Contamination avec une autre enzyme	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisez un nouveau tube d'enzyme et / ou de tampon. L'enzyme de restriction ou le tampon de réaction peut avoir été contaminé par une autre enzyme de restriction en raison d'une mauvaise manipulation.
Contamination avec d'autres ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Préparer un nouvel échantillon d'ADN.
Migration plus lente de l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Chauffer l'ADN digéré pendant 10 minutes à 65 ° C en présence de tampon de chargement avec 0,2% de SDS avant l'électrophorèse. Cela dissociera toute enzyme qui pourrait rester liée à l'ADN substrat, ce qui modifierait la mobilité électrophorétique de l'ADN.
Séquences de reconnaissance inattendues dans l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Revérifiez les stratégies de clonage et les sites ligaturés. Les sites de restriction nouvellement générés dans les constructions d'ADN peuvent être négligés. • Confirmer l'intégrité de la séquence d'ADN par séquençage de Sanger. Des mutations peuvent avoir modifié un site de restriction sur le modèle. Repropaillez le plasmide ou amplifiez la séquence cible d'origine avec une ADN polymérase de haute fidélité. La méthylation peut affecter le clivage des enzymes de restriction (par exemple, MboI est inhibée par la méthylation, mais DpnI est activé). Voir les recommandations pour les effets de méthylation lors d'une digestion incomplète ou absence de digestion enzymatique.

Annexe 7 : causes et recommandations pour les bandes diffuses

Causes possibles	Recommandations
Mauvaise qualité de l'ADN	<ul style="list-style-type: none">• Examiner l'ADN non digéré par électrophorèse. Purifier l'ADN si une bande diffuse est observée sur le gel.
Réactifs contaminés	<ul style="list-style-type: none">• Préparer de nouveaux réactifs, utiliser de nouvelles enzymes ou purifier l'ADN si nécessaire. Les composants de la réaction peuvent avoir été contaminés par des nucléases résultant d'une mauvaise manipulation.
Migration plus lente de l'ADN	<ul style="list-style-type: none">• Chauffer l'ADN digéré pendant 10 minutes à 65 ° C en présence de tampon de chargement avec 0,2% de SDS avant l'électrophorèse. Cela dissociera toute enzyme qui pourrait rester liée à l'ADN substrat, ce qui modifierait la mobilité électrophorétique de l'ADN.



Bibliographie

1. Chanachev A, Conus P, Eap C. La pharmacogénétique/pharmacogénomique en psychiatrie, perspectives théoriques et perspectives pour l'avenir. *Inf Psychiatr.* 2011;87(9):697.
2. Haufroid V, De Meyer M, Wallemacq P, Mourad M. LA PHARMACOGÉNÉTIQUE COMME AIDE PRÉCIEUSE AU MONITORING THÉRAPEUTIQUE : L'EXPÉRIENCE ACQUISE AUX CLINIQUES UNIVERSITAIRES SAINT-LUC AVEC LES MÉDICAMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS UTILISÉS EN TRANSPLANTATION RÉNALE*. *Pharmacogénétique.* 2015 ;134(7):373–8.
3. Moreau C, Siguret V, Lorient M-A. Pharmacogénétique et antivitamine K aujourd'hui : un débat ouvert. *La Rev Médecine Interne .* 2010 May 1;31(5):361–8.
4. Gonçalves A, Moretta J, Eisinger F, Bertucci F. [Personalized medicine and breast cancer: anticipatory medicine, prognostic evaluation and therapeutic targeting]. *Bull Cancer.* 2013;100(12):1295–310.
5. Meadows M. Genomics and personalized medicine. *FDA Consum .*;39(6):12–7.
6. Mathieu T, Bermont L, Boyer J, Evrard A, Cuvelier I, Couderc R. Champs lexicaux de la médecine prédictive et personnalisée. 2016;70(6):651–8.
7. Technology PC of A on S and. Priorities for Personalized Medicine. *OCLC Digit Arch.* 2008;(September):1–63.
8. Hood L, Flores M. A personal view on systems medicine and the emergence of proactive P4 medicine: predictive, preventive, personalized and participatory. *N Biotechnol.* 2012.
9. CASSAGNES L-E. La médecine personnalisée appliquée à l'efficacité et à la sécurité des médicaments. Université de Limoges; 2012.
10. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA.* 1998 Apr 15 ;279(15):1200–5.

11. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*. 2001 May;7(5):201–4.
12. Jørgensen JT. New era of personalized medicine: a 10-year anniversary. *Oncologist*. 2009 May 1;14(5):557–8.
13. Afssaps. Cahier d'acteur /les biomarqueurs, les produits de santé et l'Afssaps . 2011. p. 1–19.
14. FDA. Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling. 2017
15. Marquet P, Longerey P-H, Barlesi F. Recherche translationnelle : médecine personnalisée, médecine de précision, thérapies ciblées : marketing ou science ? Janvier-Février. 2015;70(1):1–10.
16. Katz R. Biomarkers and surrogate markers: an FDA perspective. *NeuroRx*. 2004 Apr;1(2):189–95.
17. EMEA. ICH Topic E15 Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories. 2007.
18. Idbah A. « OMICS » et biomarqueurs dans les tumeurs gliales. *Rev Neurol (Paris)*. 2011 Oct;167(10):691–8.
19. Scheen AJ. Omics et “big data”, avancées majeures vers une médecine personnalisée du futur ? *Rev Med Liege*. 2015;70(5–6):262–8.
20. Stone A, Bornhorst J. An Introduction to Personalized Medicine. In: *Therapeutic Drug Monitoring: Newer drugs and biomarkers*. Arkansas: Elsevier Inc.; 2012. p. 121–42.
21. Fernald GH, Capriotti E, Daneshjou R, Karczewski KJ, Altman RB. Bioinformatics challenges for personalized medicine. *Bioinformatics*. 2011 Jul 1;27(13):1741–8.
22. Beutler E. Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology. *Am J Hematol*. 1993 Jan;42(1):53–8.
23. KALOW W. PHARMACOGENETICS AND ANESTHESIA. *Anesthesiology*.

- 1964;25:377–87.
24. Blum M, Demierre A, Grant DM, Heim M, Meyer UA. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 15;88(12):5237–41.
 25. MOTULSKY AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc*. 1957 Oct 19;165(7):835–7.
 26. Bourel M, Ardaillou R. Pharmacogénétique et pharmacogénomique. Rapport 06-01. Vol. 190, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. Paris; 2006.
 27. Gyamfi Gloria H. Pharmacogenetics in Morocco: experience oh Hassan II University Hospital, Fez. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès; 2016.
 28. Wiwanitkit V. Possible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in the Nucleic Sequence of A-kinase-anchoring Protein 9. *J Proteomics Bioinforma -Open Access* www.omicsonline.com Res Artic JPB J Proteomics Bioinform. 2008;1(14).
 29. Gonzalez KD, Hill KA, Li K, Li W, Scaringe WA, Wang J-C, et al. Somatic microindels: analysis in mouse soma and comparison with the human germline. *Hum Mutat*. 2007 Jan;28(1):69–80.
 30. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, et al. The Diploid Genome Sequence of an Individual Human. Rubin EM, editor. *PLoS Biol*. 2007 Sep 4;5(10):e254.
 31. Rosenfeld JA, Malhotra AK, Lencz T. Novel multi-nucleotide polymorphisms in the human genome characterized by whole genome and exome sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2010 Oct 1;38(18):6102–11.
 32. Bessenyei B, Márka M, Urbán L, Zeher M, Semsei I. Single nucleotide polymorphisms: aging and diseases. *Biogerontology*. 2004 Oct;5(5):291–304.
 33. Letarte N, Pharm B, Sc M, Lavoie A, Sheehan N, Hurlimann T, et al. La pharmacothérapie personnalisée et la pharmacogénétique. 2013;46(4).

34. Rasmussen HB. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophor - Princ Basics*. 2012;315–34.
35. Allorge D, Lorient M. La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments. *Ann Biol Clin*. 2004;62:499–511.
36. Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med*. 1999 [cited 2018 Apr 27];20(1–2):12–24, 25–137.
37. Johnson M, Markham-Abedi C, Susce MT, Murray-Carmichael E, McCollum S, de Leon J. A poor metabolizer for cytochromes P450 2D6 and 2C19: a case report on antidepressant treatment. *CNS Spectr*. 2006 Oct;11(10):757–60.
38. Laine K, Kytölä J, Bertilsson L. Severe adverse effects in a newborn with two defective CYP2D6 alleles after exposure to paroxetine during late pregnancy. *Ther Drug Monit*. 2004 Dec;26(6):685–7.
39. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007 Dec;116(3):496–526.
40. de Leon J, Armstrong SC, Cozza KL. Clinical Guidelines for Psychiatrists for the Use of Pharmacogenetic Testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics*. 2006 Jan;47(1):75–85.
41. Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*. 2002 Mar ;3(2):229–43.
42. Papp-Jámbor C, Jaschinski U, Forst H. [Cytochrome P450 enzymes and their role in drug interactions]. *Anaesthesist*. 2002 Jan;51(1):2–15.
43. de Leon J. The future (or lack of future) of personalized prescription in psychiatry. *Pharmacol Res*. 2009 Feb ;59(2):81–9.

