

REMERCIEMENTS

A dieu

Je remercie le bon dieu tout puissant qui m'a donné la force et la volonté d'achever ce travail et je lui rends grâce, et au terme de ce dernier, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance et mes vifs remerciements à ma famille et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation.

Principalement

Pr OULDIM Karim pour la formation que j'ai eu l'honneur de suivre sous sa responsabilité durant ces quatre années de résidanat.

Pr BOUGUENOUCHE Laila, je la remercie de m'avoir encouragé et m'avoir accordé toute sa confiance, sa disponibilité, son aide et ses conseils tout au long de ma formation.

Je remercie toute l'équipe de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique pour sa gentillesse, sa collaboration, son dynamisme, sa simplicité et sa bonne humeur qui m'ont beaucoup aidé à surmonter les difficultés

SOMMAIRE :

Introduction :	10
Matériel	et
Méthodes.....	102
I. Recrutement :	12
II. Enquête clinico-biologique :	12
III. Prélèvements.....	12
IV. Techniques de préparation et de purification des acides nucléiques.....	13
1. Extraction aux sels (salting-Out) :	13
a. Principe.....	13
b. Solutions utilisées.....	13
c. Protocole expérimental :	14
2. Extraction au kit.....	15
a. Extraction de l'ADN par Kit QIAGEN (Kit QIAmp DSP DNA Blood Mini) ..	15
V. Dosage et contrôle qualitatif de l'ADN génomique.....	16
VI. Amplification par technique de réaction de polymérisation par chaîne (PCR).....	17
1. Principe.....	17
a. Mélange réactionnel.....	18
b. Cycles de température.....	20
2. Définition de la séquence du Gène ciblé (<i>AGXT</i>).....	23
a. Gène étudié : Gène <i>AGXT</i>	23
VII. Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	26
1. Principe.....	26
2. Réactifs nécessaires.....	27
3. Préparation du gel d'agarose et contrôle de PCR.....	27
4. Témoins de la réaction PCR.....	28
VIII. Séquençage d'ADN.....	28

1.	Principe de la méthode de Sanger :.....	28
2.	Purification du produit PCR.....	29
3.	Réaction de séquence	30
4.	Purification du produit de la réaction de séquence	31
5.	Utilisation du séquenceur ABI 3500Dx: Électrophérogramme	32
IX.	Les outils de bio-informatique :.....	33
	Resultats :	3335
I.	Epidémiologie :.....	35
1.	Sexe :.....	35
2.	Age :.....	35
3.	Consanguinité :	36
II.	Signes Clinique :.....	36
III.	Biologie	37
1.	Dosages biochimiques	37
2.	Étude de la cristallurie.....	37
IV.	Radiologie.....	39
1.	Abdomen sans préparation.....	39
2.	Echographie	39
V.	Génétique moléculaire :.....	40
	Discussion :.....	404
I.	Rappel :	45
1.	Epidémiologie	45
2.	Description clinique	45
3.	Étiologie:.....	47
4.	Méthode(s) diagnostique(s) :	48
a.	Le diagnostic moléculaire :	49
b.	Biopsie hépatique :	49

5.	Diagnostic(s) différentiel(s)	49
6.	Diagnostic prénatal et préimplantatoire :	50
a.	Diagnostic moléculaire :	50
b.	Tests biochimiques :	50
7.	Conseil génétique	50
a.	Les parents d'un proposant :	50
b.	La fratrie d'un proposant :	50
c.	Progéniture d'un proposant :	50
8.	Prise en charge et traitement	50
a.	Réduction de la sursaturation en oxalate de calcium urinaire :	51
b.	Traitement des calculs rénaux :	51
c.	Réduction de la biosynthèse de l'oxalate :	51
d.	Hémodialyse :	51
e.	Transplantation hépatorénale :	51
II.	Discussions des résultats :	52
1.	Epidémiologie	52
a.	Fréquence	52
b.	Age	52
c.	Sexe :	53
d.	Consanguinité	53
2.	Données Cliniques et paracliniques :	54
a.	Symptomatologie clinique et Circonstances de découverte	54
b.	Données paracliniques :	54
3.	Biologie moléculaire :	55
a.	La mutation maghrébine Ile244Thr :	55
b.	Les autres mutations :	56
	Conclusion :	60

Liste des abréviations :

AD	Autosomique dominant
ADN	Acide désoxyribonucléique
AR	Autosomique récessif
BDT	Technologie BigDye Terminator
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ddNTP	Didésoxynucléotides interrupteurs de chaîne
dNTP	Désoxynucléotide
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EX	Exon
Exo	Exonucléase
HOGA1	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1
HOP1	Hyperoxalurie Primitive Type 1
HOP2	Hyperoxalurie Primitive Type 2
HOP3	Hyperoxalurie Primitive Type 3
Mgcl2	Chlorure de magnésium
NaCl	Chlorure de Sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
SAP	Phosphatase alcaline de crevette
Sec	Seconde
SLB	Solution de Lyse des globules Blancs
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
TE	Tris EDTA buffer
tRNA	Acide ribonucléique de transfert
UV	Ultraviolet
UMGO	Unité de génétique médicale et d'oncogénétique

Liste des figures :

FIGURE 1: NANOVIEW PLUS®.....	17
FIGURE 2: LES DIFFÉRENTS CYCLES DE LA PCR.....	18
FIGURE 3: MÉLANGE RÉACTIONNEL DE LA PCR.	19
FIGURE 4: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA PCR.....	22
FIGURE 5: SCHÉMAS REPRÉSENTATIF DE LA STRUCTURE DU GÈNE AGXT.	23
FIGURE 6: PROFLEX™ APPLIED BIOSYSTEMS®.	26
FIGURE 7: ÉLECTROPHORÈSE DE L'ADN.	27
FIGURE 8: PROFIL D'ÉLECTROPHORÈSE DES PRODUITS D'AMPLIFICATIONS PAR PCR (SUR GEL DE 1%).....	28
FIGURE 9: PRINCIPE DE SÉQUENÇAGE AUTOMATISÉ D'ADN PAR LA MÉTHODE DE SANGER.	29
FIGURE 10: MÉCANISME DE LA FLUORESCENCE PAR LA TECHNIQUE DU TRANSFERT D'ÉNERGIE PAR RÉSONANCE.....	30
FIGURE 11: ANALYSEUR GÉNÉTIQUE 3500DX.	32
FIGURE 12: DISTRIBUTION SELON LE SEXE.....	35
FIGURE 13: DISTRIBUTION SELON L'ÂGE.....	35
FIGURE 14: DISTRIBUTION SELON LA CONSANGUINITÉ.	36
FIGURE 15: DISTRIBUTION SELON LES SIGNES CLINIQUES.....	36
FIGURE 16: DISTRIBUTION SELON LA FONCTION RÉNALE.....	37
FIGURE 17: DISTRIBUTION SELON LA CRISTALLURIE.....	38
FIGURE 18: DIFFÉRENTS TYPE DE CRISTAUX VUE EN MICROSCOPE.	38
FIGURE 19: IMAGES D'ASP MONTANT LES DIFFÉRENTES IMAGES DE CALCULES RETROUVER CHEZ NOUS PATIENTS.	39
FIGURE 20: ÉLECTROPHÉROGRAMME DE LA MUTATION C.731T>C (P.LLE244THR) À L'ÉTAT HOMOZYGOTE DÉTECTÉE PAR SÉQUENÇAGE DE L'EXON 7 DU GÈNE AGXT.....	40
FIGURE 21: ALGORITHME DE DIAGNOSTIC D'HYPEROXALURIE PRIMITIVE. ³	48
FIGURE 22: CARTE DU MONDE MONTRANT LES EMPLACEMENTS GÉOGRAPHIQUES DES MUTATIONS D'HYPEROXALURIE PRIMITIVE TYPE 1.	56
FIGURE 23: L'ANALYSE PAR LE LOGICIEL CLINVAR.....	57
FIGURE 24: L'ANALYSE PAR LE LOGICIEL MUTATION T@STER.....	57
FIGURE 25: L'ANALYSE PAR LE LOGICIEL POLYPHEN-2.....	58

Liste des tableaux :

TABLEAU 1: SÉQUENCES DES AMORCES DES EXONS 1, 2, 7, 9 ET 10 DU GÈNE AGXT.....	24
TABLEAU 2: QUANTITÉS DE PRODUITS UTILISÉES PAR RÉACTION PCR POUR CHAQUE GÈNE AMPLIFIÉ.	25
TABLEAU 3: PROGRAMME DE CYCLE DE TEMPÉRATURE AU NIVEAU DU THERMOCYCLEUR POUR LES EXONS 1, 2, 7 ET 9-10 DU GÈNE AGXT.....	25
TABLEAU 4: VOLUMES DES RÉACTIFS DU MIX DE LA RÉACTION DE SÉQUENCE.....	31
TABLEAU 5: PROGRAMME DE LA RÉACTION DE SÉQUENCE.	31
TABLEAU 6: RÉSULTATS DE L'ANALYSE MOLÉCULAIRE DES EXON 1, 2, 7, 9 ET 10 DU GÈNE AGXT CHEZ LES PATIENTS MAROCAINS ATTEINTS D'HYPEROXALURIE PRIMITIVE TYPE 1.....	41
TABLEAU 7: RÉSULTATS DE L'ANALYSE MOLÉCULAIRE DES EXON 1, 2, 7, 9 ET 10 DU GÈNE AGXT DES PATIENTS DE NOTRE SÉRIE.....	43
TABLEAU 8: DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE UTILISER DANS L'HYPEROXALURIE PRIMITIVE TYPE 1.....	49
TABLEAU 9: AGE D'APPARITION DES PREMIERS SYMPTÔMES.	52
TABLEAU 10: DISTRIBUTION SELON LE SEXE.	53
TABLEAU 11: FRÉQUENCE DE LA CONSANGUINITÉ CHEZ LES PATIENTS ATTEINT D'HYPEROXALURIE PRIMITIVE TYPE 1.	53
TABLEAU 12: FRÉQUENCE DE LA CRISTALLURIE CHEZ LES PATIENTS ATTEINT D'HYPEROXALURIE PRIMITIVE TYPE 1.	55

Introduction :

I. Introduction :

Des progrès considérables ont été accomplis ces trois dernières décennies dans la compréhension, le diagnostic et la prévention des maladies génétiques, y compris celles d'origine rénale. Ces progrès ont permis d'identifier les gènes en cause dans la majorité des néphropathies. Ces maladies, représentent un motif de consultation de plus en plus fréquent en néphrologie infantile et adulte au Maroc. Elles sont responsables d'insuffisance rénale chronique arrivant au stade terminal chez 25% des enfants et environ 10% des adultes en Europe[1]. Il n'existe pas de données précises à ce sujet au Maroc.

Parmi les maladies rénales les plus fréquentes au Maroc, la formation de calculs rénaux (lithiases rénales) représente un problème majeur de santé publique et dont les causes génétiques représentent un facteur important de prédisposition[2].

Les maladies héréditaires responsables de lithiases rénales sont rares et correspondent en général à des désordres innés du métabolisme. Elles méritent d'être connues et identifiées en raison de leur spécificité de prise en charge thérapeutique et génétique.

Les principales affections en cause sont l'hypercalciurie idiopathique, l'acidose tubulaire distale, la cystinurie et les hyperoxaluries. D'autres affections sont plus rares telles que les lithiases puriques[3].

L'hyperoxalurie primaire de type 1 est une affection métabolique rare et grave, dont la connaissance du mécanisme et de l'approche thérapeutique est récente. Une maladie dont la transmission est autosomique récessif, est liée à un déficit enzymatique hépato-péroxisomale en alanine-glyoxylate aminotransférase (AGT)[4]. Au Maroc, pays à fort taux de consanguinité, la prévalence de l'Hyperoxalurie Primitive type 1 a été estimée entre 1/7267 et 1/6264[5].

L'objectif de notre travail a été d'établir des moyens moléculaires simples pour le diagnostic précoce de l'Hyperoxalurie Primitive type 1.

Matériel et Méthodes :

I. Recrutement :

Nous avons recensé 27 sujets durant la période entre janvier 2017 et janvier 2019 qui ont été recrutés au niveau des services de néphrologie et de pédiatrie du centre universitaire hospitalier Hassan II de Fès, et dont le diagnostic de la néphropathie a été bien établi. L'étude consiste à analyser du gène *AGXT* en cause de l'hyperoxalurie primitive type 1.

Critères d'inclusion des sujets :

- ✓ Arguments cliniques : Association lithiase/néphrocalcinose + Insuffisance rénale progressive.
- ✓ Arguments radiologiques : lithiases radio-opaques.
- ✓ Analyse spectrophotométrique du calcul.
- ✓ Cristallerie: augmentation des Oxalates en calculant le rapport oxalate /créatinine.

II. Enquête clinico-biologique :

Tous les patients ont bénéficié de :

- Un recueil des informations cliniques et une enquête familiale à la recherche de cas index.
- Un bilan de lithiase pratiqué au service de Biochimie du centre universitaire hospitalier Hassan II de Fès sur le sang et les urines du réveil fraîchement examinées.
 - ✓ Dans le sang, nous avons déterminé, sur automate ARCHITECT C8000, les paramètres suivants : sodium, potassium, chlore, réserve alcaline, calcium, phosphore, magnésium, acide urique, créatinine et protides totaux.
 - ✓ Dans les urines, à l'exception des protides et de la réserve alcaline, les mêmes paramètres ont été dosés en plus de l'oxalate (méthode enzymatique colorimétrique).
- Une analyse de la cristallurie ont été systématiquement effectuées.
- Trois patients ont émis des calculs qui ont été analysés morphologiquement à la loupe binoculaire.

III. Prélèvements

Les prélèvements sanguins pour étudier l'ADN des patients atteints d'hyperoxalurie primitive type 1, ont été réalisés au sein de l'unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès.

En général, on prélève un échantillon de sang périphérique de 5 ml par ponction veineuse sur deux tubes contenant de l'acide éthylène diamine tétra- acétique (EDTA) dissodique (solution à 5%) comme anticoagulant qui présente l'avantage d'être également un inhibiteur des nucléases. Les échantillons sont conservés à -20°C. Ils peuvent également être conservés

sous forme de culot de globules blancs (après lyse des globules rouges), et la décongélation se fait juste avant l'extraction d'ADN.

Le prélèvement des patients est fait juste après la consultation de génétique et l'obtention du consentement éclairé et signé.

IV. Techniques de préparation et de purification des acides nucléiques

L'étude génétique effectuée aux patients se fait sur les échantillons d'acide nucléique (ADN). Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN, les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies ou autre. Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre de copies et à la méthode de biologie moléculaire utilisée (PCR).

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction d'ADN génomique à partir du sang, celle employée dans notre étude est la technique au NaCl (Méthode décrite par Kunkel et al).

L'extraction de l'ADN est élaborée par deux manières distinctes:

1. Extraction aux sels (salting-Out) :

a. Principe

L'ADN utilisé, comme matrice d'amplification pour les réactions PCR, a été extrait par la technique classique de salting-Out. Le sang doit être initialement et vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Le lysat est centrifugé et, après élimination du surnageant, le culot cellulaire, contenant les leucocytes, est traité par une solution de lyse des Globules blancs (SLB) associée à la protéinase K, enzyme qui digère les protéines cellulaires. Ces dernières seront par la suite éliminées par l'intermédiaire d'une force ionique du NaCl (5 M). En fin, la précipitation de l'ADN génomique est effectuée en utilisant une solution d'éthanol absolu à froid (-20 °C).

b. Solutions utilisées

Lyse des hématies TE 20/5 : 1L

20 ml Tris-HCl	pH 7,6	1 M
10 ml EDTA disodique	pH 8	0,5 M
H2O distillée		

Lyse des globules blancs

10 ml Tris-HCl	pH 7,6	1 M
20 ml EDTA di-sodique	pH 8	0,5 M
20 ml SDS 10%		

10 ml NaCl 5 M

SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 10%

Protéinase K

Dénaturation et précipitation des protéines

NaCl 5 M

Précipitation de l'ADN et lavage

Ethanol 100%

Ethanol 75%

Eau stérile

Solution de conservation de la méduse d'ADN (200 ml) TE 10/1 :

2 ml Tris-HCl pH 7,6 1 M

400 µl EDTA disodique pH 8 0,5 M

c. Protocole expérimental :

Pour 10 ml de sang complet

Si sang congelé, décongeler toute la nuit à 4°C ou le placer quelques min dans l'étuve à 37°C

Diluer le sang en 1/3 dans du TE 20/5 (20 ml)

Laisser 20 min dans la glace

Centrifuger 5 min à 2500 tr/min

Pomper le surnageant

Refaire les étapes 2, 3, 4,5 (refaire la lyse des globules rouges) peut être 3 ou 4 jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre.

Reprendre le culot dans 3 ml de tampon de lyse des blancs et vortexer (peut être conservé à 4°C)

Le tampon de lyse des globules blancs, on le met sous agitation à 42°C (quand on veut l'utiliser), il est d'habitude conservé à 4°C

Ajouter la protéinase K (100 µl pour 10 ml de sang, incuber à 42°C durant toute la nuit ou à 65°C 1h sous agitation douce

Ajouter 4 ml H₂O stérile

Ajouter 4 ml NaCl 5 M

Bien mélanger et centrifuger à 3000 tr/min pendant 30 min

Récupérer le surnageant dans un nouveau tube de 50 ml

Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu froid au surnageant

Reprendre la méduse dans un tube eppendorf 1.5 ml

Laver à l'éthanol 70% puis à l'éthanol absolu (facultatif)

Sécher puis dissoudre l'ADN dans 200 à 500 µl de TE 10/1.

2. Extraction au kit

Quel que soit le type de matrice, le principe des techniques d'extraction d'ADN est sensiblement le même et comprend quatre grandes étapes: la lyse des cellules, la dégradation des protéines libérées, la séparation des acides nucléiques des autres composants et la purification de l'ADN.

a. Extraction de l'ADN par Kit QIAGEN (Kit QIAamp DSP DNA Blood Mini)

Cette technique rapide, plus fiable et simple, à interaction minimale avec l'utilisateur, ce qui permet de manipuler les échantillons potentiellement infectieux en toute sécurité. Après recueil du sang total sur EDTA, l'extraction de l'ADN génomique est réalisée sur mini colonnes (Qiagen®: kit QIAamp DNA Blood Mini kit). Le kit Qiagen est un système ayant recours à la technologie des membranes de silice (QIAamp) pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques. Développé pour le traitement simultané de plusieurs échantillons de sang, il permet d'obtenir de l'ADN purifié prêt à l'emploi. Les procédures sont compatibles avec des échantillons de sang total et de sang frais ou congelé traités à l'EDTA ou au citrate. Cette technique s'effectue en deux étapes permettant d'isoler et de purifier rapidement et en toute simplicité l'ADN génomique à partir de 200 µL de sang total (Il n'est pas nécessaire de séparer les leucocytes au préalable).

- *1ère Etape de lyse:*

Les échantillons sont lysés dans des conditions dénaturantes, à température élevée. Le sang est décongelé à +4 °C ou à température ambiante et la lyse cellulaire est effectuée immédiatement après la décongélation.

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml, 200 µL du sang total est soumis à une lyse complète des globules rouges par incubation à 56 °C pendant 10 minutes après addition de 200 µL de tampon de lyse AL et 20 µL de protéinase K (Protéase QIAGEN - QP).

- *2ème Etape de purification:*

On ajoute 200 µL d'éthanol absolu et on centrifuge brièvement. Par la suite on prépare pour chaque échantillon une colonne QIAamp posée sur un tube collecteur, cette étape permet de fixer l'ADN génomique à la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, on y dépose 620 µL de la solution obtenue, on centrifuge à 1771 G pendant 1 min puis on place la colonne sur un nouveau tube collecteur et on jette l'ancien tube et l'éluât.

L'ADN génomique est adsorbé sur la membrane de silice alors que le lysat passe à travers la membrane sous l'effet d'une dépression ou de la force centrifuge. Par la suite, on procède à un lavage de la membrane par les tampons du kit AW1 et AW2.

On dépose 500 μL de tampon AW1 fournis par le kit, on recentrifuge à 1771 G pendant 1 min et on replace la colonne sur un nouveau tube collecteur. On dépose 500 μL du tampon AW2 puis on centrifuge à 2877 G pendant 3 min. À cette étape, l'ADN est lavé.

