

Les mucopolysaccharidoses : Profils mutationnels des patients en Tunisie

Chkioua L.^(1,2) ; Khedhiri S.⁽¹⁾ ; Jeballi I.⁽²⁾ ; Ben Turkia H.⁽³⁾ ; Ouesleti S.⁽¹⁾ ;
Ferchichi S.⁽¹⁾ ; Miled A.⁽¹⁾ ; Tebib N.⁽³⁾ ; Laradi S.⁽⁴⁾

1)- Laboratoire de Biochimie, Hôpital F. Hached, 4000 Sousse, Tunisie.

2)- Unité de recherche : Biologie et anthropologie moléculaires appliquées au développement et à la santé (UR12ES11), Faculté de pharmacie ; Université de Monastir, 5000 Monastir, Tunisie.

3)- Laboratoire de pédiatrie, Hôpital Rabta, 1007 Tunis, Tunisie

4)- La Direction régionale Auvergne-Loire de la nationale française du système du sang EFS / GIMAP-EA 3064, 42100 Saint Étienne, France.

Résumé

Nous avons réalisé une analyse moléculaire de 73 patients tunisiens atteints des mucopolysaccharidoses (MPS) avec : MPS I (n = 43), MPS II (n = 5), MPS IIIA (n = 7), MPS IIIB (n = 3), MPS IIIC (n = 2), et MPS IVA (n = 13). La présente étude a révélé une nouvelle mutation de site d'épissage chez un patient MPS I, une nouvelle mutation faux sens chez un patient MPSIVA en plus des 11 mutations précédemment rapportées pour la première fois par notre équipe de recherche : trois dans le gène IDUA (MPS I) ; quatre dans le gène SGSH (MPS IIIA) ; deux dans le gène NAGLU (MPS IIIB) ; deux dans le gène HGSNAT (MPS IIIC), et deux dans le gène GALNS. Ces données ont démontré l'hétérogénéité mutationnelle remarquable caractérisant tous les types de MPS testés, bien un taux élevé de consanguinité dans la population tunisienne.

Mots clés : Mucopolysaccharidoses, analyse génétique, mutations, patients tunisiens, diagnostic

The present study revealed one novel splice site mutation in one MPSI patient, in addition to the 11 previously Tunisian mutations reported for the first time by our research team : three in the IDUA gene (MPS I) including two missenses, one nonsense ; four in the SGSH gene (MPS IIIA) including a mutation involving the start codon, one small duplication, one small deletion and a large deletion of exons 1 to 5 ; two in the NAGLU gene (MPS IIIB) including one missense mutation and one nonsense mutation ; two in the HGSNAT gene (MPS IIIC) including one missense and one nonsense mutation, two in the GALNS gene including one missense and one splicing mutation.

These data demonstrate the remarkable mutational heterogeneity characterizing all types of MPS tested, although high consanguinity rate in the Tunisian population.

Key words : Lysosomal storage diseases, Mucopolysaccharidoses, Glycosaminoglycan, Genes, Mutations, Genetic counseling.

Abstract

Mucopolysaccharidoses : mutational profile of patients in Tunisia

Mutation screening was performed for a total of 72 MPS Tunisian patients with MPS I (n = 43), MPS II (n = 5), MPS IIIA (n = 7), MPS IIIB (n = 3), MPS IIIC (n = 2), or MPS IVA (n = 12). The methodological approaches included genomic PCR sequencing, RT-PCR for MPS IVA and tetra-primer ARMS PCR assay for MPSI.

Introduction

Les mucopolysaccharidoses (MPS) sont des maladies héréditaires du métabolisme. Ces pathologies sont dues à une anomalie génétique responsable d'une accumulation de glycosaminoglycannes (GAG), anciennement appelées mucopolysaccharides. La prévalence globale de toutes les MPS en Tunisie est de 2.3/100.000 naissances vivantes. Les patients atteints de MPS présentent des signes cliniques variables : nanisme, traits du visage grossiers, organomégalie, affection squelettique et articulaire, atteinte cardiaque, et défi-

Tirés à part : Dr Chkioua Latifa, Laboratoire de Biochimie, Hôpital F. Hached, 4000 Sousse, Tunisie.

Unité de recherche : Biologie et anthropologie moléculaires appliquées au développement et à la santé (UR12ES11), Faculté de pharmacie ; Université de Monastir, 5000 Monastir, Tunisie.

science visuelle. Le retard mental est présent dans les formes les plus sévères de la MPS de type I et II [1].