44. Dervieux T, Médard Y, Baudouin V, Maisin A, Zhang D, Broly F, et al. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* . 1999 Dec;48(6):793–800.
45. Gage BF, Eby CS. The genetics of vitamin K antagonists. *Pharmacogenomics J*. 2004 Aug 18;4(4):224–5.
46. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1659–72.
47. Bezeaud A, Guillin M. Physiologie de la coagulation. In: *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Editions S. Elsevier Masson SAS; 2001. p. 7.
48. de Revel T, Doghmi K. Physiologie de l'hémostase. *EMC - Dent* . 2004 Feb ;1(1):71–81.
49. Verdy E. L'hémostase et les tests qui l'explorent. *Progrès en Urol* . 1997;7:320–5.
50. MASRAR A, JEAIDI A, SEDDIK R, BENKIRANE S. La coagulation sanguine: vers une vue nouvelle. *J Biol médicale*. 2012;1:53–7.
51. BENKIRANE S, BENJELLOUN I, NAJIMI H, SOUIEH M, ZERROUR A, MASRAR A. Concept actuel de la coagulation. *Maroc Med*. 2009;31(4):287–93.
52. Lévesque H. L'histoire des traitements anticoagulants. *La Rev Médecine Interne*. 2004 Sep 1 ;25:S315–7.
53. Shapiro SS. Treating Thrombosis in the 21st Century. *N Engl J Med*. 2003 Oct 30 ;349(18):1762–4.
54. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Les anticoagulants en France en 2012 - Etat des lieux et surveillance. 2012.
55. Siguret V. Antivitamines K et pharmacogénétique: vers une meilleure compréhension de la variabilité individuelle de l'effet dose-réponse. *Pathol Biol*. 2007;55(6):295–8.

56. Ztati M, Elkarimi S, Hattaoui M El. LE SURDOSAGE ET ACCIDENTS AUX AVK : ETUDE CAS TEMOIN : A PROPOS DE 400 PATIENTS. *Int J Adv Res*;5(1):2320–5407.
57. Ansell J, Hirsh J, Poller L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E. The Pharmacology and Management of the Vitamin K Antagonists. *Chest*. 2004 Sep ;126(3):204S–233S.
58. Jean-Pierre Cambus, Violaine Simonnet, Bernard Boneu PL. Antivitamines K : utilisation pratique. In: *Encycl Méd Chir*. 2003. 10p.
59. Schved JF, De Moerloose P, Jude B, Toulon P. Utilisation des antivitamines K en pratique médicale courante. *Sang Thromb Vaiss*. 2000;12:26–39.
60. Pirmohamed M. Warfarin: almost 60 years old and still causing problems. *Br J Clin Pharmacol*. 2006 Nov;62(5):509–11.
61. Roussel S, Tennstedt D, Lachapelle JM. Réactions Cutanées Induites Par Les Anticoagulants. *Louv Med*. 2001;(120):192–8.
62. de Maistre E, Lecompte T. Effets indésirables des traitements anticoagulants en dehors des hémorragies. *Ann Cardiol d'Angiologie*. 2002;51:1–5.
63. Chan YC, Valenti D, Mansfield AO, Stansby G. Warfarin induced skin necrosis. *Br J Surg* . 2000 Mar ;87(3):266–72.
64. Bentolila S, Radenne S, Horellou MH, Conard J SMC hémorragique. Complications hémorragiques des traitements antivitamine K. *J Mal Vasc*. 1995;20:95–101.
65. Houdelette P, Dumotier J, Hervé P ME. Hématomes périrénaux sous anticoagulants sur rein pathologique. *J Urol (Paris)*. 1990;96:37–9.
66. Haddour L. Accidents hémorragiques sous anti-vitamines K. Université de Rabat; 1994.
67. Sbihi S. L'Hémocholécyste : un accident rare des Antivitamines K. Thèse de Doctorat en Médecine. Université de Rabat; 2004.