On place ensuite la colonne QIAmp sur un tube eppendorf de 1,5 ml, on dépose 50 μL de buffer AE et on centrifuge à 1771 G pendant 1 min. A cette étape, l'ADN est élué. On Jette la colonne QIAmp et finalement on conserve le tube eppendorf contenant l'ADN extrait (volume final de 200 μL) à +4 °C si l'échantillon est utilisé dans les jours qui suivent l'extraction ou à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

Les procédures d'extraction par les kits commercialisés, sont conçues pour limiter la contamination croisée d'un échantillon à l'autre. Les extraits d'ADN purifié sont prêts à l'emploi pour l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou d'autres applications, et peuvent être conservés à +4 °C si les échantillons sont utilisés dans les jours qui suivent, ou à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

V. Dosage et contrôle qualitatif de l'ADN génomique

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet. Le maximum de cette absorption se situe à 260 nm longueur d'onde à laquelle absorbent les bases puriques et pyrimidiques. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8 tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A260/A230 devrait être d'environ 2,2.

Au laboratoire, le NANODROP (NanoVue Plus - GE Healthcare Life Sciences) **Figure 1** est utilisé pour réaliser le dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2 μl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté.



Figure 1: NanoVue Plus®

VI. Amplification par technique de réaction de polymérisation par chaîne (PCR)

En 1985, Kary Mullis et une équipe de chercheurs à Cetus corporation ont mis en évidence une technique de biologie moléculaire appelée PCR (Polymerase Chain Reaction). Elle est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase particulière, la Taq polymérase.

Aujourd'hui, c'est une technique incontournable et utilisée en routine dans les laboratoires. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas, en théorie, un facteur limitant. On peut donc amplifier des séquences nucléotidiques détectables à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN.

1. Principe

La séquence cible est multipliée par recopiage successifs à l'aide d'amorces oligonucléotidiques et d'une ADN polymérase thermostable. Chaque recopiage ou cycle de PCR est constitué de 3 étapes constituées de trois plateaux de température différentes: dénaturation (autour de 95°C), hybridation des amorces (entre 50 et 60°C) et polymérisation (autour de 72°C) (**Figure 2**). Chaque cycle de recopiage dure quelques minutes. La séquence cible étant doublée à chaque cycle, le taux d'amplification (théorique) est de 2^n , si bien qu'après une trentaine de cycles de PCR, le nombre de copies de la séquence cible est de plusieurs dizaines de millions de fois supérieur à n'importe qu'elle autre séquence du génome. Cette surreprésentation la rend facilement analysable et manipulable.

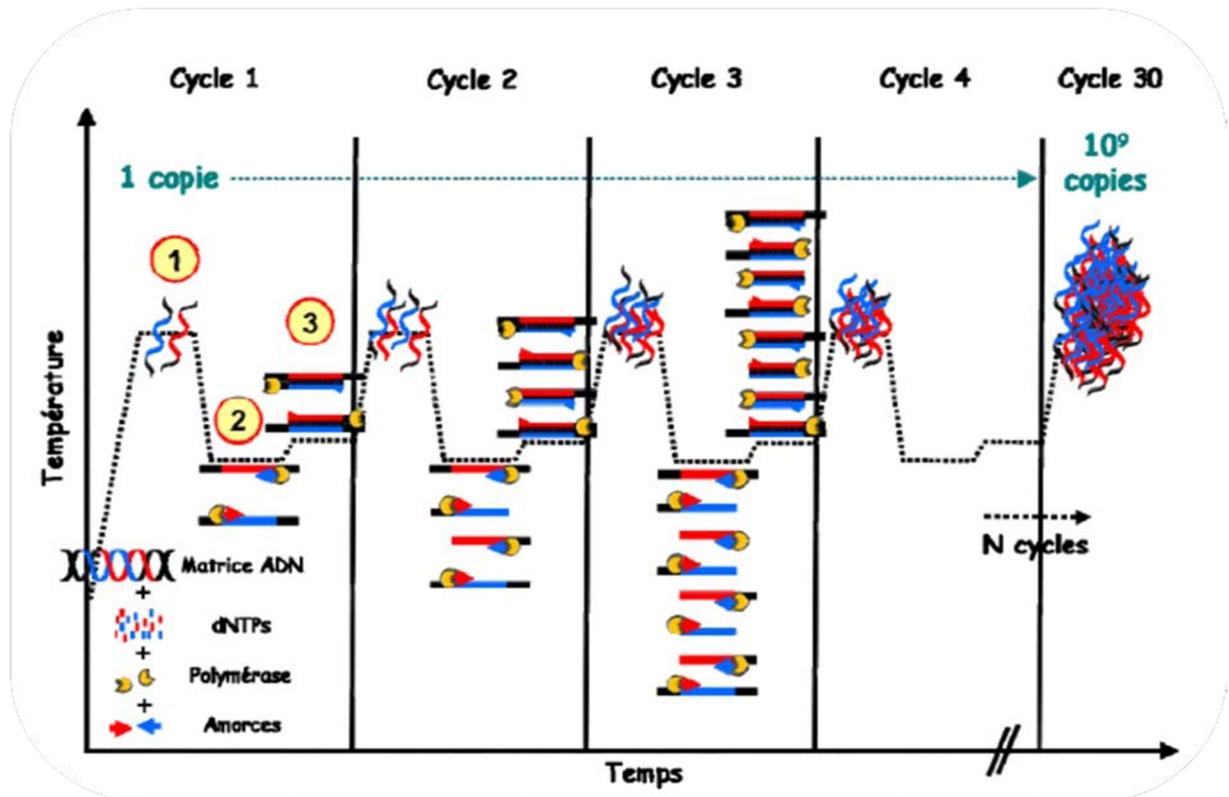


Figure 2: Les différents cycles de la PCR.

a. Mélange réactionnel

La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN, la Taq polymérase, les amorces, Les ions Mg^{2+} et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon (Figure 3).

- *ADN*

Extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, fossile...), à partir de prélèvement veineux dans notre étude. Puis, cet extrait purifié en ADN, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR.

- *Amorces*

Ce sont des fragments courts d'ADN, choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier ils sont synthétisés par voie chimique. Ils vont servir d'amorces à l'ADN polymérase pour une réplification sélective en s'hybridant de façon spécifique, grâce à la complémentarité de bases, sur l'un des deux brins d'ADN, et avec leur extrémité 3' OH libre. Chaque couple d'amorces est composé d'un oligomère complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire du brin antiparallèle.

- *Désoxyribo Nucléotides Triphosphates (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)*

Ce sont les molécules de base qui constituent l'ADN, et sont utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

- *Ions Magnésium (MgCl₂)*

Les ions magnésium vont permettre la neutralisation des charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN. Ces ions interviennent aussi dans la spécificité de la reconnaissance des substrats nucléotidiques triphosphates (dNTP).

Les concentrations relatives MgCl₂/dNTP doivent être prises en compte. Un excès de MgCl₂ entraîne des amplifications non spécifiques, et une diminution de sa concentration diminue de façon importante la quantité des séquences amplifiées.

- *Enzyme Taq polymérase*

L'ADN polymérase permet la réplication. On utilise une ADN polymérase purifiée ou clonée à partir d'une bactérie extrêmophile, *Thermus aquaticus*, qui vit dans les sources chaudes et résiste à des températures supérieures à 100°C. Cette polymérase (Taq polymérase) possède la caractéristique remarquable de résister à des températures de l'ordre de 100°C, lesquelles sont généralement suffisantes pour dénaturer la plupart des protéines. *Thermus aquaticus* trouve sa température de confort à 72°C, température optimum pour l'activité de sa polymérase.

Les tubes contenant ce mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température répétés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur. L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes.

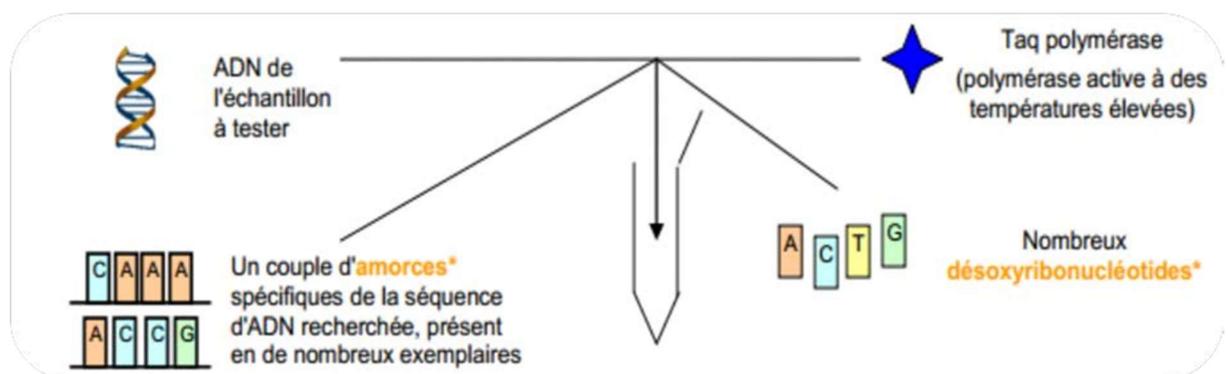


Figure 3: Mélange réactionnel de la PCR.

b. Cycles de température

La PCR consiste à réaliser de nombreux cycles successifs d'amplification au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification de la séquence d'ADN double brin qu'elles encadrent. Cependant, avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement quelques minutes à 95 °C) est réalisée. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes (**Figure 4**):

- *Dénaturation*

Au cours de la dénaturation, le double brin s'ouvre pour donner de l'ADN monocaténaire, et toutes les réactions enzymatiques s'arrêtent. Les deux chaînes complémentaires sont séparées par une augmentation de température. Pour obtenir la dénaturation de l'ADN, on augmente généralement la température à environ 94°C. De cette façon, les fortes liaisons hydrogènes sont rompues et le nombre de bases non appariées augmente. La réaction est complète lorsque tout l'ADN bicaténaire est devenu de l'ADN monocaténaire. Le type de solvant, la concentration de sel et le pH utilisés influencent le processus de dénaturation.

- *Hybridation des amorces*

La durée de l'hybridation est comprise entre 40 et 90 secondes. La température d'hybridation dépend du T_m du couple d'amorces. Cette température de fusion des amorces est généralement comprise entre 50 et 70 °C et elle est en fonction de la composition en désoxyribonucléotides des amorces. Une fois que la température est abaissée, les deux chaînes complémentaires d'ADN monocaténaire se reformeront en une molécule d'ADN bicaténaire. Au cours de cette phase, les amorces se déplacent librement et des liaisons ioniques sont constamment formées et rompues entre l'amorce monocaténaire et la matrice monocaténaire. Les liaisons plus stables durent un peu plus longtemps (amorces qui correspondent exactement à l'ADN matrice) et sur ce petit morceau d'ADN bicaténaire (matrice et amorce), la polymérase peut se fixer et commencer à copier la matrice. Une fois que quelques bases sont incorporées, la liaison ionique est si forte entre la matrice et l'amorce qu'elle ne se rompra pas.

- *Elongation (Extension des amorces)*

Au cours de cette étape, les amorces sont étendues sur la séquence cible en utilisant une ADN polymérase thermostable en présence de dNTP, ce qui aboutit à une duplication du matériel cible de départ. La température de travail idéale pour l'ADN polymérase Taq est de 72 °C.

Lorsque les amorces ont été étendues de quelques bases, elles possèdent une plus forte attraction ionique pour la matrice, ce qui réduit la probabilité de survenue du processus inverse. Les amorces qui ne correspondent pas exactement se détachent de nouveau (en raison de la

température plus élevée) et n'entraînent pas une extension du fragment. Les bases (complémentaires de la matrice) sont couplées à l'amorce du côté 3' (la polymérase ajoute des dNTP de 5' vers 3' en lisant la matrice de 3' vers 5'). La durée des étapes d'extension des amorces peut être augmentée si la région de l'ADN à amplifier est longue; cependant, pour la majorité des réactions PCR, une durée d'extension d'une minute est suffisante pour obtenir une extension complète.

La technique de PCR a été qualifiée de révolutionnaire car elle permet d'obtenir 2ⁿ copies d'une cible d'ADN (n = le nombre de cycles). Après 25 à 30 cycles (variables selon les amorces), le ou les fragments d'ADN dont les extrémités sont définies par les amorces, est amplifié de 200000 à 1000000 fois. La technique est si sensible qu'il est possible d'utiliser comme matrice une quantité d'ADN purifié équivalent au contenu d'un seul noyau cellulaire ou un lysat de 200 à 500 cellules (ce qui évite parfois d'avoir à extraire l'ADN). Le fragment amplifié peut être directement visualisé par électrophorèse. Selon le type de séquence à amplifier, il est important de déterminer avec précision les paramètres suivants:

La température d'hybridation des amorces.

La quantité d'oligonucléotides.

La concentration de MgCl₂ du tampon réactionnel.

Le nombre de cycles.

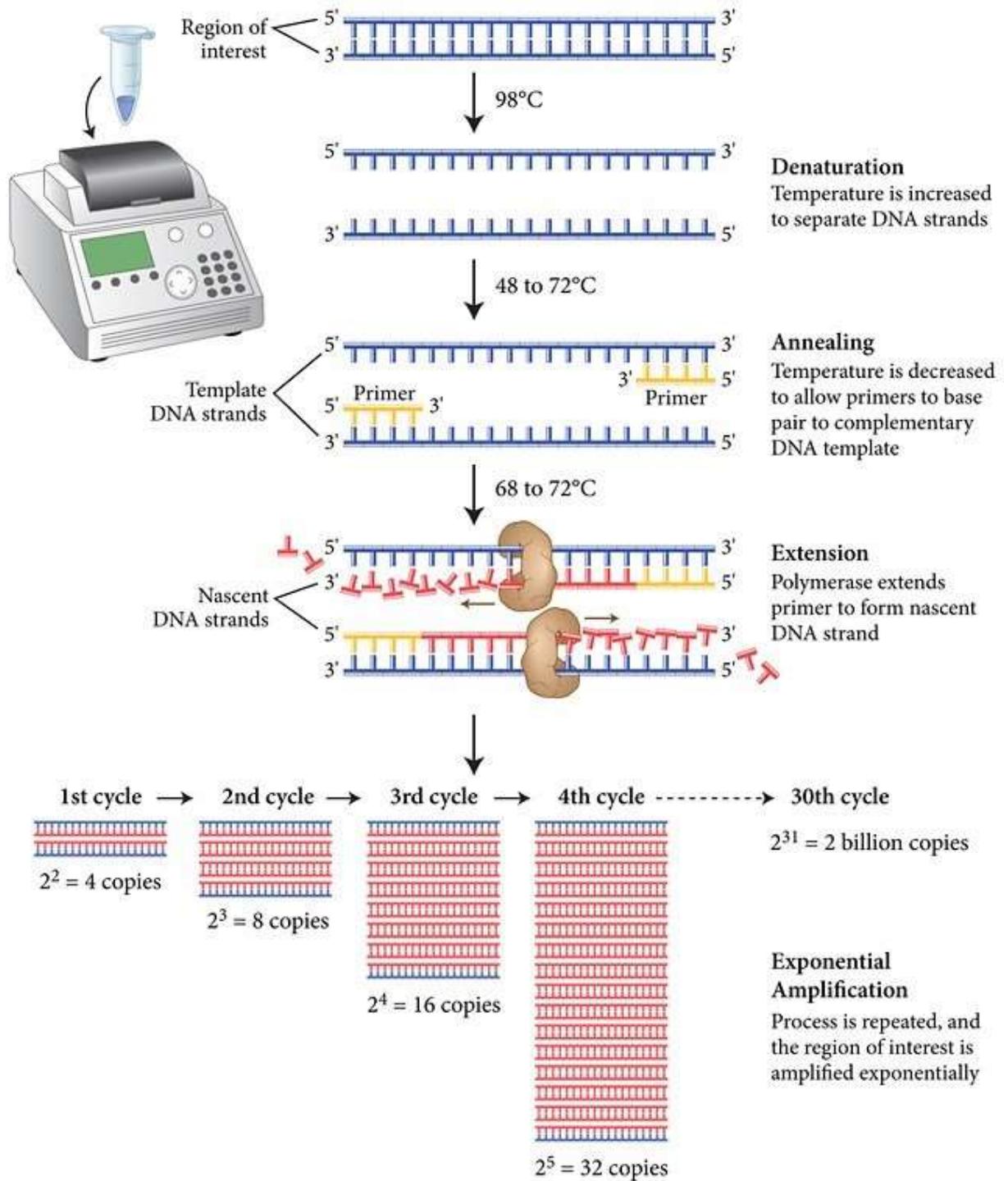


Figure 4: Représentation schématique des différentes étapes de la PCR.

Il s'agit d'une réaction en trois étapes :(i) La dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin par la chaleur. (ii) L'hybridation ou l'hybridation des amorces par diminution de la température sous leur température d'hybridation. (iii) L'élongation des amorces par une ADN polymérase thermostable.

2. Définition de la séquence du Gène ciblé (*AGXT*)

La connaissance de la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier ou ADN cible est nécessaire. Ces séquences serviront à synthétiser des oligonucléotides complémentaires (d'une longueur de 15 à 25 nucléotides en général), utilisées comme amorces par la Taq polymérase, et qui serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. A partir de bases de données disponibles sur internet (NCBI et ENSEMBL), nous avons identifié la séquence du gène *AGXT* (GenBank: NM_000030.2) que nous avons choisi d'amplifier.

a. Gène étudié : Gène *AGXT*

Le gène *AGXT* nommé aussi *AGT*; *PHI*; *SPT*; *AGT1*; *SPAT*; *TLH6*; *AGXT1* est localisé au niveau du chromosome 2(2q37.3) s'étend sur un locus génomique de 10 Kb, sa protéine comporte 392 acides aminés et une masse moléculaire de 43KDa et comprend 11 exons (NM_000030.2) (**Figure 5**).

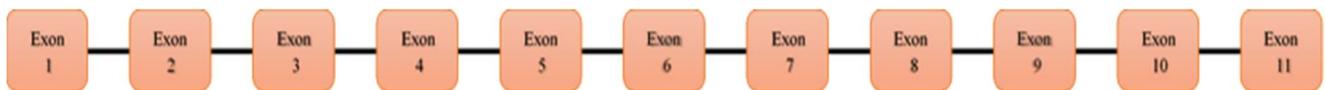


Figure 5: Schémas représentatif de la Structure du gène AGXT.

- *Définition des amorces*

Afin de déterminer la séquence des exons 1, 2, 7, 9 et 10 du gène *AGXT* (**Tableau 1**), il est nécessaire d'amplifier la séquence d'intérêt à l'aide d'amorces judicieusement choisies puis de la séquencer. Plusieurs couples d'amorces ont été choisis à partir de la séquence humaine afin d'amplifier l'ADN de patients. Les amorces nécessaires pour l'amplification ont été sélectionnées en fonction de la région qui nous intéresse. En effet, dans le choix de la séquence de l'amorce on a respecté un certain nombre de critères:

- ✓ Sa longueur est un facteur déterminant de la spécificité de l'amplification d'une séquence donnée.
- ✓ Pas de complémentarité entre les deux amorces, au risque de générer au cours de la réaction des dimères d'amorces susceptibles de diminuer le rendement de la réaction.
- ✓ Une température de fusion T_m voisine pour les deux amorces (soit une composition en A+T et C+G équilibrée) afin de faciliter le choix de la température d'hybridation pendant la réaction [$T_m = 4(C + G) + 2(A + T)$].

- ✓ Il est à noter qu'au-delà du T_m , l'amorce n'arrive pas à s'hybrider avec sa séquence complémentaire. En de deçà, elle pourra s'hybrider de façon non spécifique avec des séquences d'ADN génomique présentant quelques homologues de structure.

Actuellement, l'introduction de logiciels spécialisés et des bases de données nucléotidiques a permis de réaliser des choix plus rationnels.

Par exemple (Primers Express, Primer3, Primer3plus ...).

Et on se basant sur les données bio-informatiques, par Exemple l'outils: UCSC In-SilicoPCR et SNPcheck, on a testé la spécificité de ces oligonucléotides qu'on désire amplifier.