Les MPS sont transmises sur le mode autosomique récessif, à l'exception de la maladie de Hunter (MPS II) transmise sur le mode récessif lié au chromosome X. On en distingue sept types cliniques qui correspondent à 11 déficits enzymatiques différents.

L'exploration biologique des MPS, comprenant une analyse quantitative et qualitative des GAG, nous permet d'orienter le diagnostic de la pathologie mais le diagnostic définitif nécessite un dosage enzymatique dans les leucocytes. Néanmoins la valeur de l'activité enzymatique ne permet pas de distinguer les formes sévères des formes modérées ce qui demande une analyse génétique.

Dans cette étude nous avons effectué la caractérisation moléculaire de 73 patients tunisiens atteints de MPS. Dans l'ensemble, différentes mutations ont été identifiées. Parmi ces lésions génétiques, la mutation p.P533R concerne 62,5 % de l'ensemble des allèles testés dans notre étude. Un possible effet fondateur peut être évoqué ici.

Les MPS représentent en Tunisie un problème de santé publique du fait de l'absence d'un traitement efficace disponible, ni la greffe de moelle osseuse ni l'enzymothérapie substitutive ne règlent les problèmes neurologiques de la maladie. Les patients sont généralement hospitalisés pour leurs hernies ombilicales et pour leurs déformations squelettiques.

Au terme de notre travail, nous insistons sur l'intérêt primordial du diagnostic précoce de la maladie par l'étude des GAGs urinaires qui doit être pratiquée devant un syndrome dysmorphique ou même un retard statural inexpliqué, d'une prise en charge multidisciplinaire avec une coopération entre les services spécialisés pour assurer à ces enfants une meilleure survie et d'encourager la pratique de diagnostic anténatal de cette maladie dans les familles à risque afin d'éviter la récurrence de cette maladie handicapante.

Patients et méthodes

Les patients

Des échantillons de sang périphérique et d'urine de 73 patients atteints de MPS ont été adressés au laboratoire de biochimie, Hôpital Farhat Hached (Sousse, Tunisie) pour une exploration biochimique (quantification et électrophorèse des GAGs urinaires) et une investigation moléculaire pour les types de MPS suivants : MPS I (n = 43), MPS II (n = 5), MPS IIIA (n = 7), MPS IIIB (n = 3), MPS IIIC (n = 2) et MPS IVA (n = 13). Tous les patients étudiés sont issus de mariage consanguin.

Toutes les procédures étaient conformes aux normes éthiques de la commission compétente sur l'expérimentation humaine (institutionnelle et nationale) et à la Déclaration d'Helsinki de 1975, telle que révisée en 2000 et approuvée par les comités d'éthique des hôpitaux tunisiens respectifs. Le consentement de tous les patients et leurs familles a été obtenu avant inclusion dans l'étude.

Diagnostic biochimique :

Après une suspicion clinique et para-clinique, le diagnostic de ces maladies a été basé sur l'approche suivante :

1 Analyse quantitative et qualitative des GAGs urinaires

Les GAGs urinaires ont été quantifiés en utilisant le test DMB (diméthylméthylène bleu) [2].

La quantité de DMB lié aux glycosaminoglycannes sulfatés a été mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 656 nm. Une électrophorèse sur une plaque d'acétate de cellulose a été réalisée afin d'identifier quel type de GAGs est présent en excès (par exemple, le dermatane sulfate (DS), l'héparane sulfate (HS) et le kératane sulfate (KS)).

2 Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'alpha-L-iduronidase (MPS I, CE 3.2.1.76) a été déterminée dans les leucocytes en utilisant la phényl-alpha-L-iduronide comme substrat artificiel, dans le laboratoire de biochimie de Sousse-Tunisie, alors que les dosages de l'activité enzymatique de l'iduronate-2-sulfatase (MPS II ; EC 3.1.6.13), de l'héparane-N-sulfatase (MPS IIIA ; CE 10.1.1), de N-acétyl-alpha-glucosaminidase (MPSIIIB ; CE 3.2.1.50), alpha-glucosaminide-N acétyltransférase (MPS IIIC, CE 2.3.1.78) et de N-acétylgalactosamine-6-sulfatase (MPS IVA ; CE 3.1.6.4) ont été effectués en utilisant un substrat fluorimétrique, dans le laboratoire des maladies héréditaires des métabolismes à Lyon-France.