68. Poller L. International Normalized Ratios (INR): the first 20 years. *J Thromb Haemost* . 2004 Jun 1 ;2(6):849–60.
69. AGENCE NATIONALE DE SECURITE DU MEDICAMENT ET DES PRODUITS DE SANTE. Bon usage des médicaments antivitamine K: Etat des lieux et surveillance. 2012.
70. AFSSAPS. Schéma commun ANTIVITAMINES K (AVK). 2011.
71. Penning-van Beest FJ, van Meegen E, Rosendaal FR, Stricker BH. Characteristics of anticoagulant therapy and comorbidity related to overanticoagulation. *Thromb Haemost*. 2001 Aug;86(2):569–74.
72. Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost* . 2003 Dec 3 ;91(1):87–94.
73. Franco V, Polanczyk CA, Clausell N, Rohde LE. Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols. *Am J Med*. 2004 May 15;116(10):651–6.
74. ROMBOUTS EK, ROSENDAAL FR, VAN DER MEER FJM. The effect of vitamin K supplementation on anticoagulant treatment. *J Thromb Haemost*. 2006 Mar 1;4(3):691–2.
75. JANICE E, MARRIS. Interaction of Dietary Factors with Oral Anticoagulants. *J Am Diet Assoc*. 1995;95:580–4.
76. Schurgers LJ, Shearer MJ, Hamulyák K, Stöcklin E, Vermeer C. Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose-response relationships in healthy subjects. *Blood*. 2004 Nov 1 ;104(9):2682–9.
77. BOOTH N, NIKOLIC D, VANBREEMEN R, GELLER S, BANUVAR S, SHULMAN L, et al. Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Dec 1 ;76(6):511–6.

78. Mboup MC, Dia K, Ba DM, Fall PD. Résistance à l'acénocoumarol révélant une mutation faux sens Val66Met de la vitamine K époxyde réductase VKORC1 : à propos d'une observation. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2015 Feb;64(1):59–61.
79. C. Verstuyft. Pharmacogénétique des antivitamines K. *La Lett du Pharmacol*. 2013;27(3).
80. Smires FZ, Habbal R, Moreau C, Assaidi A, Lorient MA, Nadifi S. Effect of different genetics variants: CYP2C9*2, CYP2C9*3 of cytochrome P-450 CYP2C9 and 1639G>A of the VKORC1 gene; On acenocoumarol requirement in Moroccan patients. *Pathol Biol* . 2013;61(3):88–92.
81. Morin S, Bodin L, Lorient M-A, Thijssen HHW, Robert A, Strabach S, et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 May;75(5):403–14.
82. Verstuyft C, Delavenne X, Rousseau A, Robert A, Tod M, Diquet B, et al. A Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Model for Predicting the Impact of CYP2C9 and VKORC1 Polymorphisms on Fluindione and Acenocoumarol During Induction Therapy. *Clin Pharmacokinet* . 2012 Jan 1;51(1):41–53.
83. Schalekamp T, van Geest-Daalderop JHH, de Vries-Goldschmeding H, Conemans J, Bernsen Mj M j, de Boer A. Acenocoumarol stabilization is delayed in CYP2C93 carriers. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 May;75(5):394–402.
84. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):645–9.
85. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of *VKORC1* Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose. *N Engl J Med*. 2005 Jun 2;352(22):2285–93.
86. Bodin L, Verstuyft C, Tregouet D-A, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, et al.

- Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood*. 2005 Mar 15;106(1):135–40.
87. Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghorri MJR, Bumpstead S, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4):784–92.
88. Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, et al. Genetic Determinants of Response to Warfarin during Initial Anticoagulation. *N Engl J Med*. 2008 Mar 6;358(10):999–1008.
89. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost*. 2000 Nov ;84(5):775–8.
90. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA*. 2002 Apr 3 [cited 2018 May 1];287(13):1690–8.
91. Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM, Moia M, Mannucci PM. CYP2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Mar;75(3):198–203.
92. Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. *Genet Med*. 2005 Feb;7(2):97–104.
93. Pérez-Andreu V, Roldán V, Antón AI, García-Barberá N, Corral J, Vicente V, et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood*. 2009 May 14 ;113(20):4977–9.
94. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4106–12.