Nom de l'amorce	Forward	Reverse	T_m (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
Exon 1	CCGAGCACAAGCACAGATAA	TGAGACCCAGGCTCCCCGC	63	453
Exon 2	CCTTCCAACCTGCCTCCT	GGGCTGCCAGCTTCAAAC	64	494
Exon 7	CCGTCTCACTCCCGTGAAAC	CACCTCTCAGCCATCCCCAG	66	246
Exon 9-10	CAGGCAAAGTCAAACCTGG	TGCACAGTCCTGCTCAAG	60	827

Tableau 1: Séquences des amorces des exons 1, 2, 7, 9 et 10 du gène AGXT.

-La taille des amplicons est exprimée par le nombre de bases qui constituent chaque amplicon.

-la T_m représente la température d'hybridation.

- *Les conditions réactionnelles*

La réaction de PCR est réalisée avec un mélange réactionnel de 25 μ L de volume total dans un tube de PCR de 200 μ L en présence de: 1 μ L (100 ng/ μ L) d'ADN génomique, 0,25 μ L de chacun des désoxynucléosides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP et dTTP), 0,5 μ L de $MgCl_2$, 1 μ L de chacune des amorces, 2,5 μ L du tampon réactionnel 10X, 0,2 μ L de Taq polymérase et une quantité suffisante d'eau distillée pour un volume total de 25 μ L.

Après avoir homogénéisé ce mélange réactionnel, on place les tubes de PCR dans le thermocycleur (ProFlexTM Applied Biosystems[®]) (Figure 6).

Le mélange est soumis à 3 étapes successives définissant un cycle. Trente cycles sont généralement effectués.

- ✓ Dénaturation de l'ADN double brin par chauffage à 94°C pendant 4 à 5 minutes en moyenne pour le premier cycle et 1 minute en moyenne pour les autres cycles.
- ✓ Hybridation des amorces de l'ADN simple brin pendant 1 minute en moyenne à une température proche du T_m du couple d'amorces.
- ✓ Polymérisation à 72°C généralement pendant 1 minute 30 secondes.

✓ Une étape de polymérisation plus longue, de 7 minutes est réalisée au dernier cycle.

Les conditions d’amplification optimales ont été déterminées. Pour cela, nous avons testé pour chaque couple d'amorces différentes températures comprises entre 4 et 8 °C en dessous du Tm calculée. La condition retenue correspond à celle permettant une amplification maximale sans amplicons aspécifiques (**Tableau 2, Tableau 3**).

Le contrôle des produits PCR permet de confirmer la réussite de l’amplification génique, et de vérifier l’absence de toute amplification non spécifique. Il est réalisé grâce à une électrophorèse sur gel d’agarose à 2 %.

Réactifs :	Volumes :
Eau	17,8 µl
Tampon 10X	2,5 µl
MgCl ₂	0,5 µl
dNTP	1 µl
Amorce F	1 µl
Amorce R	1 µl
Taq polymérase	0,2 µl
ADN (100ng/µl)	1 µl
Volume Total	25 µl

Tableau 2: Quantités de produits utilisées par réaction PCR pour chaque gène amplifié.

Gène	Exons	Etapes	Température	Temps	
AGXT	Exon 1 Exon 2 Exon 7 Exon 9-10	Activation d’ADN polymérase	95 °C	1 min	35 cycles
		Dénaturation	94 °C	30 sec	
		Hybridation	Tm	60 sec	
		Elongation	72 °C	60 sec	
		Poursuivis de cycle	72 °C	9 min	

Tableau 3: Programme de cycle de température au niveau du thermocycleur pour les exons 1, 2, 7 et 9-10 du gène AGXT.



Figure 6: ProFlex™ Applied Biosystems®.

VII. Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

1. Principe

Pour vérifier la taille des fragments obtenus par PCR, les échantillons sont soumis à un champ électrique de 90 Volts dans un gel d'agarose à 1 % dans du tampon TAE 1X (**Figure 7**). Cette technique est basée sur le fait que l'ADN est chargé de façon négative. Les fragments migrent en fonction de leur poids moléculaire vers l'anode. L'ADN est visualisé par le Bromure d'Ethydium incorporé dans la double hélice. Le volume d'échantillon de PCR déposé est de 7 μ L et 3 μ L de bleu de bromophénol 3X. La taille des fragments obtenus sera déterminée en comparant leur mobilité électrophorétique à celle du marqueur de taille. Selon la taille du fragment d'ADN amplifié, nous utilisons des gels d'agarose à 1% ou 1,5%. Les électrophorèses sont réalisées dans du tampon TAE 1X à 100 volts pendant 10 minutes.

Cette technique est assez simple à mettre en œuvre se basant sur 4 étapes:

- ✓ Préparation du gel d'agarose 1 %
- ✓ Dépôt de l'ADN dans les puits du gel
- ✓ Electrophorèse
- ✓ Observation

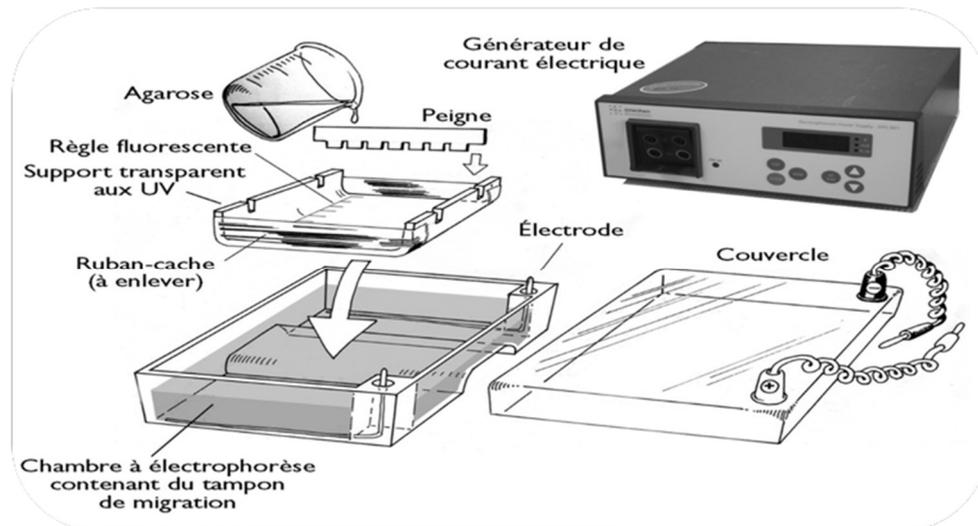


Figure 7: Electrophorèse de l'ADN.

2. Réactifs nécessaires

- ✓ Poudre d'agarose
- ✓ TAE 1X
- ✓ SYBR Safe
- ✓ Solution de charge.

3. Préparation du gel d'agarose et contrôle de PCR

A la suite de notre PCR un gel d'agarose à 1 % sera préparé comme suit:

- ✓ Mélanger tampon TAE 1X et l'agarose à raison de 0.4 g d'agarose pour 40 ml de tampon.
- ✓ Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange. On laisse le quelques secondes et en lui rajoute 4 μ l de SYBR Safe.
- ✓ Préparer la cuve, faire couler lentement le gel et déposer le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.
- ✓ Laisser refroidir et enlever le peigne. Le gel sera ainsi prêt pour le dépôt des échantillons.

Dans ce cadre, on dépose un mélange de 7 μ l du produit PCR et 3 μ l du tampon de charge dans chaque puit. La migration se fait sous un voltage de 90V pendant 10 min (**Figure 8**).

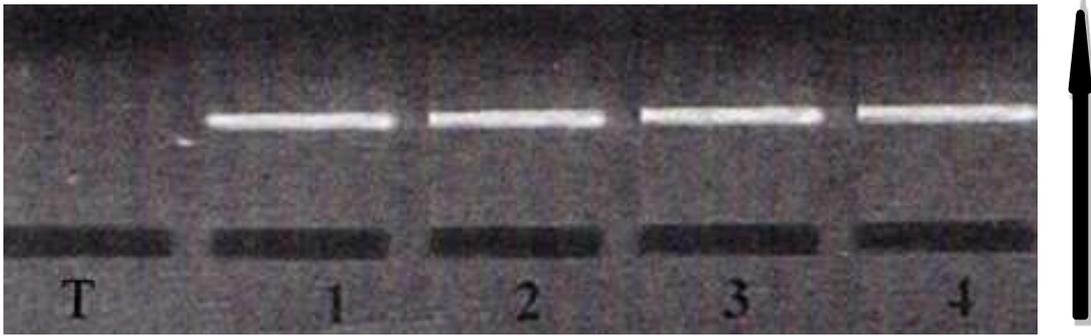


Figure 8: Profil d'électrophorèse des produits d'amplifications par PCR (sur gel de 1%).

4. Témoins de la réaction PCR

Les témoins inclus pour chaque réaction PCR comprennent:

- ✓ Le témoin positif qui a pour fonction de s'assurer des bonnes conditions de la PCR, ce témoin est représenté par l'ADN d'un sujet normal sain.
- ✓ Le témoin négatif qui permet de s'assurer de l'absence de contamination, dans lequel il n'y a pas d'ADN.

VIII. Séquençage d'ADN

Après avoir amplifié le fragment d'ADN concerné, on procède à son séquençage. La technique de séquençage consiste d'abord à purifier le produit PCR, réaliser une réaction de séquence, la purifier et analyser le produit par séquençage direct.

1. Principe de la méthode de Sanger :

Le séquençage par didésoxy de Sanger ou séquençage enzymatique (140) implique une ADN polymérase, ADN dépendant, synthétisant une copie complémentaire du simple-brin d'ADN à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. Le principe de la méthode est illustré dans la **Figure 9**.

Lors de l'élongation linéaire, le désoxynucléotide ajouté est complémentaire du nucléotide du brin d'ADN. La création d'un pont phosphodiester entre le groupement 3'-OH de l'extrémité de l'amorce et le groupement 5'-phosphate du désoxynucléotide incorporé allonge la chaîne. Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Les didésoxyribonucléotides incorporés dans le brin synthétisé empêchent la poursuite de l'élongation. La faible concentration du didésoxynucléotide par rapport au désoxynucléotide

entraîne statistiquement un mélange de fragments d'ADN de tailles différentes se terminant tous par un didésoxynucléotide. Cette terminaison permet d'identifier la position de la base du nucléotide dans la séquence d'ADN. Plusieurs élongations sont réalisées en parallèle avec les quatre didésoxynucléotides différents.

Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou sur séquenceur capillaire. La détection des fragments est réalisée par l'intermédiaire d'un marqueur radioactif ou fluorescent. Le marqueur radioactif (isotopes ^{32}P , ^{33}P ou ^{35}S) est porté par le désoxynucléotide ou le didésoxynucléotide. Le marqueur fluorescent est fixé soit sur l'amorce soit sur les didésoxynucléotides.

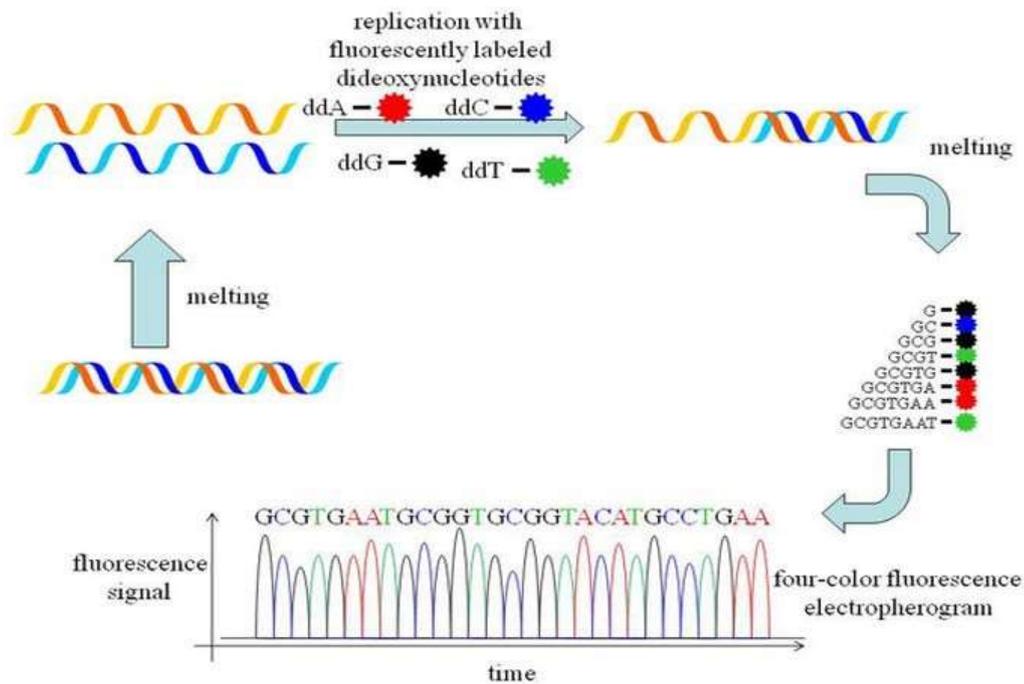


Figure 9: Principe de séquençage automatisé d'ADN par la méthode de Sanger.

2. Purification du produit PCR

La purification des produits de PCR a pour but de séparer la séquence amplifiée désirée des autres acides nucléiques (amorces non utilisées, dimères de primers... etc.) ainsi que des sels et d'autres composants du milieu réactionnel, pour cela il y a plusieurs réactions essentielles soit par l'éthanol, soit par l'enzyme ExoSAP, soit par des kits commercialisés ou encore à partir des bandes d'intérêt par coupure du gel d'agarose.

Dans notre série, nous avons utilisé la technique enzymatique : ExoSAP-IT®

- *Purification par enzyme (ExoSAP®)*

ExoSAP-IT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I (Exo) qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres, et en excès sans interférence avec les applications en aval. Cette méthode est conçue pour exiger un minimum de temps de manipulation. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100 pb sont ainsi dégradés.

On utilise 2 µl de l'enzyme ExoSAP avec 6 µl du produit PCR.

Le mélange est ensuite placé dans le thermocycleur en appliquant le programme suivant:

- ✓ 37°C pendant 15 min
- ✓ 80°C pendant 15 min.

3. Réaction de séquence

Nous utilisons la technologie BigDye Terminator (Applied Biosystems: ABI). La technologie BigDye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520 nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (**Figure 10**).

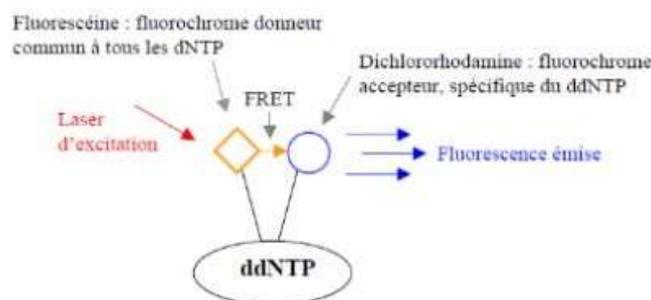


Figure 10: Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

- *Réactifs nécessaires*
 - ✓ Kit de la réaction de séquence ABI®BigDye® Terminator V1.1 cycle sequencing
 - ✓ Tampon
 - ✓ Produit PCR purifié
 - ✓ Amorces spécifiques
 - ✓ Eau stérile

- *Protocole expérimental*

Le mix préparé est illustré dans le **Tableau 4**.

Tube de réaction	BigDye (μl)	Tampon (μl)	Amorces 10mM (μl)	Pr. PCR purifié (μl)	Eau stérile (μl)	Volume finale (μl)
Tube F (contenant les amorces F)	1	3	1	4	1	10

Tableau 4: Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence.

Le tube est incubé dans le Thermocycleur selon le programme suivant (**Tableau 5**):

Stade	Température	Temps	cycles
1	96°C	10 Sec	25
2	50°C	5 Sec	
3	60°C	3 min	

Tableau 5: Programme de la réaction de séquence.

Le produit de séquence peut être analysé tout de suite ou conservé à +4°C ou à -20°C dans l'obscurité.

4. Purification du produit de la réaction de séquence

Le Produit de la réaction de séquence doit être purifié afin d'éliminer les amorces libres, les dNTP, les ddNTP non incorporés, les sels ainsi que toutes les impuretés, qui peuvent altérer la lecture de la séquence. Cette purification est réalisée par BigDye® Xterminator™.

- *Réactifs nécessaires*
 - ✓ Kit "BigDye® XTerminator™ purification Kit" contenant:
 - SAM™ Solution (tampon)
 - BigDye® XTerminator™ Solution (résines)
- *Protocole expérimental*

Dans les puits de la plaque, des volumes de 45 µl du produit SAM™ Solution, 10 µl du produit BigDye® XTerminator™ Solution préalablement vortexé pour suspendre les résines et 10 µl du produit de la réaction de séquençage sont déposés. Ensuite la plaque est mise sous agitation légère pendant 30 min, puis on centrifuge à 13000tr/mn pendant 3 minutes. Finalement, le surnageant contenant les fragments à séquencer est transféré dans les puits de la plaque du séquenceur (microplaque Thermo Fast 96 puits).

5. Utilisation du séquenceur ABI 3500Dx pour la lecture de séquence:

Électrophérogramme

Après avoir placé la microplaque Thermo Fast 96 puits dans le séquenceur (ABI 3500Dx, Applied Biosystems) (**Figure 11**), on saisit à l'aide du logiciel 3500Dx Data Collection le nom et le prénom du Donneur, la température de migration (50°C) et le temps d'injection. Les données sont ensuite analysées par le logiciel Sequencing Analysis 3.7. Les résultats sont présentés par la machine sous forme de courbes (Électrophérogramme) présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui est faite en termes de nucléotides.



Figure 11: Analyseur génétique 3500Dx.

IX. Les outils de bio-informatique :

- *Logiciel BLAST (nucléotide BLAST)*

Le logiciel blast permet de comparer une séquence nucléique dite requête à une banque de séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin +) et son complémentaire inversé (brin -).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>

- *Logiciel NCBI (CCDS data base)*

Ce logiciel permet de localiser la mutation au niveau de la partie codante du gène étudié et éventuellement de connaître l'acide aminé touché par la mutation sur la séquence protéique correspondante.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- *ClinVar : (NCBI)*

Option de NCBI, agrège des informations sur la variation génomique et sa relation avec la santé humaine (pathogénique, non pathogénique).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>

- *Logiciel Mutation T@ster:*

MutationTaster est une application gratuite sur le Web permettant d'évaluer les variants de séquence d'ADN en termes de potentiel pathogène. Le logiciel effectue une batterie de tests in silico pour estimer l'impact de la variante sur le produit du gène / protéine. Les tests sont effectués à la fois sur les protéines et sur l'ADN. MutationTaster n'est donc pas limité aux substitutions d'acides aminés simples, mais peut également traiter des variantes synonymes ou introniques.[6], [7]

<http://www.mutationtaster.org/>

- *Logiciel PolyPhen-2 :*

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) est un outil qui prédit l'impact possible d'une substitution d'acides aminés sur la structure et la fonction d'une protéine humaine à l'aide de considérations physiques et comparatives simples. Veuillez utiliser le formulaire ci-dessous pour soumettre votre requête.

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

Résultats :

I. Epidémiologie :

1. Sexe :

Notre série est composée de 19 patients de sexe masculin et de 8 patientes de sexe féminin avec un sexe ratio à 2,3 (**Figure 12**).

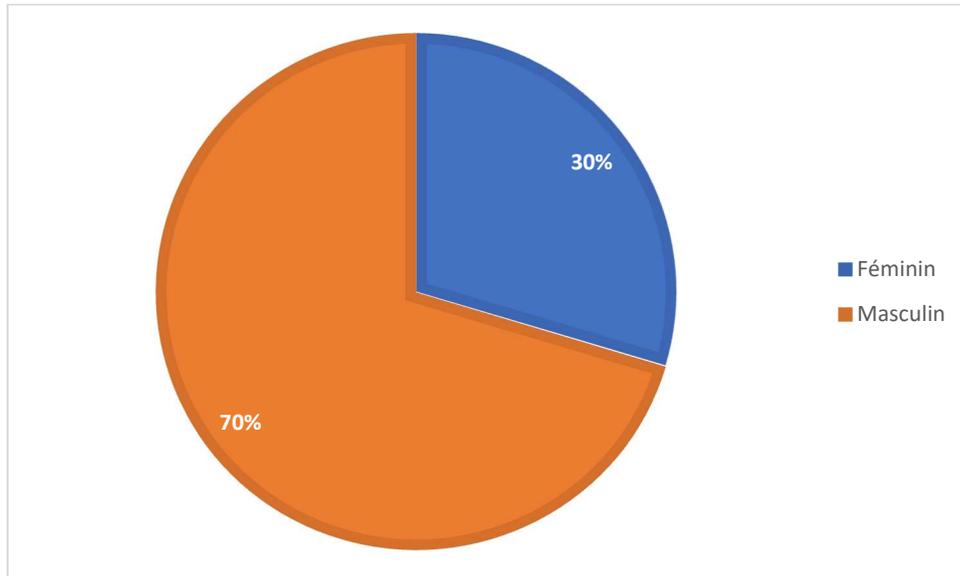


Figure 12: Distribution selon le sexe.