3 Analyse moléculaire de l'ADN

L'ADN génomique a été isolé à partir du sang veineux par la technique au phénol / chloroforme, selon des protocoles standards comme précédemment décrit [3]. Tous les exons et les jonctions flanquantes introns / exons des gènes IDUA, IDS, SGSH, NAGLU, HGS-NAT et GALNS ont été amplifiés et séquencés.

Résultats

Analyse biologique des MPS

L'électrophorèse des GAGs urinaires sur une plaque d'acétate de cellulose a montré par comparaison à un

témoin normal, la présence de deux bandes correspondantes au DS et HS chez les patients MPS I et MPS II et la présence de la bande de l'HS chez les patients MPS III (Figure 1).

Analyse moléculaire

Gène IDUA

Un total de 8 mutations différentes a été détecté chez 43 patients atteints de la MPS I (Tableau I).

La nouvelle altération génétique est une mutation du site d'épissage au site donneur d'intron 11 (c.1650 + 1G > A), cette mutation a été identifiée au niveau du gène IDUA à l'état homozygote chez trois patients qui ont développé la forme sévère de la MPS I. Cette mutation de site d'épissage pourrait provoquer l'activation d'un site cryptique d'épissage alternatif ; une étude fonctionnelle de cette mutation sera nécessaire afin de mettre en évidence cette hypothèse.

Tableau I : Les mutations identifiées chez 73 patients atteints des MPS

Type de MPS	Gène	Nombre de patients	Allèle 1	Allèle 2	Références
MPS IH (n = 39)	IDUA	4	c.1805delT ; p.F602X	c.1805delT ; p.F602X	[10]
		21	c.1598C>G ; p.P533R	c.1598C>G ; p.P533R	[10, 11]
		6	1882C>T ; p.R628X	1882C>T ; p.R628X	[12]
		1	1882C>T ; p.R628X	Non identifié	[13]
		2	c.1743C>G ; p.Y581X	p.Y581X	[14]
		1	c.1587_1588insgGC ; p.L530AfsX31	c.1587_1588insgGC ; p.L530AfsX31	[15]
		1	c.530T>C ; p.F177S	c.530T>C ; p.F177S	[15]
		3	c.1650+1G>A ; IVS11+1G>A	c.1650+1G>A ; IVS11+1G>A	Cette étude
MPS IH/S (n = 2)	IDUA	2	c.1598C>G ; p.P533R	c.1598C>G ; p.P533R	[16]
MPS IS (n = 2)		2	c.1598C>G ; p.P533R	c.1734T>C ; p.L578Q	[14]
MPS II (n = 5)	IDS	4	c.262C>T ; p.R88P	c.262C>T ; p.R88P	[5]
		1	c.281G>A ; p.G94D	c.281G>A ; p.G94D	[17]
		1	p.M1 ?	p.M1 ?	[18]
		1	c.1129C>T ; p.R377C	g.75802301_75809393del7093	[18]
MPS IIIA (n = 7)	SGSH	1	c.1093C>T ; p.Q365X	c.1093C>T ; p.Q365X	[18]
		1	c.29dup ; p.L11AfsX22	c.29dup ; p.L11AfsX22	[18]
		1	c.197C>G ; p.S66W	c.197C>G ; p.S66W	[18]
		1	c.1080del ; p.V361S fsX52	c.1080del ; p.V361S fsX52	[18]
		1	g.75802301_75809393del7093	g.75802301_75809393del7093	[18]
		1	c.1674C>G ; p.Y558X	c.1674C>G ; p.Y558X	[18]
MPS IIIB (n = 3)	NAGLU	2	c.1811C>T ; p.P604L	c.1674C>G ; p.Y558X	[18]
MPS IIIC (n = 2)		2	c.1209G>A ; p.W403X	c.1879G>T ; p.W627C	[18]
MPS IVA (n = 12)	GALNS	1	c.287G>C ; p.G66R	c.287G>C ; p.G66R	[6]
		7	c.120+1G>A ; IVS1+1G>A	c.120+1G>A ; IVS1+1G>A	[19]
		1	c.341C>T ; p.A85T	c.341C>T ; p.A85T	[19]
		1	c.1156C>T ; p.R386C	c.1156C>T ; p.R386C	[20]
		1	c.421T>A ; p.W141R	c.421T>A ; p.W141R	[20]
		1	c.1168 delc ; p.L390X	c.1168 delc ; p.L390X	[20]