95. Lacut K, Ayme-Dietrich E, Gourhant L, Poulhazan E, Andro M, Becquemont L, et al. Impact of genetic factors (VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 and EPHX1) on the anticoagulation response to fluindione. *Br J Clin Pharmacol* . 2012 Mar ;73(3):428–36.
96. Qiagen. Blood Mini Handbook QIAGEN Sample and Assay Technologies . 2016. p. 16, 26–8.
<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>
97. Somma M. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. 2015.
98. Biochrom US. NanoVue Plus TM Product User Manual . USA; http://biochromspectros.com/media/wysiwyg/support_page/support-nanovue-plus/NanoVue-Plus-UM.pdf
99. Mittal B, Chaturvedi P, Tulsyan S. Restriction Fragment Length Polymorphism. In: Brenner's Encyclopedia of Genetics. Elsevier; 2013. p. 190–3.
100. Maestrogen. MaestroSafe Nucleic Acid loading dye. <http://www.maestrogen.com/en/product-226605/MaestroSafe-Nucleic-Acid-loading-dye-MR-031201.html>
101. Maestrogen. Maestrogen Slider Imager. p. 301.<http://www.maestrogen.com/en/product-226465/Slider-LED-Imager-SML-01.html>
102. Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human f-globin structural gene : Relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(11):5631–5.
103. Steinhelper M, Field LJ. Assignment of the angiogenin gene to mouse chromosome 14 using a rapid PCR-RFLP mapping technique. *Genomics*. 1992;12:177–9.
104. Morvan V Le, , J.-L. Formento, G. Milano, J. Bonnet JR. Techniques de recherche des polymorphismes génétiques. *Oncologie*. 2005;7:7–16.
105. Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyre P, Uhle M. Single-Nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing. *Anal Biochem* 280,. 2000;280:103–10.

106. Gruber JD, Colligan PB, Wolford JK. Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in DNA pools by using Pyrosequencing. *Hum Genet* . 2002;110:395–401.
107. Hsu T, Kwok P. Homogeneous primer extension assay with fluorescence polarization detection. *Methods Mol Biol*. 2003;212:177–87.
108. Harlé A, Lion M, Husson M, Dubois C. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : application à l' extraction et au dosage quantitatif de l' ADN par méthode spectrophotométrique. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2018;71(5):608–14.
109. Silva CJ, Vázquez-fernández E, Onisko B, Requena JR. Proteinase K and the structure of PrP Sc : The good , the bad and the ugly. *virus Res* . 2015;207:120–6.
110. Qamar W, Rashid M, Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(7):1465–9.
111. T. Bienvenu, C.Meunier, S. Bousquet, S. Chiron, L.Richard, A.Gautheret-Dejean, J.-F. Rouselle DF. Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Ann Biol Clin (Paris)* . 1999 Jan 26 ;57(1):77–84.
112. Hamilton O. S, Daniel N. A Suggested Nomenclature for Bacterial Host Modikation and Restriction Systems and their Enzymes. *J Mol Biol* . 1973;81(3):419–23.
113. Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, et al. A nomenclature for restriction enzymes , DNA methyltransferases , homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(7):1805–12.
114. Pingoud A, Wilson GG, Wende W. Type II restriction endonucleases — a historical perspective and more. *Nucleic Acids Res* . 2014;42(12):7489–527.
115. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [Internet]. 4th ed. Cold spring harbor laboratory Press; 2012. 81-156 p.
116. Lee SV, Bahaman AR. Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA

- Fragments Analysis. In: Magdeldin S, editor. Gel Electrophoresis - Principles and Basics [Internet]. InTech; 2012. p. 41–56.
117. Carrera P, Azorin F. Structural characterization of intrinsically curved AT-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(18).
118. Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels , polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis.* 2009;30:188–95.
119. Brody JR, Kern SE. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal Biochem* 280,. 2004;333:1–13.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- 🕯 D'honorer ceux qui m'ont instruite 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 publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- 🕯 D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- 🕯 De ne 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 méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

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 دوماً وفيّاً لتعاليمهم.
 - ◀ أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبداً في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
 - ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
 - ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

والله على ما أقول شهيد



المملكة المغربية
جامعة محمد الخامس الرباط
كلية الطب والصيدلة الرباط



أطروحة رقم: 24

سنة: 2019

تنفيذ سير العمل لدراسة pharmacogenetic الخاصة بمضادات الفيتامين ك أطروحة:

قدمت و نوقشت علانية يوم :
من طرف

السيدة : ناهم تشوكلي كريستيانا فيليبيا لينانبيو

المزداة في 03 ماي 1992 بلومي

لنيل شهادة دكتور في الصيدلة

الكلمات الأساسية: .: pharmacogenetics، PCR-RFLP، مضاد الفيتامين ك ، SNP ، التحسين.

أعضاء لجنة التحكيم

رئيسة

السيدة نزهة مسعودي

أستاذة في علم الدم البيولوجي

مشرف

السيد عز الدين إبراهيمي

أستاذ في البيوتكنولوجيا الدوائية

السيدة نعيمة الحافظي

أستاذة في طب الأطفال

أعضاء

السيد زهير لكحل

أستاذ في طب القلب

السيد ياسر بوسليمان

أستاذ في علم السموم