2. Age :

L'analyse de la série montre que la grande majorité des patients de l'étude : 18 cas/27 (66,67%) font partie de la forme juvénile qui se manifeste entre l'âge de 02 à 18ans, en seconde place vient la forme adulte 6 cas /27 (22,22%) et la forme infantile avec des patients âgés de moins de deux ans : 3 cas/27 (11,11%) (**Figure 13**).

L'âge médian de révélation des premiers symptômes des patients de notre série est de 17,4 ans avec des extrêmes allant de 1 an à 58 ans.

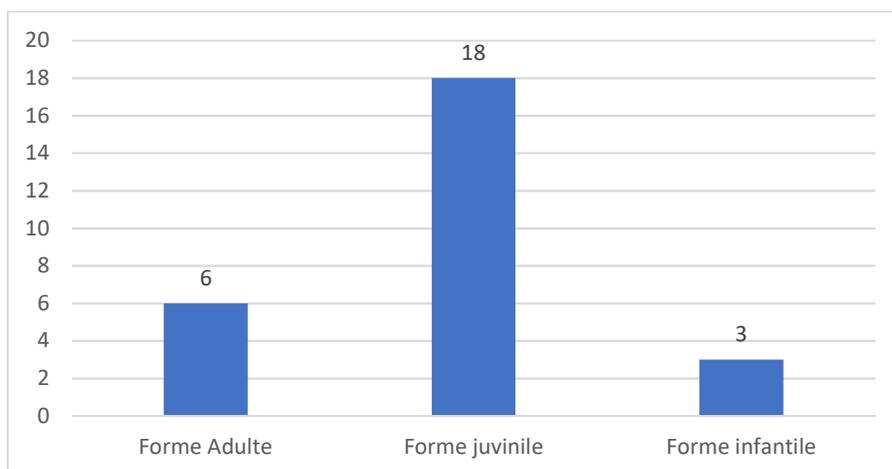


Figure 13: Distribution selon l'Age.

3. Consanguinité :

Les données de la série montrent qu'il y a une notion de consanguinité chez 06cas/19 de notre série avec un pourcentage de 48,15% (Figure 14).

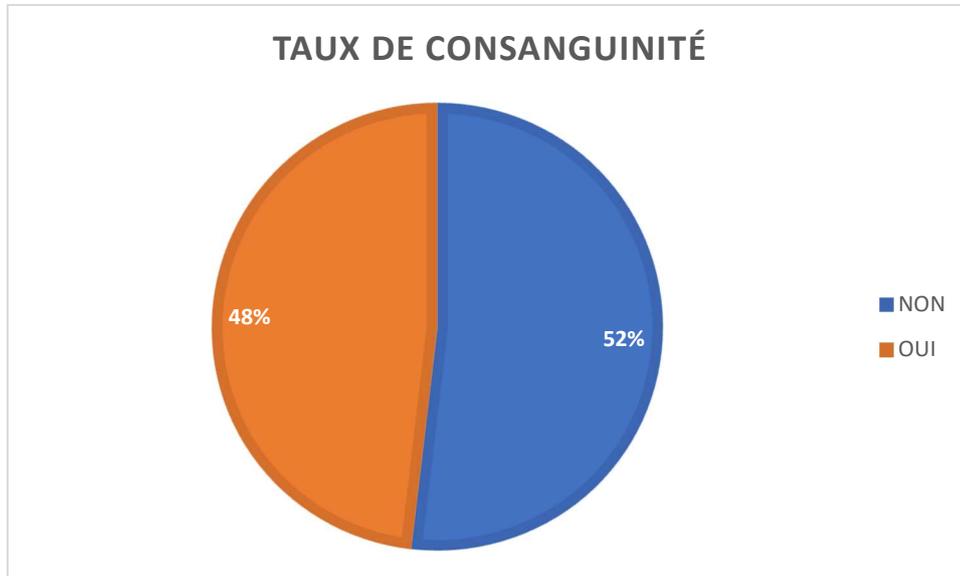


Figure 14: Distribution selon la consanguinité.

II. Signes Clinique :

Sur le plan clinique, l'Hyperoxalurie Primitive type 1 s'est révélée principalement par des manifestations rénales à type de douleurs lombaires (59%), d'insuffisance rénale (11%), d'infections urinaires à répétition (7%), d'hématurie macroscopique (4 %). Quatre patients (15 %) ont été découverts à la suite d'une enquête familiale par la présence d'un cas index dans la famille. Chez un patient, l'Hyperoxalurie Primitive type 1 a été révélée par une polyurie associée à un retard staturo-pondéral (4%) (Figure 15).

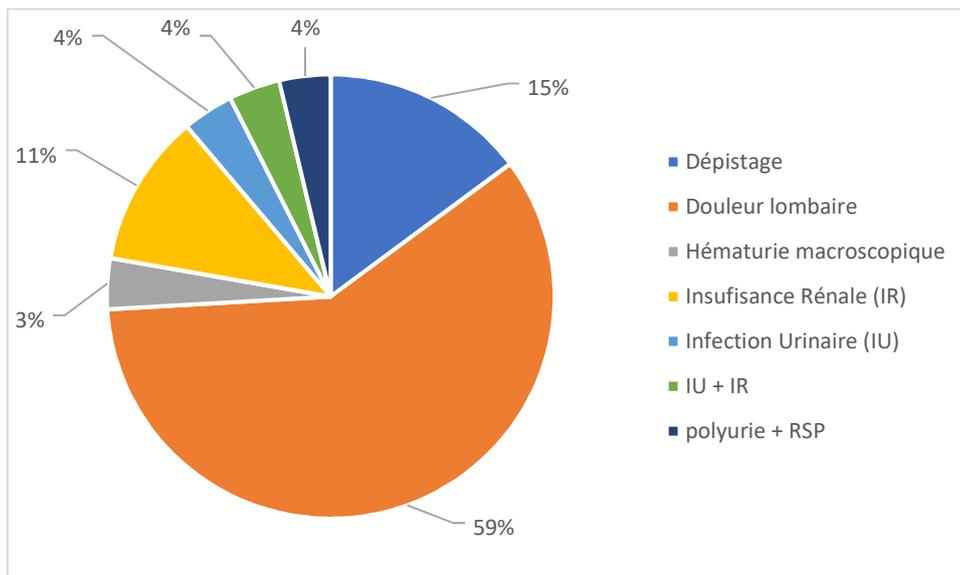


Figure 15: Distribution selon les Signes cliniques.

III. Biologie

1. Dosages biochimiques

- *Fonction rénale :*

La fonction rénale est conservée chez 21 cas / 27 (78%) tandis que 6 cas /27 (22%) en une fonction rénale altéré (**Figure 16**).

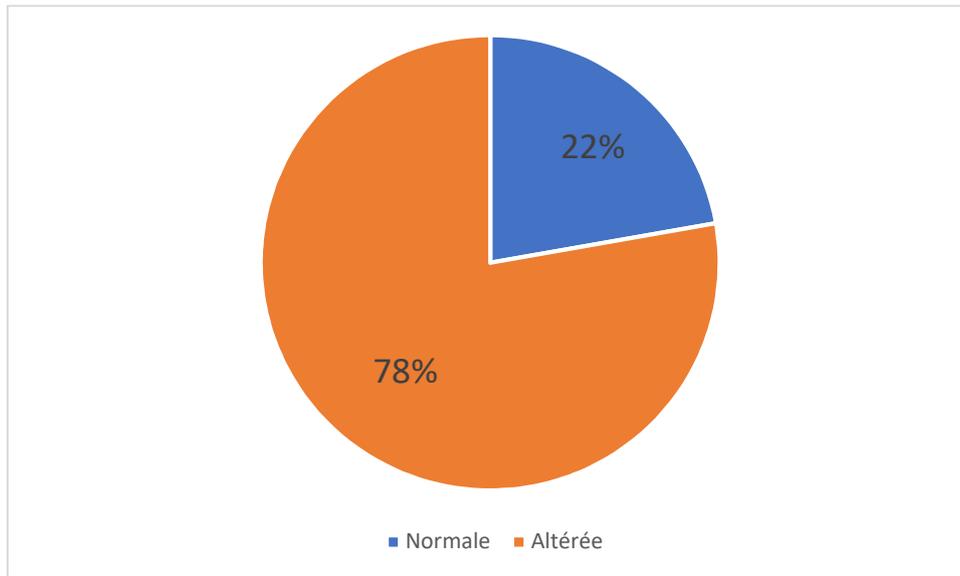


Figure 16: Distribution selon la fonction rénale.

- *Bilan phosphocalcique :*

Le bilan phosphocalcique faite de calcémie et phosphorémie est revenu normal chez tous les patients.

2. Étude de la cristallurie

La cristallurie était positive dans 56 % des cas (23 sur 27). L'espèce la plus fréquente était la whewellite (oxalate de calcium monohydraté) détectée dans 59,3 % des urines examinées associée à la weddellite (oxalate de calcium dihydraté) dans 22,2 % des cas, soit dans 81,5 % des cas. La weddellite unique se présentait, dans 3,7 % des cas (un seul cas) (**Figure 17**). Dans notre étude, 16 patients ont présenté un nombre de cristaux supérieur à 200/mm³.

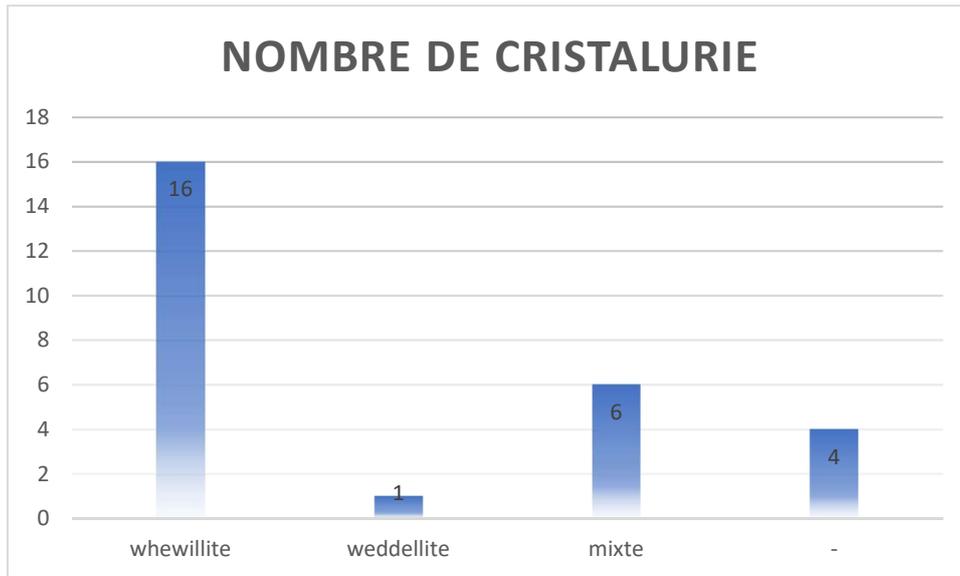


Figure 17: Distribution selon la cristallurie.

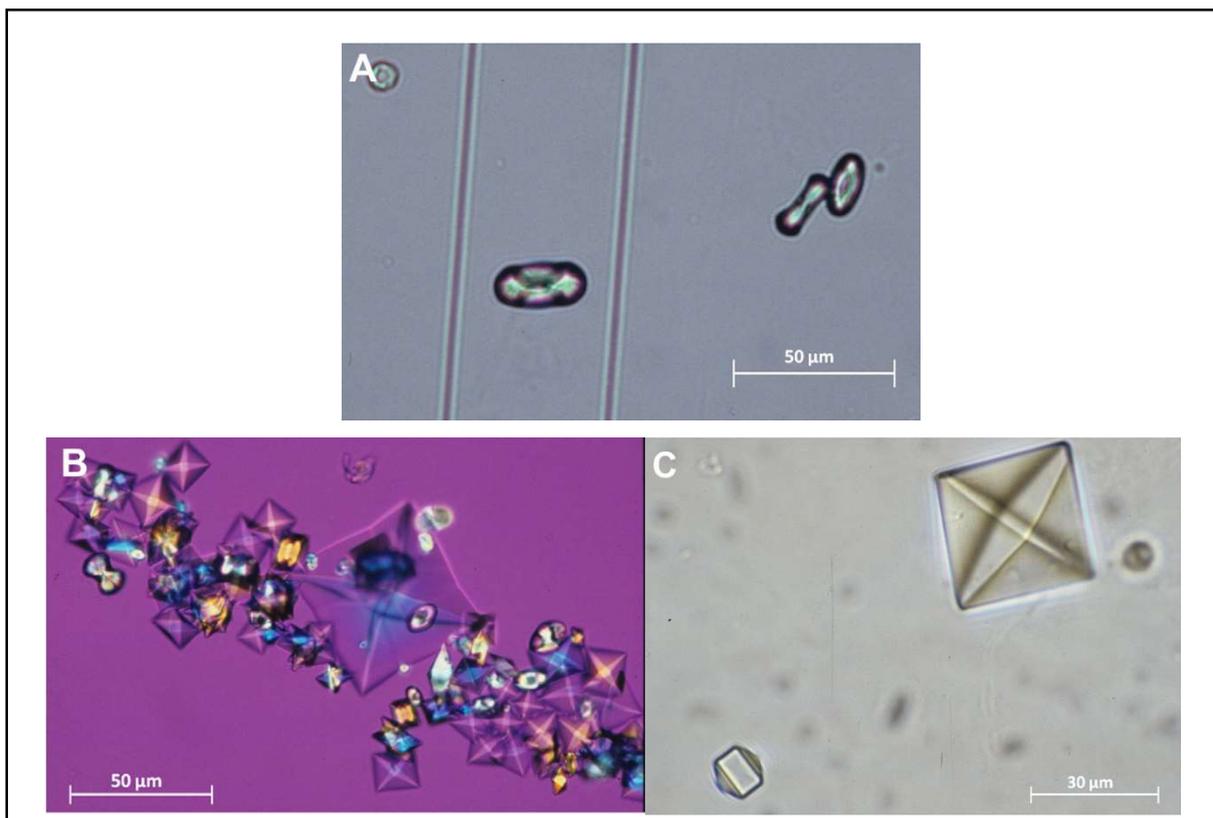


Figure 18: Différents type de cristaux vue en microscope.

A. Cristaux caractéristiques de whewillite, ovales à centre déprimé et extrémités renflées, vus en lumière blanche. Domaine habituel de pH : 5–7. B. Volumineux agrégat de whewillite et de weddellite octaédrique (aspect en « enveloppe carrée ») vu en lumière polarisée. Domaine habituel de pH : 5–7. C. Deux faciès différents de la weddellite vus en lumière blanche, bipyramidal, ou octaédrique (en haut à droite), et dodécaédrique (en bas à gauche). Le faciès dodécaédrique résulte de l'épaississement progressif de la face de séparation entre les deux pyramides qui forment le cristal octaédrique de base. Le faciès dodécaédrique est un marqueur d'hypercalciuries, souvent de forte intensité. Domaine habituel de pH : 5–7.

IV. Radiologie

1. Abdomen sans préparation

L'abdomen sans préparation a été réalisé chez 4 cas/27 (14,81%) (Figure 19).

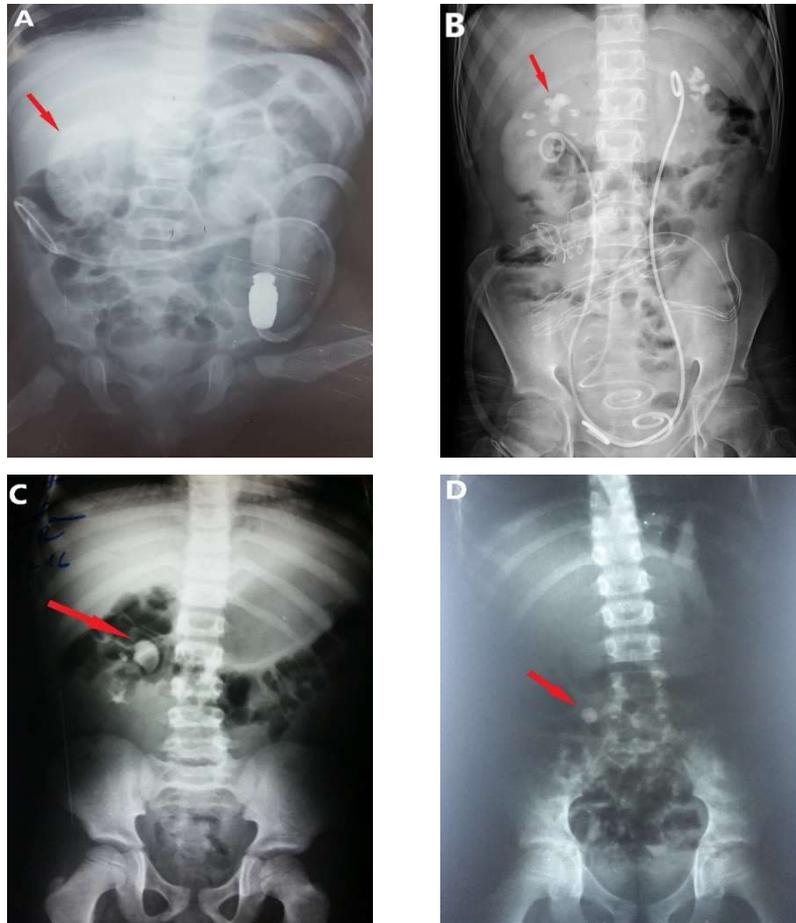


Figure 19: Images d'ASP montrant les différentes images de calculs retrouvés chez nos patients.

2. Echographie

L'échographie rénale pratiquée chez 22 malades a révélé des lithiases pyélo-calicielles et rénales multiples ou bilatérales chez vingt d'entre eux (90 %).

La néphrocalcinose associée à une malformation rénale tel qu'un rein en fer à cheval a été retrouvée chez un patient (5 % des cas). Une macrocalcification des deux reins a été détectée chez un patient de notre série (5 % des cas).

V. Génétique moléculaire :

Le diagnostic moléculaire a été réalisé en premier temps par le séquençage direct de l'exon 7 pour étudier la mutation Maghrébine, p.Ile244Thr. Chez les patients hétérozygotes et homozygotes normaux pour les mutations testées, nous avons effectué une analyse moléculaire des exons 1, 2, 9 et 10 du gène *AGXT* (Tableau 7).

L'analyse des régions codantes et des séquences introniques du gène *AGXT* ont montré la présence de la mutation c.731T>C (p.Ile244Thr) (Figure 20) chez 8 patients de notre série.

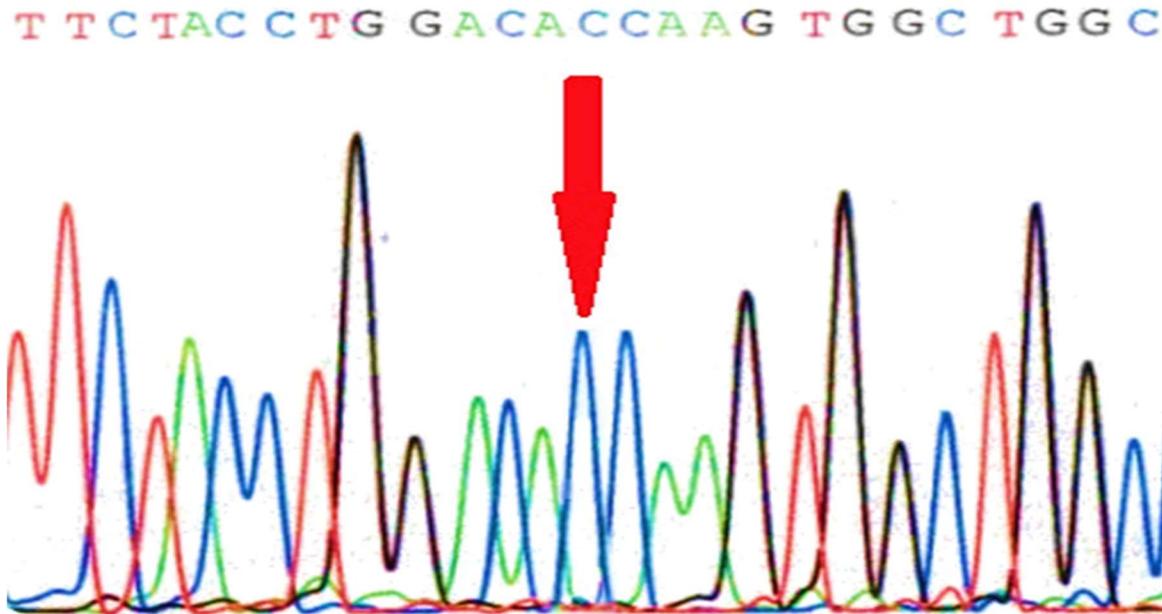


Figure 20: Électrophérogramme de la mutation c.731T>C (p.Ile244Thr) à l'état homozygote détectée par séquençage de l'exon 7 du gène *AGXT*.