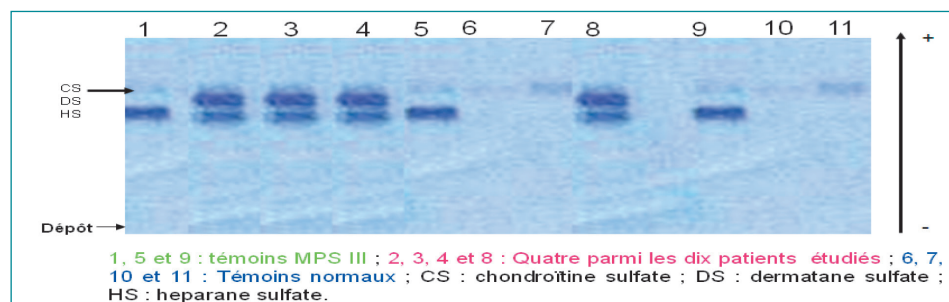


Figure 1 : Profil d'électrophorèse sur une plaque d'acétate de cellulose des GAGs urinaires. 1, 5 et 9 : patients MPS III ; 2, 3, 4 et 8 : patients MPS I ou MPS II ; 6, 7, 10 et 11 : Témoins normaux ; CS : chondroïtine sulfate ; DS : dermatane sulfate ; HS : heparane sulfate.

Nous avons également identifié onze SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (dbSNP ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), au niveau du gène IDUA (Tableau II). Parmi ces polymorphismes, sept étaient dans les exons du gène IDUA, et ont été utilisés pour l'analyse de liaison des haplotypes chez les patients MPS I. Pour la mutation p.P533R, le même polymorphisme associé a été partagé par tous les membres de la famille touchée. Pour les mutations p.F602X p.L530AfsX31, le même haplotype décrit précédemment était identique pour tous les patients étudiés.

Pour la détection de la mutation p.P533R, nous avons développé un test simple et fiable « tétra primer ARMS PCR ». Le procédé a été réalisé et testé pour un groupe de patients hétérozygotes ou homozygotes pour la p.P533R. Les amorces 11-12F2IDUA (5'CCTGAG-GTCGGGCGGAGCGTC3') et 11-12R1IDUA (5'CC-CTAGGAGAACCCACACCCCACTGG3') ont été utilisées comme amorces de contrôle interne, produisant une bande de contrôle de 542 pb, tandis que les amorces 11-12F1WIDUA (5'CCCCGCGCTGCGG-CTGCC3') et 11-12R1IDUA (5'CACGTGCACCAG-CAAAAGCGACCC3') produisent une bande sauvage de 421 pb chez un sujet sain, ce qui reflète l'absence d'une substitution C> G dans le codon 533 de l'exon 11.