Les résultats du séquençage ont montré la présence de plusieurs polymorphismes (Tableau 6: Résultats de l'analyse moléculaire des exon 1, 2, 7, 9 et 10 du gène *AGXT* chez les patients marocains atteints d'Hyperoxalurie Primitive type 1.):

- ✓ Le premier est un changement c.32C> T (p.Pro11Leu) qui code pour la leucine au niveau du codon 11 au lieu de la proline.
- ✓ La duplication de 74 pb dans l'intron 1 c.166-48_166-47ins74.
- ✓ Les substitutions : la mutation silencieuse c.264C>T (p.Ala88=) dans l'exon 2 qui code pour le même acide aminé (Alanine) du codon 88.
- ✓ La mutation c.1020A>G (p.Ile340Met) qui code pour la Méthionine au niveau du codon 340 au lieu de l'Isoleucine.
- ✓ La délétion c.358+56_358+64del9 au niveau de l'intron 2.

- ✓ Nous avons également trouvé d'autres polymorphismes dans l'intron 9 : c.943-117C>T c.943-167G>T et c.942+127C>T

Chez 12 de nos patients, aucune mutation n'a été détectée par séquençage de Sanger des Exons 1, 2, 7, 9 et 10 du gène *AGXT*.

	Variant	Position	Exon/Intron	cDNA	Protéine
Mutation	rs121908525 [8]–[11]	Ch2: 241814576	Exon 7	c.731T>C	p.Ile244Thr
Polymorphisme	rs34116584 [9], [11]–[24]	Ch2: 241808314	Exon 1	c.32C>T	p.Pro11Leu
	rs180177174 [25]	Chr2: 241808539 - 241808540	Intron 1	c.166-48_166-47ins74	
	rs35698882 [13], [26]	Chr2: 241808685	Exon 2	c.264C>T	p.Ala88=
	rs180177209 [20]	Chr2: 241808835 - 241808843	Intron 2	c.358+56_358+64del9	
	rs10199038	Chr2: 241817322	Intron 9	c.943-117C>T	
	rs4073370	Chr2: 241817272	Intron 9	c.943-167G>T	
	rs111576306	Chr2: 241817176	Intron 9	c.942+127C>T	
	rs4426527 [9], [13], [16], [19], [22], [24], [27], [28]	Chr2: 241817516	Exon 10	c.1020A>G	p.Ile340Met

Tableau 6: Résultats de l'analyse moléculaire des exon 1, 2, 7, 9 et 10 du gène *AGXT* chez les patients marocains atteints d'Hyperoxalurie Primitive type 1.

Patients	Mutation	Polymorphismes					
	Exon 7	Exon 1	Intron 1	Exon 2	Intron 2	Intron 9	Exon 10
1		c.32C>T		c.264C>T			
2	c.731T>C						
3				c.264C>T			c.1020A>G
4	c.731T>C						
5	c.731T>C						
6		c.32C>T	c.166-48_166-47ins74			c.943-117C>T	
7	c.731T>C						
8			c.166-48_166-47ins74			c.943-117C>T	
9					c.358+56_358+64del9	c.943-117C>T	
10						c.943-117C>T	
11	c.731T>C	c.32C>T				c.943-167G>T	
12	c.731T>C						
13	c.731T>C						
14	c.731T>C						
15						c.942+127C>T	

Tableau 7: Résultats de l'analyse moléculaire des exon 1, 2, 7, 9 et 10 du gène AGXT des patients de notre série.

Discussion :

I. Rappel :

1. Epidémiologie

On estime que l'hyperoxalurie primitive type 1 (HOP1) représente 1% à 2% des enfants atteints d'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT)[29]. Si on prend en considération ces statistiques, il est important de se rappeler que HOP1 reste sous-diagnostiqué en raison de la grande variabilité de sa présentation clinique et de son âge de survenue.

Les estimations cliniques de la prévalence de HOP1, principalement issues d'études européennes, vont de un à trois sur 1 000 000[30], [31]. On estime que HOP1 se produit chez 1/120 000 naissances en Europe[30]. Étant donné que l'hétérogénéité phénotypique varie d'une maladie grave infantile à des adultes présentant des calculs récurrents, et qu'une maladie avancée est présente dans 20% à 50% des cas au moment du diagnostic, un sous-diagnostic est probable. L'analyse de la population basée sur les variantes pathogènes *AGXT* identifiées dans le projet de séquençage de l'exome de l'Institut national du cœur, des poumons et du sang (NHLBI GO Exome Sequencing Project) suggère une prévalence de 1: 149 000 chez les Américains d'origine européenne et de 1: 157 000 chez les Afro-Américains[32].

Une fréquence plus élevée d'Hyperoxalurie Primitive type 1 a été rapportée en Tunisie et au Koweït[32]–[34], chez des Arabes et des familles druzes d'Israël[35] et en Iran[36] en raison du taux élevé de consanguinité dans ces populations. Aucune mutation fondatrice commune n'a été identifiée dans ces populations[35], [37], [38].

Dans notre pays, la prévalence observée ne reflète pas la prévalence réelle, vu la difficulté de réaliser le dépistage systématique chez les familles à risque et le non diagnostic de plusieurs patients.

2. Description clinique

Dans l'hyperoxalurie primaire de type 1, de fortes concentrations d'oxalate dans l'urine se combinent au calcium, ce qui entraîne la formation de cristaux d'oxalate de calcium. Le dépôt de cristaux conduit à une néphrolithiase dans les voies urinaires, à des lésions des tubules rénaux ou à une néphrocalcinose lorsque les cristaux se déposent dans le parenchyme rénal. Des lésions rénales progressives et finalement une insuffisance rénale s'installe. Étant donné que le débit de filtration glomérulaire (DFG) en baisse limite l'excrétion de l'oxalate en excès, les taux plasmatiques augmentent rapidement. La sursaturation en plasma de l'oxalate de calcium entraîne alors un dépôt d'oxalate de calcium dans de nombreux organes et tissus (oxalose) présentant des manifestations systémiques.

La présentation clinique de HOP1 est variable. L'âge d'apparition des symptômes varie de la petite enfance à la sixième décennie (âge médian: 4-6 ans)[30], [32], [39]. La majorité des individus présentent des symptômes liés à la néphrolithiase. Certains présentent une forme grave et très précoce de HOP1 au cours de la première année de vie, caractérisée par un retard de croissance et une insuffisance rénale chronique terminale (IRCT). À l'autre extrémité du spectre de gravité clinique observé chez HOP1, certaines personnes ne présentent aucun symptôme ou présentent un minimum de symptômes pendant la sixième décennie de leur vie[30], [32].

- *Manifestation rénales :*

Les individus appartenant généralement à l'un des cinq groupes suivants:

- Néphrocalcinose précoce et insuffisance rénale chez le nourrisson ou le jeune enfant (représente environ 10% des personnes atteintes d'Hyperoxalurie Primitive type 1 en Europe et en Amérique du Nord)
- Néphrolithiase récidivante et insuffisance rénale progressive avec un diagnostic dans l'enfance, l'adolescence ou entre le début et le milieu de l'âge adulte (représente la majorité des individus affectés)
- Diagnostique après une insuffisance rénale chronique terminale par la présence de dépôts d'oxalate sur la biopsie rénale, de néphropathie récurrente à l'oxalate dans une allogreffe rénale après transplantation rénale ou en raison d'oxalose systémique se développant au cours d'une dialyse chronique. (Presque 10% des personnes touchées)
- Forme tardive avec calculs occasionnels diagnostiqués à l'âge adulte (<10%)
- Diagnostic chez un individu pré-symptomatique en raison d'antécédents familiaux positifs (<10%)

- *Oxalose :*

Lorsque le débit de filtration glomérulaire (DFG) est $<30 \text{ ml / min / } 1,73 \text{ m}^2$, la production quotidienne d'oxalate est supérieure à la clairance rénale de l'oxalate, ce qui entraîne une accélération de l'augmentation de la concentration plasmatique en oxalate associée à la diminution du DFG et une perte supplémentaire de la fonction rénale résiduelle. La sursaturation dans le plasma entraîne le dépôt de cristaux d'oxalate de calcium dans plusieurs tissus de l'organisme (oxalose), notamment les reins, la rétine, le myocarde, les vaisseaux sanguins, les os, la moelle osseuse et les tissus sous-cutanés[30], [40], [41]. Les nerfs périphériques, la synovie et d'autres tissus peuvent également être impliqués[40].

Les manifestations cliniques peuvent inclure des troubles visuels, des troubles de la conduction cardiaque et des cardiomyopathies. L'atteinte vasculaire peut conduire à une ischémie, qui se manifeste le plus souvent par des ulcères cutanés non cicatrisants. Bien que ce soit inhabituel, des infarctus cérébraux ont été rapportés suite à un dépôt d'oxalate de calcium dans les vaisseaux cérébraux[42]. Une hypotension réfractaire peut être observée dans l'oxalose avancée. Les os sont le plus grand dépôt d'oxalate en excès. L'ostéodystrophie à l'oxalate provoque des douleurs osseuses et des fractures pathologiques. L'atteinte de la moelle osseuse peut entraîner une anémie réfractaire aux agents stimulant l'érythropoïétine (ESA). Des douleurs dentaires dues au dépôt d'oxalate et à la résorption des racines ont été décrites[43]. La neuropathie périphérique peut être causée par le dépôt de cristaux dans le nerf[44].

Les mesures de la densité minérale osseuse permettent une évaluation non invasive de la charge en oxalate[45], bien que l'interprétation de la densité osseuse soit compliquée par de multiples modifications osseuses liées à l'IRT.

3. Étiologie:

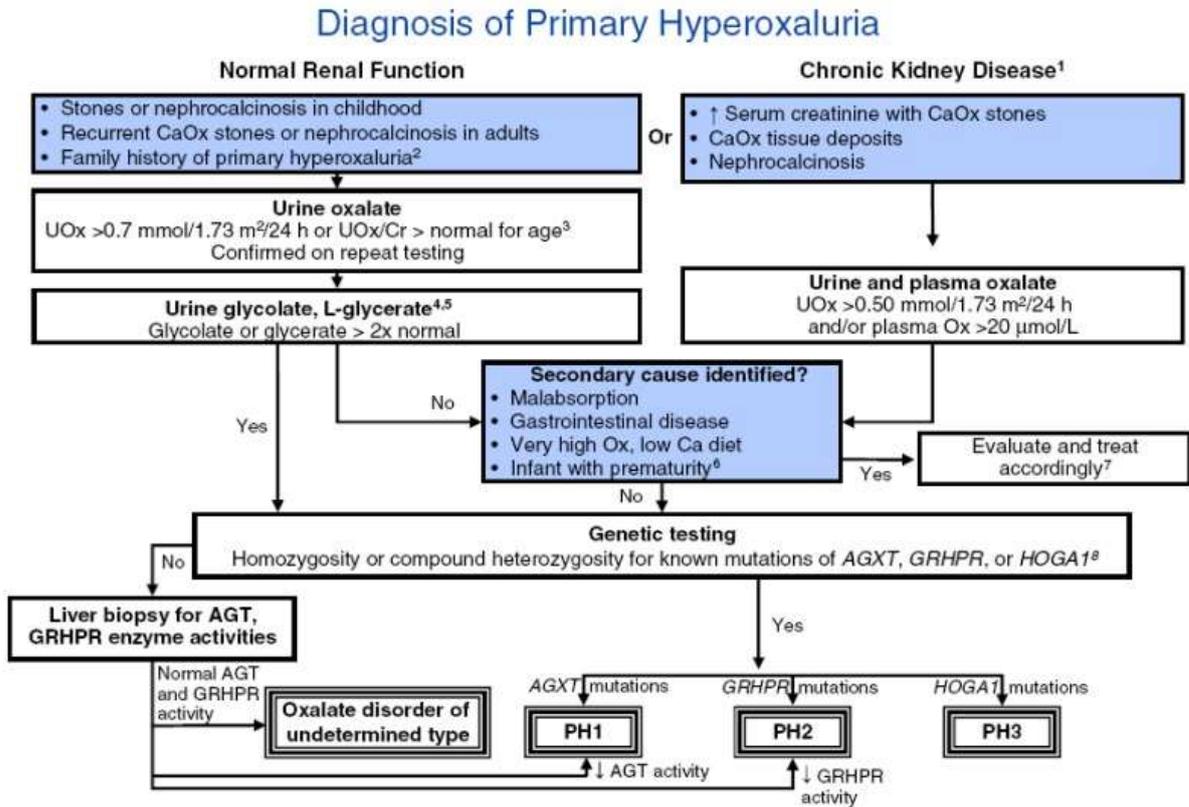
L'Hyperoxalurie Primitive type 1 est causée par un déficit en enzyme péroxisomale hépatique alanine: glyoxylate aminotransférase causé par des mutations du gène *AGXT* (2q37.3). L'AGT convertit normalement le glyoxylate en glycine.

Lorsque l'activité enzymatique AGT est déficiente, le substrat de glyoxylate accumulé est transformé en oxalate par la glycolate oxydase dans les peroxysomes ou par le lactate déshydrogénase dans le cytosol[46]. L'oxalate forme des sels d'oxalate de calcium insolubles que le corps ne peut pas éliminer facilement. Dans l'allèle pathogène le plus commun (allèle majeur), c.508G> A (p.Gly170Arg), l'enzyme AGT est transféré par erreur dans les mitochondries plutôt que dans les peroxysomes, où le substrat est localisé. L'enzyme AGT mal orientée conserve une activité enzymatique considérable mais n'a aucun contact avec son substrat. Les conséquences fonctionnelles sont donc les mêmes que pour d'autres variants pathogènes qui ne produisant aucune activité enzymatique. Le transfert par erreur et une activité résiduelle élevée sont observés chez les hétérozygotes et les homozygotes pour le variant p.Gly170Arg[47].

Pour le variant p.Ile244Thr qui semble être le résultat d'un effet fondateur au sein de la population des îles Canaries[10]. L'AGT avec la variante pathogène p.Ile244Thr (allèle mineur) a apparemment une conformation altérée[10]. Cette variante est également apparemment associée à une erreur de transfert[11].

4. Méthode(s) diagnostique(s) :

Une Conduite à tenir a été établie par Edvardsson en 2013 [3], L'algorithme (Figure 21) aide également le clinicien à différencier entre les types de 1, 2 et 3.



1. Chronic kidney disease is defined as a glomerular filtration rate of less than 50 mL/min/1.73 m², or serum creatinine that is greater than equal to two times normal for age.
2. The guideline does not address prenatal diagnosis [Rumsby 1998, Barratt et al 1991].
3. Urine oxalate-to-creatinine (Ox/Cr) ratios in healthy children vary continuously by age. Tables of normal values should be consulted in interpretation of any random urine Ox/Cr ratio.
4. Urine and plasma oxalate and urine glycolate measurements for diagnostic testing should be obtained while the patient is not receiving pyridoxine or vitamin supplements.
5. Increased urine glycolate in the presence of hyperoxaluria is suggestive, but not diagnostic of PH type 1. Increased urine L-glycerate in a hyperoxaluric patient suggests PH type 2.
6. Urine Ox/Cr ratios are higher in very premature infants than in term infants, especially when they are receiving parenteral nutrition containing amino acids. The ratio falls when premature infants are receiving only glucose and electrolyte solutions [Morgan et al 1987].
7. When very high oxalate or low dietary calcium is suspected as the cause of the hyperoxaluria, the diet should be corrected and the urine oxalate remeasured for verification.
8. In some cases with firm clinical diagnosis, only one mutation is found even after analysis for large rearrangements, suggesting that regulatory or deep intronic mutations may be the second, undetected mutation. In such cases, the finding of a single disease-associated mutation in the context of a typical phenotype supports the clinical diagnosis of PH.

Figure 21: Algorithme de diagnostic d'Hyperoxalurie Primitive.[3]

Le diagnostic de l'Hyperoxalurie Primitive type 1 est suspecté devant le tableau clinique associé à la présence de calculs de monohydrate d'oxalate de calcium pur. Il est confirmé par le ratio oxalate urinaire/créatinine urinaire, le test génétique moléculaire et rarement, l'activité catalytique de l'AGT à partir de biopsies hépatiques.

a. Le diagnostic moléculaire :

L'analyse de séquence du gène *AGXT* est effectuée en premier lieu, suivie d'une recherche de délétion / duplication si aucune variante pathogène est trouvée (**Tableau 8**).

Gène	Méthode utilisé	Proportion des sujet présentant un variant pathogène détecté par chaque méthode.
<i>AGXT</i>	Analyse de la séquence	>97% [48]
	Délétion/Duplication	<3% [49]–[52], [20], [53]

Tableau 8: Diagnostic moléculaire utiliser dans l'Hyperoxalurie Primitive type 1.

b. Biopsie hépatique :

Si le glycérate urinaire, le 4-hydroxyoxoglutarate (HOG) et le dihydroxyglutarate (DHG) sont normaux et qu'aucun variant pathogène *AGXT*, *GRHPR* ou *HOGA1* n'est détecté, la biopsie hépatique peut être réalisé pour doser l'activité enzymatique de la glyoxylate aminotransférase (AGT).[32]

5. Diagnostic(s) différentiel(s)

Le diagnostic différentiel de l'Hyperoxalurie Primitive type 1 inclut :

- Hyperoxalurie primitive type 2 est causée par des mutations du gène *GRHPR* (9q12) codant pour l'enzyme glyoxylate réductase/hydroxypyruvate réductase.[54]
- Hyperoxalurie primitive type 3 est causée par des mutations du gène 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1 (*HOGA1*)(10q24.1).[55]
- Hyperoxalurie entérique : L'hyperoxalurie peut être associée à des maladies affectant l'intestin grêle qui entraînent une malabsorption des graisses, notamment la maladie cœliaque, la maladie de Crohn, la pancréatite et le syndrome de l'intestin court.[40], [56]
- Hyperoxalurie induite par l'alimentation : Une consommation excessive d'aliments riches en oxalate, y compris le chocolat, le cacao, les légumes-feuilles (notamment la rhubarbe et les épinards), le thé noir, les noix, le beurre d'arachide (cacahuètes) ou la carambole, peut entraîner une augmentation de la concentration plasmatique d'oxalate et donc une augmentation de la concentration urinaire d'oxalate.[57], [58]
- Urolithiase d'oxalate de calcium idiopathique.
- Autres causes héréditaires de calculs rénaux : la maladie de Dent et l'hypomagnésémie primaire familiale avec hypercalciurie et néphrocalcinose.[3], [59], [60]

- Autres causes : L'insuffisance rénale aiguë secondaire à des dépôts d'oxalate dans les reins chez les personnes prenant de fortes doses d'acide ascorbique (Vitamine C).[61], [62]

6. Diagnostic prénatal et préimplantatoire :

a. Diagnostic moléculaire :

Une fois que les variantes pathogènes du gène *AGXT* ont été identifiées chez un membre de la famille, le test prénatal pour une grossesse à risque et le diagnostic préimplantatoire sont possibles.

b. Tests biochimiques :

Le dosage de l'activité enzymatique de l'AGT avant la naissance n'est généralement pas proposé car l'enzyme n'est pas exprimée dans les amniocytes ni dans les villosités chorionales et, par conséquent, le dosage de l'activité enzymatique nécessite une biopsie du foie du fœtus. L'AGT n'est détectable dans le foie fœtal qu'après 14 semaines de gestation[63].

7. Conseil génétique

a. Les parents d'un proposant :

Les parents d'un enfant atteint par l'HOP1 sont présumés être des hétérozygotes obligatoires. Les tests de génétique moléculaire visant à confirmer le statut de porteur des deux parents. Les hétérozygotes sont asymptomatiques et ne risquent pas de développer la maladie.

b. La fratrie d'un proposant :

Au moment de la conception, la fratrie d'un sujet atteint a 25% de chance d'être touché, 50% de chance d'être porteur asymptomatique et 25% de chance d'être non affecté et non porteur.

Dans une très rare exception à cette généralisation, un individu avec l'HOP1 causé par une isodisomie télomérique du chromosome 2 par la mère a été rapporté. L'individu touché était homozygote pour le variant pathogène commun p.Lys12GlnfsTer156. La mère était hétérozygote pour la variante; le variant était absent chez le père[64]. Cette situation modifierait le risque de récurrence.

c. Progéniture d'un proposant :

Les enfants d'un individu atteint d'Hyperoxalurie Primitive type 1 sont généralement des hétérozygotes obligatoires (porteurs) pour un variant pathogène dans *AGXT*.

8. Prise en charge et traitement

Un diagnostic précoce et le début du traitement conservateur sont essentielles pour préserver la fonction rénale aussi longtemps que possible[65], Celui-ci implique :

a. Réduction de la sursaturation en oxalate de calcium urinaire :

Boire de grandes quantités de liquide (2-3L/m²/24heures) à intervalles réguliers tout au long de la journée/nuit empêchant ainsi la sursaturation urinaire en oxalate de calcium.

Alcalinisation de l'urine (pH 6,2-6,8) pour inhiber la cristallisation de l'oxalate de calcium en utilisant le citrate de potassium par voie orale à une dose de 0,1-0,15mg/kg ou 0,3-0,5mmol/kg/j en 3-4 doses fractionnées, dans la mesure où le DFG est préservé.

Des doses modérées de solutions contenant des pyrophosphates peuvent également inhiber la formation de cristaux, et peut être administré comme 20 à 30 mg/kg/j de phosphate en doses fractionnées.

Éviter les aliments et les boissons riches en oxalate.

b. Traitement des calculs rénaux :

Par différentes modalités chirurgicales :

Lithotripsie par ondes de choc est le premier traitement de choix.

L'urétéroscopie détient un très bon record de réussite en matière d'élimination de calculs avec un taux de complications minime et peut remplacer la lithotripsie en tant que traitement de première intention dans de nombreux centres.

La néphrolithotomie percutanée doit être considérée comme traitement de première intention en cas de calcul volumineux (> 15 mm).

c. Réduction de la biosynthèse de l'oxalate :

Environ 30% à 50% des personnes atteintes d'HOP 1 répondent au traitement par la pyridoxine(Vit B6) après au moins trois mois de traitement.[66]

d. Hémodialyse :

L'élimination de l'oxalate est beaucoup plus efficace avec l'hémodialyse que la dialyse péritonéale. Pour cette raison, la dialyse péritonéale ne devrait pas être considérée comme la modalité principale de dialyse chez tout individu atteint d'Hyperoxalurie Primitive type 1.

e. Transplantation hépatorenale :

Comme la dialyse ne peut pas empêcher l'oxalose systémique chez un individu présentant un DFG <25-30 ml/min/1,73m², la transplantation d'organe est l'option privilégiée pour le traitement.

Des recommandations de bonnes pratiques sur la transplantation d'organes des personnes non sensibles à la pyridoxine atteintes d'HOP1 élaboré par Cochat en 2012[41], Qui tiennent compte de l'âge de l'individu, son DFG résiduel, et la preuve de dépôt d'oxalate systémique dans les organes extrarénaux.

II. Discussions des résultats :

1. Epidémiologie

a. Fréquence

L'hyperoxalurie primaire de type 1 est une maladie génétique rare caractérisée par une hétérogénéité allélique et phénotypique. Elle n'est pas une maladie commune dans la population européenne et Nord-américaine, où sa prévalence est de 1 à 3 par million d'habitants. Cependant, une augmentation de la fréquence a été rapportée dans les pays du Moyen-Orient et en Tunisie qui est probablement dû à un taux de consanguinité élevé. Dans une étude réalisée sur 78 cas d'HP durant la période s'étalant de 1986 à 1996, Cochat et al.[67] ont noté un fort taux de consanguinité chez les patients d'origine musulmane (76 %).

Au Maroc, seules quelques études fragmentaires ont été réalisées ne permettant pas d'établir une prévalence telle la publication de Iraqui en 1984 à propos de 3 cas[68] et celle de Boualla[5] en 2015 à propos de 29 cas. La série tunisienne[69] rapporte 24 cas pédiatriques colligés en 4 ans dont 4 nourrissons âgés de moins d'un an, soit un pourcentage de 17%.

Notre série comporte 27 observations. Ceci impose impérativement d'établir un registre national pour toutes les maladies héréditaires et surtout pour l'hyperoxalurie primitive ayant un mauvais pronostic.

Ce registre peut être facilité par la création de nouveaux centres d'études au niveau des nouveaux centres hospitaliers universitaires.

b. Age

L'Hyperoxalurie Primitive type 1 est essentiellement une maladie du jeune enfant, même si quelques cas ne sont reconnus qu'à l'âge adulte. Les premières manifestations surviennent habituellement avant l'âge de cinq ans dans 50 % des cas et même au cours de la première année de vie chez 10 à 20 % des enfants atteints.

Etude	≤ 2an	2an – 18ans	≤ 18ans
Chemli J[70]	40 %	60 %	-
Barbey f.[71]	15 %	50 %	-
Notre étude	11,11 %	66,66 %	22,22 %

Tableau 9: Age d'apparition des premiers symptômes.

Dans notre série et les autres séries de la littérature, la maladie se révèle chez 50 à 66% des patients entre 2ans et 18ans ceci doit attirer l'attention sur l'incidence des formes juvénile.

Sans oublié la forme à révélation tardive (adulte) décrite dans 22% des cas de notre série, ce pourcentage élevé peut être la conséquence d'un retard de diagnostic (**Tableau 9**).

c. Sexe :

L'HPI touche indifféremment les deux sexes, cependant certaines séries rapportent une prédominance d'un sexe sur l'autre :

Etude	Sexe ratio	Prédominance
Cochat[72]	ND	Masculine
Kamoun[69]	Sexe ratio=1	Autant
Mayo clinic	Sexe ratio=1	Autant
Notre étude	Sexe ratio=2,3	Masculine

Tableau 10: Distribution selon le sexe.

L'analyse des différentes séries montre une certaine variabilité de prédominance d'un sexe, cependant une prédominance masculine (**Tableau 10**).

d. Consanguinité

Comme toutes les maladies héréditaires récessives autosomiques, HP I est plus fréquente dans les groupes ethniques à consanguinité élevée ; ceci soulève la problématique de ces pays à bas niveau socio-économique.

Etude	Nombre de patient	Consanguinité
Cochat	78	76%
Kamoun	4	75%
Van Woerden[31]	44	11%
belhaj	15	66%
Notre étude	27	48%

Tableau 11: Fréquence de la consanguinité chez les patients atteint d'Hyperoxalurie Primitive type I.

La fréquence de la consanguinité dans les séries est très élevée et ceci est lié au caractère de transmission de la maladie.

Le taux de consanguinité dans notre série est inférieur au taux des autres séries du faite du nombre restreints de cas (**Tableau 11**).

2. Données Cliniques et paracliniques :

a. Symptomatologie clinique et Circonstances de découverte

L'Hyperoxalurie Primitive type 1 est essentiellement une maladie de l'enfant, elle est hétérogène sur le plan clinique, ce qui expliquera certains retards de diagnostic, l'infection des voies urinaires, la fièvre avec les douleurs abdominales et la déshydratation aiguë, sont les signes les plus fréquents rapportés par nos patients. Ils sont comparables à ceux décrits dans la littérature.

Cependant, de nombreux patients restent asymptomatiques pendant une longue période, ou présentent des symptômes non spécifiques qui ne sont pas souvent suffisamment comprises, et donc la possibilité pour un opportun diagnostic est généralement manquée[73].

Dans notre série, l'Hyperoxalurie Primitive type 1 s'est révélée par une symptomatologie clinique type :

- Douleurs lombaires dans 59 % des cas, tandis que dans la série tunisienne de Belhaj[74] on trouve que 20% des cas.

- Insuffisance rénale dans 11% des cas.

- évoquant une infection urinaire dans 7% des cas, alors que dans la série italienne de Pirulli et al.[75] regroupant 78 enfants atteints d'HP, on trouve 21% des cas admis pour infection urinaire.

- Retard de croissance lié à la maladie ou au stade terminal de l'IR, dans notre série 01cas/27 (4%) alors que dans la série italienne de Pirulli et al.[75] on trouve 22% des cas.

b. Données paracliniques :

- *Radiologie*

La lithiase révèle 75% des cas d'HP I, cependant la forme infantile est caractérisée par l'absence de lithiase dans la quasi majorité des cas et l'association néphrocalcinose à une urolithiase oxalocalcique est fortement évocatrice d'HP I chez le jeune enfant[76], [77].

Ce sont des calculs très radio opaques, le plus souvent arrondis et grumeleux, parfois spiculés en « oursin » expliquant la fréquence des accidents d'accrochage lors de la migration de ces formes hérissées.

Ces lithiases sont souvent nombreuses, bilatérales siégeant volontiers dans le bassinet et calices mais ne sont jamais coralliformes.

Dans notre série 20 cas/22 cas (90%) ont présenté des lithiases pyélo-calicielles et rénales multiples ou bilatérales l'échographie rénale, ce qui concorde avec les résultats retrouvés par Chemli et al. (55 %)[70] et celle de Gagnadoux (40 %)[76].

- *Cristallurie :*

Dans notre série cette exploration est faite en première étape parce que c'est un examen fait sur des urines matinales fraîchement émises et en dehors de l'infection.

L'espèce la plus fréquente était la whewellite (oxalate de calcium monohydraté) détectée dans 81,5% des cas (**Tableau 12**), ce qui rejoint l'étude de Daudon M qui cite que tous les calculs de l'hyperoxalurie primitive de type 1 étaient composés d'oxalate de calcium monohydraté pur ou pratiquement pur, ou whewellite dans 95% des cas[78], et la série de Belhaj avec une cristallurie positive dans 86 % des cas (L'espèce la plus fréquente était la whewellite)[74].

Etude	Nombre de patients	Cristallurie
Belhaj	15	86%
Daudon	ND	95%
Notre série	27	81,5%

Tableau 12: Fréquence de la cristallurie chez les patients atteint d'Hyperoxalurie Primitive type 1.

3. Biologie moléculaire :

a. La mutation maghrébine Ile244Thr :

L'analyse moléculaire ayant pour but de mettre en évidence une mutation au niveau du gène *AGXT* permet d'apporter une preuve génétique pour le diagnostic d'Hyperoxalurie Primitive type 1.

Nous avons procédé dans cette étude à la recherche d'une mutation génétique Ile244Thr connue fréquente dans la population maghrébine[70].

Cette mutation n'a été trouvée que chez huit malades sur 15, soit une fréquence allélique de 53 %. La prévalence de cette mutation varie selon les études et les populations analysées.

Dans une étude tunisienne[79], la mutation maghrébine n'a été identifiée que dans un tiers des cas (deux sur neuf).

Dans l'étude de Von Schnakenburg et Rumsby[8], parmi les 79 patients de plusieurs nationalités et de différentes origines ethniques atteints d'Hyperoxalurie Primitive type 1, uniquement neuf patients portaient la mutation Ile244Thr (cinq à l'état HMZ et quatre HTZ composites), donnant une fréquence allélique égale à 9 %.

Santana et al.[10], étudiant 16 patients atteints d'Hyperoxalurie Primitive type 1 originaires des Îles Canaries et appartenant à 12 familles différentes, ont trouvé que la mutation Ile244Thr (T853C) est de loin la plus fréquente chez ces patients (91,6 %).

La prévalence élevée de cette mutation serait en faveur de l'existence d'un effet fondateur (Figure 22).

À nos jours, dans l'Hyperoxalurie Primitive type 1, sept polymorphismes et 60 mutations sont identifiés[22], [32].

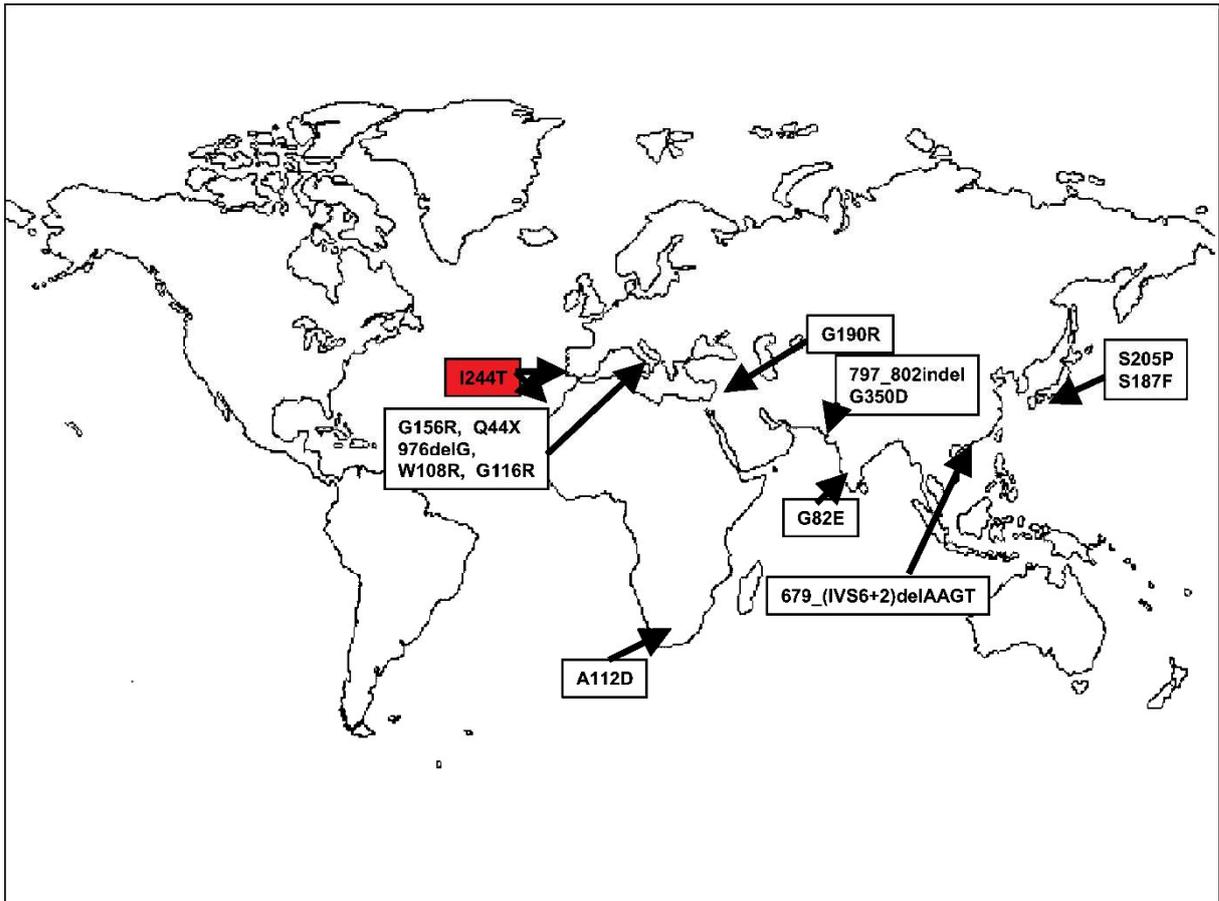


Figure 22: Carte du monde montrant les emplacements géographiques des mutations d'Hyperoxalurie Primitive type 1.

Les mutations répertoriées sont, à ce jour, uniques à la zone géographique et sont rapportées dans moins deux patients non apparentés. I244T représente probablement un effet fondateur dans la population espagnole et nord-africaine.[22]

b. Les autres mutations :

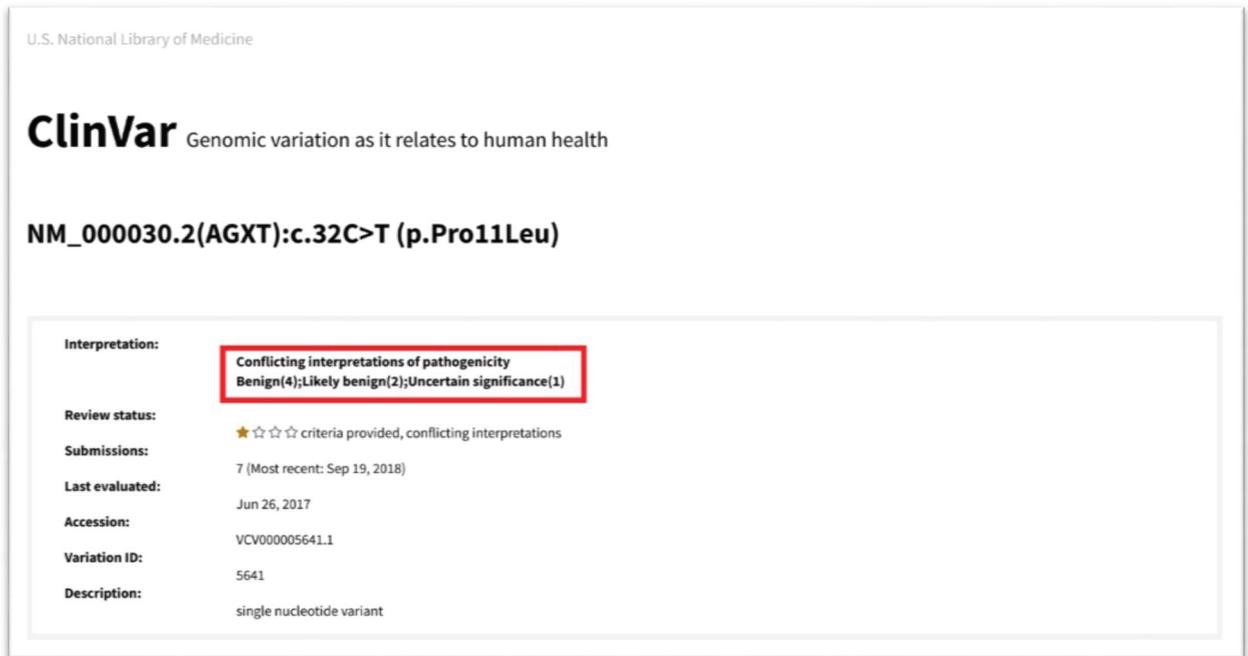
- *Le polymorphisme c.32C>T (p.Pro11Leu) :*
 - ✓ Analyse bio-informatique :

L'analyse bio-informatique de cette mutation par plusieurs logiciels de prédiction a conclu à un conflit de pathogénicité.

L'analyse par le logiciel Clinvar (**Figure 23**) montre un conflit de pathogénicité de la mutation Figure 22.

L'analyse par le logiciel Mutation T@ster (**Figure 24**) montre que la mutation est un simple polymorphisme.

Par contre l'analyse par le logiciel PolyPhen-2 (**Figure 25**) montre que la mutation est probablement pathogène.