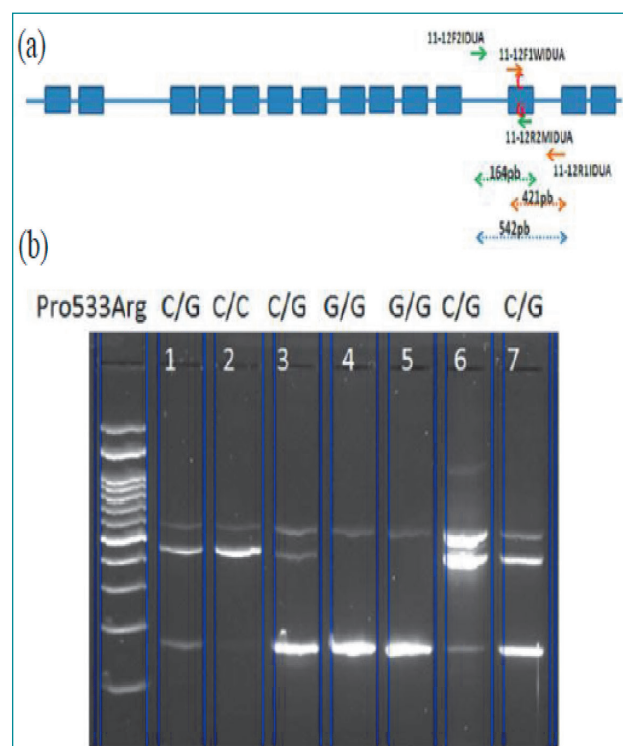


Figure 2 : Illustration schématique montrant les amorces utilisées pour détecter la mutation dans le gène IDUA p.P533R.
- (a) Les exons sont représentés comme des boîtes bleues et les introns sont représentés par une seule ligne.
- (b) Profil de « tétra primer ARMS PCR » de l'exon XI du gène IDUA montrant un aspect hétérozygote pour la mutation p.P533R chez les sujets 1, 3, 6 et 7 ; un aspect homozygote chez les patients 4 et 5 et un aspect normal pour un témoin normal.

Primers 11-12F2IDUA et 11-12R2MIDUA produisent une bande de 164 pb chez un contrôle homozygote positif. L'allèle p.P533R hétérozygote a été démontré par la présence des bandes de 164 pb, 421 pb et la bande de contrôle 542 pb (Figure. 2). Des études ont confirmé la ségrégation de l'allèle p.P533R chez les parents.

Gène IDS

L'analyse moléculaire du gène IDS a été réalisée pour cinq patients non apparentés atteints de syndrome de Hunter (MPS II).

Deux mutations différentes, situées dans l'exon 3 ont été identifiées : c.262C> T (p.R88C) et c.281G> A (p.G94D) (Tableau I). Les deux mutations ont été décrites précédemment par nos équipes en Tunisie. L'analyse moléculaire chez les mères conductrices n'a pas été effectuée. En outre, des polymorphismes introniques non signalés [IVS7 +38 (c.1006 + 38T> C)] et cinq polymorphismes rapportés précédemment (dbSNP ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), dont deux situés dans les exons du gène IDS, ont été identifiés chez les patients MPS II étudiés.

Gène SGSH

L'analyse moléculaire du gène SGSH a été réalisée chez 7 patients suspects de syndrome de Sanfilippo A (MPS IIIA). Un total de 7 mutations différentes a été identifié par notre équipe de recherche (Tableau I) :

Gène NAGLU

L'analyse moléculaire du gène NAGLU a été réalisée chez 3 patients suspects de syndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB). Tous ces patients étaient homozygotes. Deux nouvelles mutations ont été identifiées (Tableau I).

Gène HGSNAT

L'analyse moléculaire du gène HGSNAT a été effectuée chez 2 patients suspects de syndrome de Sanfilippo C (MPS IIIC). Ces patients étaient hétérozygotes composites. Deux mutations identifiées sont nouvellement rapportées (Tableau II).

Gène GALNS

L'analyse moléculaire du gène GALNS a été réalisée pour 12 patients suspects de Morquio A (MPS IVA). Tous ces patients étaient homozygotes. Un total de six différentes lésions génétiques a été détecté (Tableau I). La mutation la plus fréquemment observée dans le gène GALNS était c. 1156C> T (p. R386C) qui a déjà été retrouvée chez un patient d'origine turque. Nous avons identifié 12 polymorphismes du gène GALNS dont 7 sont introniques et 5 exoniques. Parmi les 7 polymorphismes introniques 6 sont nouvellement identifiés et n'ont pas été explorés par d'autres études.

Tableau II. Polymorphismes identifiés chez les patients tunisiens atteints des MPS

Nom du gène	Polymorphismes identifiés au niveau des introns	Polymorphismes identifiés au niveau des exons
IDUA	c.159-33C>T (rs373759069)	c.24C>A (rs11248061)
	c.299+161C>A (rs184055797)	c.60G>A (rs10902762)
	c.299+173G>C (rs369516569)	c.314G>A (rs3755955)
	c.590-8C>T (rs6848974)	c.924G>C (rs6830825)
	c.1525-38T>C (rs1131853)	c.543T>C (rs6815946)
IDS	c.168C>T (rs1141608)	c.1230C>G (rs115790973)
	c.1006+38T>C*	c.1467C>T (rs115929690)
GALNS		V554IG>A
	c.567+134A>G	c.508-816C>T (rs4844027)
	c.403+684C>A	c.1431G>A (rs2303271)
	c.1569+70T>A	c.1266T>G (P420P)
	c.244+86G>A*	c.1177G>C (rs2303269)
	c.567+105T>C*	c.708C>T (rs1064315)
	c.633+125A>G*	c.199C>A (rs11862754)
	c.633+138C>A*	

* : cette présente étude

Discussion

En Tunisie, l'incidence des différents types de MPS est estimée à 2,3 cas par 100000 nouveaux nés. En outre la prévalence des MPS de types I, III et IVA est estimée à 0,63 ; 0,7 et 0,45 pour 100000 naissances vivant respectivement [4].