U.S. National Library of Medicine

ClinVar

Genomic variation as it relates to human health

NM_000030.2(AGXT):c.32C>T (p.Pro11Leu)

Interpretation: Conflicting interpretations of pathogenicity
Benign(4);Likely benign(2);Uncertain significance(1)

Review status: ☆☆☆☆ criteria provided, conflicting interpretations

Submissions: 7 (Most recent: Sep 19, 2018)

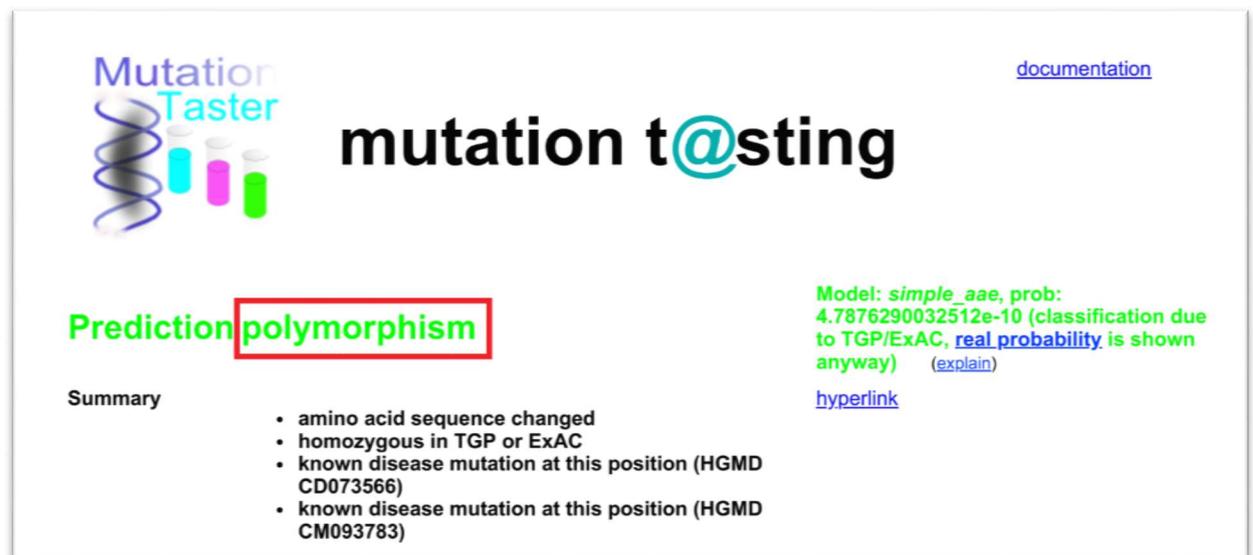
Last evaluated: Jun 26, 2017

Accession: VCV000005641.1

Variation ID: 5641

Description: single nucleotide variant

Figure 23: L'analyse par le logiciel Clinvar.



Mutation Taster

[documentation](#)

mutation t@sting

Prediction polymorphism

Model: simple_aae, prob: 4.7876290032512e-10 (classification due to TGP/ExAC, real probability is shown anyway) ([explain](#))

[hyperlink](#)

Summary

- amino acid sequence changed
- homozygous in TGP or ExAC
- known disease mutation at this position (HGMD CD073566)
- known disease mutation at this position (HGMD CM093783)

Figure 24: L'analyse par le logiciel Mutation T@ster.

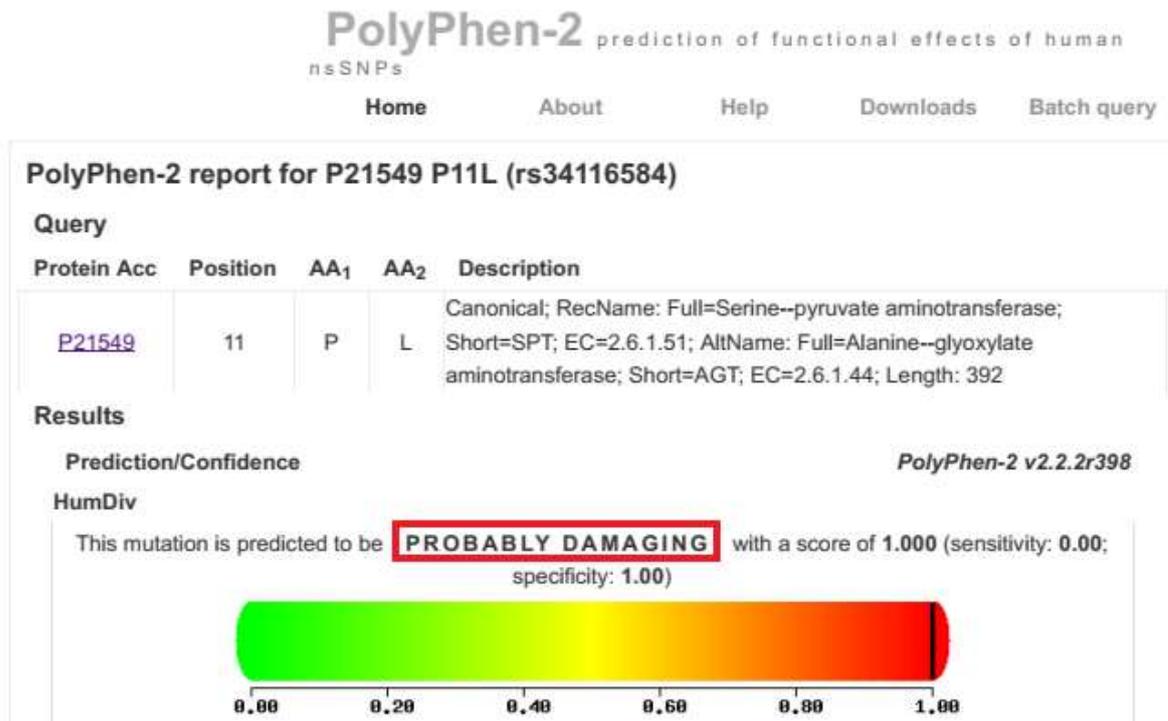


Figure 25: L'analyse par le logiciel PolyPhen-2.

✓ Les implications diagnostiques :

La prédiction que les mutations les plus fréquentes trouvées chez les patients atteints d'Hyperoxalurie Primitive type 1 (F152I, G170R et I244T) ne sont susceptibles de causer un phénotype pathologique lorsqu'elle est associée au polymorphisme P11L signifie que le diagnostic moléculaire correct de l'Hyperoxalurie Primitive type 1 ne peut pas être garanti à moins que la mutation et le polymorphisme sont identifié sur le même allèle.[9]

Conclusion:

Les objectifs principaux de ce travail, étaient de décrire le spectre mutationnel du gène AGXT chez des patients marocains atteints de l'hyperoxalurie primitive type 1 et d'estimer par des méthodes d'épidémiologie moléculaire, la prévalence de l'HOP1 dans la population marocaine. En conclusion, l'HOP1 est un désordre cliniquement et génétiquement hétérogène.

A travers ce travail nous avons montré que le séquençage de l'exon 7 du gène AGXT représente un moyen utile rentable de diagnostic et constitue une stratégie diagnostique de 1ère ligne chez les patients HOP1 Marocains.

Ce processus peut promouvoir le diagnostic de l'HOP1 dans notre pays, présentant ainsi un outil précis pour la recherche et la confirmation de la maladie chez les familles atteintes mais également un moyen de dépistage pré-symptomatique chez les personnes à risque permettant ainsi une prise en charge précoce, afin de prévenir la progression rapide vers l'insuffisance rénale.

D'autres études à grande échelle permettraient de réaliser des corrélations génotypes-phénotypes et d'adapter la prise en charge des patients selon leur profil moléculaire. En raison de l'hétérogénéité de la maladie d'HOP, il serait également intéressant d'étudier, par l'analyse ciblée NGS, l'implication d'autres gènes (GRHPR et HOGA1) dans notre population.

Ce travail est actuellement en cours, dans un cadre de notre sujet de doctorat intitulé « Analyse bio-informatique des néphropathies héréditaires chez la population marocaine », et dont le but d'identifier des gènes impliqués dans ces maladies chez la population marocaine pour un éventuel traitement et prévention de l'évolution vers une insuffisance rénale. Et la conception d'une base de données marocaine « **MGKDD** » (Moroccan genetics kidney diseases database).

- [1] M. Daudon, « [Epidemiology of nephrolithiasis in France] », *Ann Urol (Paris)*, vol. 39, n° 6, p. 209-231, déc. 2005.
- [2] F. Laziri, F. Rhazifilali, et I. Amchhoud, « Etude rétrospective de la lithiase urinaire dans l'Hôpital Hassan II de la province de Settat (Maroc) », *African Journal of Urology*, vol. 15, n° 2, janv. 2009.
- [3] V. O. Edvardsson *et al.*, « Hereditary causes of kidney stones and chronic kidney disease », *Pediatr. Nephrol.*, vol. 28, n° 10, p. 1923-1942, oct. 2013.
- [4] C. J. Danpure et P. R. Jennings, « Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I », *FEBS Letters*, vol. 201, n° 1, p. 20-34, 1986.
- [5] L. Boualla *et al.*, « AGXT Gene Mutations and Prevalence of Primary Hyperoxaluria Type 1 in Moroccan Population », *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, vol. 19, n° 11, p. 623-628, sept. 2015.
- [6] J. M. Schwarz, C. Rödelberger, M. Schuelke, et D. Seelow, « MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations », *Nature Methods*, vol. 7, n° 8, p. 575-576, août 2010.
- [7] J. M. Schwarz, D. N. Cooper, M. Schuelke, et D. Seelow, « MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age », *Nature Methods*, vol. 11, n° 4, p. 361-362, avr. 2014.
- [8] C. S. Von et G. Rumsby, « Primary hyperoxaluria type 1: a cluster of new mutations in exon 7 of the AGXT gene. », *J Med Genet*, vol. 34, n° 6, p. 489-492, juin 1997.
- [9] M. J. Lumb et C. J. Danpure, « Functional synergism between the most common polymorphism in human alanine:glyoxylate aminotransferase and four of the most common disease-causing mutations. », *J Biol Chem*, vol. 275, n° 46, p. 36415-36422, nov. 2000.
- [10] A. Santana, E. Salido, A. Torres, et L. J. Shapiro, « Primary hyperoxaluria type 1 in the Canary Islands: a conformational disease due to I244T mutation in the P11L-containing alanine:glyoxylate aminotransferase », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 100, n° 12, p. 7277-7282, juin 2003.
- [11] S. Fargue, J. Lewin, G. Rumsby, et C. J. Danpure, « Four of the most common mutations in primary hyperoxaluria type 1 unmask the cryptic mitochondrial targeting sequence of alanine:glyoxylate aminotransferase encoded by the polymorphic minor allele », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 4, p. 2475-2484, janv. 2013.
- [12] J. B. Kjersem *et al.*, « AGXT and ERCC2 polymorphisms are associated with clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with 5-FU/oxaliplatin. », *Pharmacogenomics J*, vol. 16, n° 3, p. 272-279, juin 2016.
- [13] S. Richards *et al.*, « Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. », *Genet Med*, vol. 17, n° 5, p. 405-424, mai 2015.
- [14] C. Valente *et al.*, « Exploring the relationship between lifestyles, diets and genetic adaptations in humans. », *BMC Genet*, vol. 16, p. 55-55, mai 2015.
- [15] A. David et M. J. Sternberg, « The Contribution of Missense Mutations in Core and Rim Residues of Protein-Protein Interfaces to Human Disease. », *J Mol Biol*, vol. 427, n° 17, p. 2886-2898, août 2015.
- [16] E. Cecchin *et al.*, « A prospective validation pharmacogenomic study in the adjuvant setting of colorectal cancer patients treated with the 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin (FOLFOX4) regimen. », *Pharmacogenomics J*, vol. 13, n° 5, p. 403-409, oct. 2013.
- [17] D. N. Cooper, M. Krawczak, C. Polychronakos, C. Tyler-Smith, et H. Kehrer-Sawatzki, « Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the

- molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. », *Hum Genet*, vol. 132, n° 10, p. 1077-1130, oct. 2013.
- [18] A. L. Pey, A. Albert, et E. Salido, « Protein homeostasis defects of alanine-glyoxylate aminotransferase: new therapeutic strategies in primary hyperoxaluria type I. », *Biomed Res Int*, vol. 2013, p. 687658-687658, 2013.
- [19] M. Kanai *et al.*, « Associations between glutathione S-transferase pi Ile105Val and glyoxylate aminotransferase Pro11Leu and Ile340Met polymorphisms and early-onset oxaliplatin-induced neuropathy. », *Cancer Epidemiol*, vol. 34, n° 2, p. 189-193, avr. 2010.
- [20] E. L. Williams *et al.*, « Primary hyperoxaluria type 1: update and additional mutation analysis of the AGXT gene », *Hum. Mutat.*, vol. 30, n° 6, p. 910-917, juin 2009.
- [21] E. C. Salido *et al.*, « Alanine-glyoxylate aminotransferase-deficient mice, a model for primary hyperoxaluria that responds to adenoviral gene transfer. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, n° 48, p. 18249-18254, nov. 2006.
- [22] M. B. Coulter-Mackie et G. Rumsby, « Genetic heterogeneity in primary hyperoxaluria type 1: impact on diagnosis », *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 83, n° 1, p. 38-46, sept. 2004.
- [23] P. E. Purdue, J. Allsop, G. Isaya, L. E. Rosenberg, et C. J. Danpure, « Mistargeting of peroxisomal L-alanine:glyoxylate aminotransferase to mitochondria in primary hyperoxaluria patients depends upon activation of a cryptic mitochondrial targeting sequence by a point mutation. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, n° 23, p. 10900-10904, déc. 1991.
- [24] P. E. Purdue, Y. Takada, et C. J. Danpure, « Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine/glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1. », *J Cell Biol*, vol. 111, n° 6 Pt 1, p. 2341-2351, déc. 1990.
- [25] P. E. Purdue, M. J. Lumb, J. Allsop, et C. J. Danpure, « An intronic duplication in the alanine: glyoxylate aminotransferase gene facilitates identification of mutations in compound heterozygote patients with primary hyperoxaluria type 1. », *Hum Genet*, vol. 87, n° 4, p. 394-396, août 1991.
- [26] C. J. Danpure, P. R. Jennings, P. Fryer, P. E. Purdue, et J. Allsop, « Primary hyperoxaluria type 1: genotypic and phenotypic heterogeneity. », *J Inherit Metab Dis*, vol. 17, n° 4, p. 487-499, 1994.
- [27] M. B. Coulter-Mackie, Q. Lian, et S. G. Wong, « Overexpression of human alanine:glyoxylate aminotransferase in *Escherichia coli*: renaturation from guanidine-HCl and affinity for pyridoxal phosphate co-factor. », *Protein Expr Purif*, vol. 41, n° 1, p. 18-26, mai 2005.
- [28] P. E. Purdue, M. J. Lumb, J. Allsop, Y. Minatogawa, et C. J. Danpure, « A glycine-to-glutamate substitution abolishes alanine:glyoxylate aminotransferase catalytic activity in a subset of patients with primary hyperoxaluria type 1. », *Genomics*, vol. 13, n° 1, p. 215-218, mai 1992.
- [29] J. Harambat *et al.*, « Characteristics and outcomes of children with primary oxalosis requiring renal replacement therapy », *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 7, n° 3, p. 458-465, mars 2012.
- [30] P. Cochat et G. Rumsby, « Primary hyperoxaluria », *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, n° 7, p. 649-658, août 2013.
- [31] C. S. van Woerden, J. W. Groothoff, R. J. A. Wanders, J.-C. Davin, et F. A. Wijburg, « Primary hyperoxaluria type 1 in The Netherlands: prevalence and outcome », *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 18, n° 2, p. 273-279, févr. 2003.
- [32] K. Hopp *et al.*, « Phenotype-Genotype Correlations and Estimated Carrier Frequencies of Primary Hyperoxaluria », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 26, n° 10, p. 2559-2570, oct. 2015.

- [33] A. Kamoun et R. Lakhoua, « End-stage renal disease of the Tunisian child: epidemiology, etiologies, and outcome », *Pediatr. Nephrol.*, vol. 10, n° 4, p. 479-482, août 1996.
- [34] A. A. Al-Eisa, M. Samhan, et M. Naseef, « End-stage renal disease in Kuwaiti children: an 8-year experience », *Transplant. Proc.*, vol. 36, n° 6, p. 1788-1791, août 2004.
- [35] C. Rinat, R. J. Wanders, A. Drukker, D. Halle, et Y. Frishberg, « Primary hyperoxaluria type I: a model for multiple mutations in a monogenic disease within a distinct ethnic group », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, n° 11, p. 2352-2358, nov. 1999.
- [36] K. Madani, H. Otoukesh, A. Rastegar, et S. Van Why, « Chronic renal failure in Iranian children », *Pediatr. Nephrol.*, vol. 16, n° 2, p. 140-144, févr. 2001.
- [37] M. B. Coulter-Mackie, « Preliminary evidence for ethnic differences in primary hyperoxaluria type 1 genotype », *Am. J. Nephrol.*, vol. 25, n° 3, p. 264-268, juin 2005.
- [38] Y. Frishberg *et al.*, « Intra-familial clinical heterogeneity: absence of genotype-phenotype correlation in primary hyperoxaluria type 1 in Israel », *Am. J. Nephrol.*, vol. 25, n° 3, p. 269-275, juin 2005.
- [39] G. Mandrile *et al.*, « Data from a large European study indicate that the outcome of primary hyperoxaluria type 1 correlates with the AGXT mutation type », *Kidney Int.*, vol. 86, n° 6, p. 1197-1204, déc. 2014.
- [40] B. Hoppe, B. B. Beck, et D. S. Milliner, « The primary hyperoxalurias », *Kidney Int.*, vol. 75, n° 12, p. 1264-1271, juin 2009.
- [41] P. Cochat *et al.*, « Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment », *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 27, n° 5, p. 1729-1736, mai 2012.
- [42] N. M. Rao, A. Yallapragada, K. D. Winden, J. Saver, et D. S. Liebeskind, « Stroke in primary hyperoxaluria type I », *J Neuroimaging*, vol. 24, n° 4, p. 411-413, août 2014.
- [43] K. T. Mitsimponas, T. Wehrhan, S. Falk, F. Wehrhan, F. W. Neukam, et K. A. Schlegel, « Oral findings associated with primary hyperoxaluria type I », *J Craniomaxillofac Surg*, vol. 40, n° 8, p. e301-306, déc. 2012.
- [44] S. E. Berini, J. A. Tracy, J. K. Engelstad, E. C. Lorenz, D. S. Milliner, et P. J. Dyck, « Progressive polyradiculoneuropathy due to intraneural oxalate deposition in type 1 primary hyperoxaluria », *Muscle Nerve*, vol. 51, n° 3, p. 449-454, mars 2015.
- [45] B. Behnke, M. J. Kemper, H. P. Kruse, et D. E. Müller-Wiefel, « Bone mineral density in children with primary hyperoxaluria type I », *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 16, n° 11, p. 2236-2239, nov. 2001.
- [46] R. P. Holmes et D. G. Assimos, « Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis », *J. Urol.*, vol. 160, n° 5, p. 1617-1624, nov. 1998.
- [47] C. J. Danpure, « The molecular basis of alanine: glyoxylate aminotransferase mistargeting: the most common single cause of primary hyperoxaluria type 1 », *J. Nephrol.*, vol. 11 Suppl 1, p. 8-12, avr. 1998.
- [48] M. B. Coulter-Mackie, Q. Lian, D. A. Applegarth, J. Toone, P. J. Waters, et H. Vallance, « Mutation-based diagnostic testing for primary hyperoxaluria type 1: survey of results », *Clin. Biochem.*, vol. 41, n° 7-8, p. 598-602, mai 2008.
- [49] P. K. Nogueira *et al.*, « Partial deletion of the AGXT gene (EX1_EX7del): A new genotype in hyperoxaluria type 1 », *Hum. Mutat.*, vol. 15, n° 4, p. 384-385, avr. 2000.
- [50] M. B. Coulter-Mackie, G. Rumsby, D. A. Applegarth, et J. R. Toone, « Three novel deletions in the alanine:glyoxylate aminotransferase gene of three patients with type 1 hyperoxaluria », *Mol. Genet. Metab.*, vol. 74, n° 3, p. 314-321, nov. 2001.
- [51] M. B. Coulter-Mackie, Q. Lian, D. Applegarth, et J. Toone, « The major allele of the alanine:glyoxylate aminotransferase gene: nine novel mutations and polymorphisms associated with primary hyperoxaluria type 1 », *Mol. Genet. Metab.*, vol. 86, n° 1-2, p. 172-178, oct. 2005.

- [52] C. G. Monico *et al.*, « Comprehensive mutation screening in 55 probands with type 1 primary hyperoxaluria shows feasibility of a gene-based diagnosis », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, n° 6, p. 1905-1914, juin 2007.
- [53] R. Tammachote *et al.*, « Primary hyperoxaluria type 1 and brachydactyly mental retardation syndrome caused by a novel mutation in AGXT and a terminal deletion of chromosome 2 », *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 158A, n° 9, p. 2124-2130, sept. 2012.
- [54] S. D. Cramer, P. M. Ferree, K. Lin, D. S. Milliner, et R. P. Holmes, « The Gene Encoding Hydroxypyruvate Reductase (GRHPR) is Mutated in Patients with Primary Hyperoxaluria Type II », *Hum Mol Genet*, vol. 8, n° 11, p. 2063-2069, oct. 1999.
- [55] R. Belostotsky, J. J. Pitt, et Y. Frishberg, « Primary hyperoxaluria type III--a model for studying perturbations in glyoxylate metabolism », *J. Mol. Med.*, vol. 90, n° 12, p. 1497-1504, déc. 2012.
- [56] D. S. Milliner, « The Primary Hyperoxalurias: An Algorithm for Diagnosis », *AJN*, vol. 25, n° 2, p. 154-160, 2005.
- [57] R. P. Holmes et M. Kennedy, « Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake », *Kidney Int.*, vol. 57, n° 4, p. 1662-1667, avr. 2000.
- [58] R. D. Monk et D. A. Bushinsky, « CHAPTER 57 - Nephrolithiasis and Nephrocalcinosis », in *Comprehensive Clinical Nephrology (Fourth Edition)*, J. Floege, R. J. Johnson, et J. Feehally, Éd. Philadelphia: Mosby, 2010, p. 687-701.
- [59] D. S. Milliner, « Stones, bones, and heredity », *Acta Paediatr Suppl*, vol. 95, n° 452, p. 27-30, juill. 2006.
- [60] C. G. Monico et D. S. Milliner, « Genetic determinants of urolithiasis », *Nat Rev Nephrol*, vol. 8, n° 3, p. 151-162, déc. 2011.
- [61] M. Petrarulo, C. Vitale, P. Facchini, et M. Marangella, « Biochemical approach to diagnosis and differentiation of primary hyperoxalurias: an update », *J. Nephrol.*, vol. 11 Suppl 1, p. 23-28, avr. 1998.
- [62] S. Mashour, J. F. Turner, et R. Merrell, « Acute renal failure, oxalosis, and vitamin C supplementation: a case report and review of the literature », *Chest*, vol. 118, n° 2, p. 561-563, août 2000.
- [63] C. J. Danpure, P. R. Jennings, R. J. Penketh, P. J. Wise, P. J. Cooper, et C. H. Rodeck, « Fetal liver alanine: glyoxylate aminotransferase and the prenatal diagnosis of primary hyperoxaluria type 1 », *Prenat. Diagn.*, vol. 9, n° 4, p. 271-281, avr. 1989.
- [64] F. Chevalier-Porst, M.-O. Rolland, P. Cochat, et D. Bozon, « Maternal isodisomy of the telomeric end of chromosome 2 is responsible for a case of primary hyperoxaluria type 1 », *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 132A, n° 1, p. 80-83, janv. 2005.
- [65] S. Fargue *et al.*, « Effect of conservative treatment on the renal outcome of children with primary hyperoxaluria type 1 », *Kidney Int.*, vol. 76, n° 7, p. 767-773, oct. 2009.
- [66] H. Hoyer-Kuhn *et al.*, « Vitamin B6 in primary hyperoxaluria I: first prospective trial after 40 years of practice », *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 9, n° 3, p. 468-477, mars 2014.
- [67] P. Cochat, P. C. Koch Nogueira, M. A. Mahmoud, N. V. Jamieson, J. I. Scheinman, et M. O. Rolland, « Primary hyperoxaluria in infants: medical, ethical, and economic issues », *J. Pediatr.*, vol. 135, n° 6, p. 746-750, déc. 1999.
- [68] A. IRAQI *et al.*, « L'oxalose: à propos d'un cas familial », *Revue marocaine de médecine et santé*, vol. 6, n° 1-2, p. 69-72, 1984.
- [69] A. Kamoun, F. M. Ben, H. M. Ben, et R. Lakhoua, « [Infantile forms of primary hyperoxaluria type I: apropos of 4 cases]. », *Arch Pediatr*, vol. 3, n° 10, p. 997-1000, oct. 1996.
- [70] J. Chemli *et al.*, « [Primary hyperoxaluria in children in central Tunisia] », *Tunis Med*, vol. 85, n° 6, p. 513-518, juin 2007.

- [71] F. Barbey, F. Cachat, Q. V. Nguyen, S. Rotman, M. Burnier, et M. Daudon, « [Massive hyperoxaluria]. », *Rev Med Suisse Romande*, vol. 124, n° 8, p. 477-482, août 2004.
- [72] P. Cochat, A. Deloraine, M. Rotily, F. Olive, I. Liponski, et N. Deries, « Epidemiology of primary hyperoxaluria type 1 », *Nephrol Dial Transplant*, vol. 10, n° supp8, p. 3-7, janv. 1995.
- [73] P. Cochat, A. Liutkus, S. Fargue, O. Basmaison, B. Ranchin, et M.-O. Rolland, « Primary hyperoxaluria type 1: still challenging! », *Pediatr. Nephrol.*, vol. 21, n° 8, p. 1075-1081, août 2006.
- [74] R. Belhaj *et al.*, « Diagnostic biochimique et moléculaire de l'hyperoxalurie primaire de type 1 : étude tunisienne à propos de 15 cas », </data/revues/03698114/v59i4/S0369811409001205/>, août 2011.
- [75] D. Pirulli, M. Marangella, et A. Amoroso, « Primary hyperoxaluria: genotype-phenotype correlation », *J. Nephrol.*, vol. 16, n° 2, p. 297-309, avr. 2003.
- [76] M.-F. Gagnadoux, « Lithiase urinaire de l'enfant », *EMC - Pédiatrie*, vol. 1, n° 1, p. 51-58, févr. 2004.
- [77] A. Kamoun, A. Hammou, S. Chaouachi, I. Bellagha, et R. Lakhoua, « Les signes radiologiques de l'hyperoxalurie primaire de type I », in *Annales de radiologie*, 1995, vol. 38, p. 440-446.
- [78] M. Daudon, P. Jungers, et D. Bazin, « Peculiar Morphology of Stones in Primary Hyperoxaluria », *New England Journal of Medicine*, vol. 359, n° 1, p. 100-102, juill. 2008.
- [79] P. Cochat et O. Basmaison, « Current approaches to the management of primary hyperoxaluria », *Archives of Disease in Childhood*, vol. 82, n° 6, p. 470-473, juin 2000.

ANNEXE 1: Séquence du gène *AGXT*

Transcript: AGXT-001: ENST00000307503.3

Exons/ Introns Translated sequence Flanking sequence Intron sequence UTR

Variants 3 prime UTR 5 prime UTR Coding sequence Frameshift Inframe deletion Inframe insertion Missense

Splice acceptor Splice donor Splice region Start lost Stop gained Synonymous

Markup loaded

No.	Exon / Intron	Séquence
	5' upstream sequencetgctttgcaagcagcagcagggttgagttggtgcaacatagaccacagg
1	ENSE00001843474	GCCTGCCAAGCCTCAATTATCTGTGCTCCGACCCTTAAAGAAACAATTCTCTCACCCCTG AGCTAAGCAGAAATAAGAGGGGCTGGACGTGCAAGGACTCAGAGTGGGAGCGAGGAGGGCTG GGGTGAGGACAGCTTTGTACACTCTGTTTTCTGTCACTCAGCCCTGGGGGCTCCCTCT GCCTGAGGGCTTCGTCCTCTGTGCTGGCCGTGACCCGAGCAAAAGCACAGATAAGCC TCAGGGAACAAAAGGCAGGGCTGCCACGAAGCCCATCCACCAATCTCACCTCTCACCT CTGTGTCGGCCCTGTGGGAAATATTCCAGGCTTTGGCCAAAGCCAGTGCAGCCGAGGT TCCGAGCGGACAGGTGGGTTCGGACCAATGGCCTCTACAAGCTGCTGTGACCCCC AAGGCCCTGTCTAAGCCCTCTCCATCCCAACCAGTCCGTGGGCTGTGGCTCTCC AACCTGCTCTCGCATCATGGCAGCCGGGGGCTCAGATGATCGGGTCCATGAGCAAG GATATGTACCAG
	<u>Intron 1-2</u>	gtaggagtgggggtcactcgggggg.....ctcaccctataaccacccgatgcag
2	ENSE00003541379	ATCATGGAAGAGATCAAGGAAGGCATCCAGTACGTGTTCCAGACCAGGAACCACTCAACA CTGCTCATCTCTGGCTCGGACACTGTGCCTGGAGGCGCCCTGGTCAATGTGCTGGAG CTGGGACTCCTTCTGGTGGGCCAATGGCATTGGGGCAGCGAGCCGTGGACATC GGCGAGCGCATAAG
	<u>Intron 2-3</u>	gtaagggagaggcccaggtggggat.....acggcccactctgtcctgcacccag
3	ENSE00003673802	GAGCCGAGTGCACCCGATGACCAAGGACCCTGGAGGCCACTACACACTGCAGGAGGTGG AGGAG
	<u>Intron 3-4</u>	gtaggggacccgggtgggggtcag.....cccacagccgtcctgtctctcag
4	ENSE00003491602	GGCCTGCCCAAGCACAAGCCAATGCTGCTGTTCTTAAACCCAGGGGAGTGTCCACGGGC GTGCTGAGCCCTTGATGCTTCCGGGAACCTCTGCCACAG
	<u>Intron 4-5</u>	gtgagcctgcccagggcgggtgga.....tcattctgtccccacctctccag
5	ENSE00003589786	GTACAAGTGCCTGCTCCTGGTGATTGCGTGGCATCCCCTGGGCGGACCCCTTTACAT GGAACCGCAAG
	<u>Intron 5-6</u>	gtaaggggtgggctctgagagcccta.....tcccagcaaaccccatctacag
6	ENSE00001162333	GCATCGACATCCGTGACTCGGGCTCCCAAGAGCCCTGAACGCCCTCCAGGGACCTCGC TCATCTCTTTCAGTGACAAGCCAA
	<u>Intron 6-7</u>	gtgagtgaccacagaccctcacct.....gctcagcctgcttctttctccccag

7	<u>ENSE00003547937</u>	AAAGAAGATGTA CTCCCGCAAGACGAAGCCCTTCTCTCTTACCTGGACATCAAGTGGCT GGCAACTTCTGGGGCTGTGACCGACCAGCCAGGAT
	<u>Intron 7-8</u>	gtgaggcctggcagggatggaagg.....gaccaagccccctcgtgttccag
8	<u>ENSE00001162322</u>	GTACCATCACACATCCCGTCATCAGCCTGTACAGCCTGAGAGAGAGCCTGGCCTCAT TCCGGAAACAG
	<u>Intron 8-9</u>	gtgcatgggctgcactccacaggag.....cccaccagcggcatctcccacacag
9	<u>ENSE00001162318</u>	GGCTGAGAACAGCTGGCCAGCAACCGAGGCCGCGCGCTATCTGCATGGGGCCTG CAGCACTGGGGCTCAGCTCTTCGTGAAGGACCCG
	<u>Intron 9-10</u>	gtaaggaggcccctggcattgggca.....gactgagccaggcccctcctgcag
10	<u>ENSE00003606836</u>	CCCTCCGCTTCCACAATCACCACCTGGCTGTACCCTGGCTATGACTGGAGAGAC ATCGTCAGCTACGTATAGACCACTTCGACATTGAGATCATGGTGGCCTGGGCCTCC ACGGGAAG
	<u>Intron 10-11</u>	gtgagagggagcgccctcgagggcct.....cgtcagcccgcctgtgccccccag
11	<u>ENSE00001895938</u>	GTGCTGCGGATCGCCTGCTGGGCTGCAATGCCACCCGGGAGAATGTGGACCGCGTGACG GAGGCCCTGAGGGCGGCCCTGCAAGCACTGCCCAAGAAGAAGCTGTGACCTGCCACTGG CACACGCTGGCACTGGCACACCACTGTCCATGCCACCTGAGGGATCAGGAGCAAAC AGACCTGCAAGGTCTCCAGCCCTGGGGACAGGAAAGCCACTGACCCAGCCGGGAGGC AGAACCAGGCAGCCTCCCTGGCCCAAGCAGCCCTTTTCCCTCCAGTGGCACCTCCTGGA AACAGTCCACTTGGGCGCAAACCCAGTGCCTTCCAAATGAGCTGCAGTCCCAGGCCAT GAGCCTCCCGGAATGTTTATAAAGGGCCTGCCAATCTCTCCTCAC
	<u>3' downstream sequence</u>	tgtgtgggtggtctgtgaaagagtgagaggagcatctctgctccctg.....

ANNEXE 2:



HYPEROXALURIE PRIMITIVE TYPE 1

Fiche de renseignement à joindre à tout prélèvement sanguin pour étude génétique

NOM :

PRENOM :

Sexe : F M

Date de naissance :

Lieu de naissance :

➤ **Antécédents familiaux**

Consanguinité : Oui Non Inconnu

Pays d'origine du père :

Pays d'origine de la mère :

Nombre total d'enfants (atteints et non atteints) dans la famille :

Parents avec Hyperoxalurie Primitive (joindre l'arbre généalogique s'il vous plaît)

➤ **Diagnostic**

Date ou âge aux premiers symptômes :

Signe cliniques :

- Douleur lombaire Colique néphrétique Hématurie macroscopique Infection urinaire
 Emission d'un calcul Découverte fortuite Autres:

Altération de la fonction rénale :

- Anémie Retard statural Acidose métabolique
 Augmentation de créatininémie.

➤ **Atteintes extrarénales**

Oculaire : Oui Non Inconnu

Si oui :

- Atrophie optique Rétinopathie Néo-vascularisation choroïdienne
 Déficience visuelle légère
 Autres:

Cardio-Vasculaire : Oui Non Inconnu

Si oui :

- Bloc cardiaque Insuffisance vasculaire périphérique Spasme artériel
 Occlusion artérielle Phénomène Raynaud La claudication intermittente
 Gangrène
 Autres:

Neurologique : Oui Non Inconnu

Si oui :

- Neuropathie périphérique
 Autres:

Squelettique : Oui Non Inconnu

Si oui :

Fiche de renseignements cliniques HOP1

Page 1

ANNEXE 3:

موافقة مريض بعد التوعية من اجل الدراسة الجينات
لمرض ...

..... الاسم الشخصي

..... الاسم العائلي

إقرار المريض

أقر أنا الموقع أدناه موافقتي الإرادية على المشاركة
من اجل دراسة الجينات لمرض ...

حرر في: بتاريخ

التوقيع:

إقرار الطبيب

أقر أنا الطبيب بأنني شرحت بالقدر الوافي للمريض طبيعة هذه الدراسة والهدف منها
وانه وافق بمحض إرادته.

..... حرر في: بتاريخ

Résumé :

Au cours des dernières années, les avancées dans la recherche génétique ont été considérables notamment, en ce qui nous concerne, dans le domaine de la néphrologie.

La néphrogénétique est une discipline qui s'intéresse à l'étude et à l'identification des gènes impliqués dans le développement d'une maladie rénale ou néphropathie. C'est une approche physiopathologique qui permet l'analyse des gènes défectueux, et la caractérisation des protéines correspondantes, conduisant à l'étude de leur fonction. Cette connaissance doit permettre, à court ou moyen terme, le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. En effet, une consultation de génétique médicale est indiquée devant la suspicion d'une composante héréditaire dans l'apparition d'une néphropathie.

Les néphropathies héréditaires ou maladies génétiques rénales représentent un motif de consultation de plus en plus fréquent en néphrologie adulte et infantile au Maroc. Elles représentent une cause importante d'insuffisance rénale terminale : environ 50 % des enfants et un peu plus de 15 % des patients adultes nécessitant la dialyse et/ou la transplantation rénale ont une néphropathie héréditaire comme cause sous-jacente de cette insuffisance rénale terminale.

Les néphropathies héréditaires peuvent affecter virtuellement toutes les parties du néphron ou du rein soit sous la forme d'anomalies rénales primitives, soit sous la forme d'une atteinte rénale compliquant une affection plus généralisée comme c'est le cas en particulier au cours des maladies métaboliques. Quoique certaines de ces maladies héréditaires se présentent et peuvent conduire au décès tôt au cours de l'enfance, certaines affections héréditaires se présentent seulement au cours de l'adolescence ou de la vie adulte si bien que la connaissance de ces maladies héréditaires est importante également pour le médecin d'adultes.

La compréhension des maladies héréditaires du rein a fait des progrès considérables au cours des dernières années grâce aux percées de la génétique qui a permis d'identifier l'anomalie moléculaire génétique et la physiopathologie d'un grand nombre de ces maladies.

L'objectif de notre travail est la mise au point de l'étude moléculaire au sein du laboratoire de génétique médicale du CHU Hassan II Fès pour les différents gènes en causes des principales néphropathies héréditaires.

Abstract

In recent years, advances in genetic research have been considerable, particularly for us in the field of nephrology.

Nephrogenetics is a discipline that focuses on the study and identification of genes involved in the development of kidney disease or nephropathy. It is a pathophysiological approach that allows the analysis of defective genes, and the characterization of corresponding proteins, leading to the study of their function. This knowledge should allow, in the short or medium term, the development of new therapeutic molecules. Indeed, a consultation of medical genetics is indicated in front of the suspicion of a hereditary component in the appearance of a nephropathy.

Hereditary nephropathies or renal genetic diseases are an increasingly common reason for consultation in adult and infantile nephrology in Morocco. They represent an important cause of end-stage renal failure: approximately 50% of children and just over 15% of adult patients requiring dialysis and / or renal transplantation have hereditary nephropathy as the underlying cause of this end-stage renal failure.

Hereditary nephropathies can affect virtually all parts of the nephron or kidney either as primary renal abnormalities or as renal involvement complicating a more generalized condition, as is particularly the case in diseases metabolic. Although some of these hereditary diseases present themselves and may lead to death early in childhood, some hereditary conditions occur only during adolescence or adulthood, so knowledge of these hereditary diseases is important as well. for the adult doctor.

The understanding of hereditary kidney disease has made considerable progress in recent years through genetic breakthroughs that have identified the genetic molecular abnormality and pathophysiology of many of these diseases.

The objective of our work is the development of the molecular study in the medical genetics laboratory of Hassan II Fez University Hospital for the different genes involved in the main hereditary nephropathies.

خلاصة:

في السنوات الأخيرة، كانت التطورات في مجال البحوث الوراثية كبيرة، خاصة بالنسبة لنا في مجال أمراض الكلى.

علم الأمراض الوراثية للكلى هو تخصص يركز على دراسة وتحديد الجينات المرتبطة بتطور أمراض الكلى أو اعتلال الكلية. إنه نهج فسيولوجي يسمح بتحليل الجينات المعيبة، وتوصيف البروتينات المقابلة، مما يؤدي إلى دراسة وظيفتها. يجب أن تسمح هذه المعرفة، على المدى القصير أو المتوسط، بتطوير جزيئات علاجية جديدة. في الواقع، يشار إلى استشارة الوراثة الطبية أمام الشبهة بمكون وراثي في ظهور اعتلال الكلية.

تعد أمراض الكلى الوراثية أو الأمراض الوراثية الكلوية سببًا شائعًا بشكل متزايد للتشاور في أمراض الكلى عند البالغين والأطفال في المغرب. إنها تمثل أحد الأسباب المهمة لفشل كلوي في نهاية المرحلة: حوالي 50٪ من الأطفال وما يزيد قليلاً عن 15٪ من المرضى البالغين الذين يحتاجون إلى غسيل الكلى و / أو زرع الكلى لديهم اعتلال الكلية الوراثي باعتباره السبب الكامن وراء هذا الفشل الكلوي في نهاية المرحلة.

يمكن لأمراض الكلى الوراثية أن تؤثر فعليًا على جميع أجزاء النيفرون أو الكليتين إما على أنها تشوهات كلوية أولية أو كمشاركة كلوية تعقد حالة أكثر عمومية، كما هو الحال بشكل خاص في الأمراض الأيضية. على الرغم من أن بعض هذه الأمراض الوراثية تظهر وقد تؤدي إلى الوفاة مبكرًا في مرحلة الطفولة، إلا أن بعض الحالات الوراثية لا تحدث إلا خلال فترة المراهقة أو البلوغ، لذا فإن معرفة هذه الأمراض الوراثية مهمة أيضًا للطبيب الكبار.

أحرز فهم مرض الكلى الوراثي تقدماً ملحوظاً في السنوات الأخيرة من خلال اختراقات وراثية حددت خللاً جزيئياً وراثياً في كثير من هذه الأمراض.

الهدف من عملنا هو تطوير الدراسة الجزيئية في مختبر الوراثة الطبية بمستشفى جامعة الحسن الثاني بفاس لمختلف الجينات المشاركة في أمراض الكلى الوراثية الرئيسية.