L'analyse moléculaire révèle 27 mutations différentes dont 8 localisées dans le gène IDUA, deux dans le gène IDS, sept dans le gène SGSH, deux dans le gène NACLU, deux dans le gène HGSNAT et 6 dans le gène GALNS. Nos résultats sont en accord avec le degré élevé de l'hétérogénéité allélique de ces gènes. Nous avons démontré que la mutation pP533R à l'état homozygote est associée à un large spectre de phénotypes.

Dans le gène IDS, seulement deux mutations faux-sens localisées dans l'exon 3 sont identifiées chez 5 patients non apparentés. L'analyse de la distribution des mutations localisées dans la région codante du gène IDS montre que l'exon 3 présente plus de mutations que les autres exons [5].

Au total, 7 mutations localisées dans l'exon 1 et l'exon 8 sont identifiées dans le gène SGSH.

Notre analyse génétique montre la présence d'une nouvelle mutation d'épissage chez le patient MPS I associée à 11 mutations déjà identifiées en Tunisie et rapportées pour la première fois dans notre étude : Trois dans le gène IDUA, quatre dans le gène SGSH, deux dans le gène NAGLU, deux dans le gène HGSNAT et deux dans le gène GALNS.

Nous avons constaté d'après notre étude que les mutations homozygotes ont été trouvées chez 68 patients alors que les mutations hétérozygotes ont été trouvées chez 4 patients, ceci est expliqué par le pourcentage élevé de consanguinité chez les patients étudiés.

Dans une étude précédente, le taux de consanguinité a été estimée de 83 % chez des familles tunisiennes [6]. En Tunisie, la consanguinité de premier et de second degré a été identifiée chez tous les patients MPS étudiés [7, 8]. Ainsi, les familles non apparentées originaires de la même région présentent les mutations fréquentes ce qui suggère l'hypothèse de l'éventuel effet fondateur de ces mutations. Les mutations les plus fréquentes qui sont à l'origine de la maladie chez les patients étudiés sont les mutations, p. P533R (IDUA) et c.120+1G > A (GALNS), représentant approximativement 55.3 % (47/85) et 58.3 % (14/24) des allèles respectivement.

La mutation c.1598C > G (p. P533R) du gène IDUA était la mutation la plus fréquente chez nos patients et a été précédemment décrite comme une mutation commune dans la population Nord-Africaine qui a représenté approximativement 99 % d'allèles mutés [9]. Cette découverte a suggéré que ces allèles mutés aient été dérivés d'un ancêtre commun. Pour des raisons économiques et techniques, nous avons choisi et développé la technique de « tétra primer ARMS PCR » comme méthode pour caractériser la mutation fréquente p. P533R. La technique est simple, rentable, rapide et faisable dans notre laboratoire.

Conclusion

L'identification de ces mutations dans les familles tunisiennes non apparentées a permis une détection précise des femmes conductrices de certaines mutations. Le conseil génétique pour les parents à risque, devrait faciliter le diagnostic moléculaire prénatal.

Références

- 1 Neufeld EF : The mucopolysaccharidoses. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 2001 ; 3421–3452.
- 2 Stone JE. Urine analysis in the diagnosis of mucopolysaccharide disorders. *Annals of clinical biochemistry*. 1998 ; 35 (Pt 2) : 207–225.
- 3 Sambrook J FE, Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 1989.
- 4 Ben Turkia H, Tebib N, Azzouz H, Abdelmoula MS, Ben Chehida A, Chemli J, Monastiri K, Chaabouni M, Sanhagi H, Zouari B, Kaabachi N, Ben Dridi MF. Incidence of mucopolysaccharidoses in Tunisia. *La Tunisie medicale*. 2009 ; 87 : 782–785.
- 5 Chkioua L, Khedhiri S, Ferchichi S, Tchong R, Chahed H, Froissart R, Vianey-Saban C, Laradi S, Miled A. Molecular analysis of iduronate-2-sulfatase gene in Tunisian patients with mucopolysaccharidosis type II. *Diagnostic pathology*. 2011 ; 6 : 42.
- 6 Khedhiri S, Chkioua L, Bouzidi H, Dandana A, Ben Turkia H, Miled A, Laradi S. Mucopolysaccharidoses type I and IVA : clinical features and consanguinity in Tunisia. *Pathologie-biologie*. 2009 ; 57 : 392–397.
- 7 Chkioua L, Khedhiri S, Ben Turkia H, Chahed H, Ferchichi S, Ben Dridi MF, Laradi S, Miled A. Hurler disease (mucopolysaccharidosis type IH) : clinical features and consanguinity in Tunisian population. *Diagnostic pathology*. 2011 ; 6 : 113.
- 8 Romdhane L, Abdelhak S, Research Unit on Molecular Investigation of Genetic Orphan D, Collaborators. Genetic diseases in the Tunisian population. *American journal of medical genetics Part A*. 2011 ; 155A : 238–267.
- 9 Alif N, Hess K, Straczek J, Sebbar S, Belahsen Y, Mouane N, Abkari A, Nabet P, Gelot MA. Mucopolysaccharidosis type I in Morocco : clinical features and genetic profile. *Arch Pediatr*. 2000 ; 7 : 597–604.
- 10 Laradi S, Tukel T, Erazo M, Shabbeer J, Chkioua L, Khedhiri S, Ferchichi S, Chaabouni M, Miled A, Desnick RJ. Mucopolysaccharidosis I : Alpha-L-Iduronidase mutations in three Tunisian families. *Journal of inherited metabolic disease*. 2005 ; 28 : 1019–1026.
- 11 Chkioua L, Khedhiri S, Ferchichi S, Tchong R, Chahed H, Froissart R, Vianey-Saban C, Laradi S, Miled A. Molecular analysis of iduronate-2-sulfatase gene in Tunisian patients with mucopolysaccharidosis type II. *Diagnostic pathology*. 2011 ; 6 : 42.
- 12 Chkioua L, Khedhiri S, Jaidane Z, Ferchichi S, Habib S, Froissart R, Bonnet V, Chaabouni M, Dandana A, Jrad T, Limem H, Maire I, Abdelhedi M, Laradi S. [Mucopolysaccharidosis type I : identification of alpha-L-iduronidase mutations in Tunisian families]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2007 ; 14 : 1183–1189. patients with mucopolysaccharidosis type II. *Diagnostic pathology*. 2011 ; 6 : 42.
- 13 Chkioua L, Khedhiri S, Kassab A, Bibi A, Ferchichi S, Froissart R, Vianey-Saban C, Laradi S, Miled A. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis type I in Tunisia : identification of novel mutation and eight Novel polymorphisms. *Diagnostic pathology*. 2011 ; 6 : 39.
- 14 Chkioua L, Khedhiri S, Turkia HB, Tchong R, Froissart R, Chahed H, Ferchichi S, Ben Dridi MF, Vianey-Saban C, Laradi S, Miled A. Mucopolysaccharidosis type I : molecular characteristics of two novel alpha-L-iduronidase mutations in Tunisian patients. *Diagnostic pathology*. 2011 ; 6 : 47.
- 15 Chkioua L, Khedhiri S, Turkia HB, Tchong R, Froissart R, Chahed H, Ferchichi S, Ben Dridi MF, Vianey-Saban C, Laradi S, Miled A. Mucopolysaccharidosis type I : molecular characteristics of two novel alpha-L-iduronidase mutations in Tunisian patients. *Diagnostic pathology*. 2011 ; 6 : 47.
- 16 Chkioua L, Ferchichi S, Khedhiri S, Laradi S, Bibi A, Amira D, Dandana A, Ben Mansour R, Ben Limam H, Chaabouni M, Froissart R, Maire I, Miled A. Diagnostic strategy of mucopolysaccharidosis type I in Tunisia. *Annales de biologie clinique*. 2007 ; 65 : 175–179.
- 17 Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II : mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Human mutation*. 1993 ; 2 : 435–442.
- 18 Ouesleti S, Brunel V, Ben Turkia H, Dranguet H, Miled A, Miladi N, Ben Dridi MF, Lavoinne A, Saugier-Verber P, Bekri S. Molecular characterization of MPS IIIA, MPS IIIB and MPS IIIC in Tunisian patients. *Clinica chimica acta ; international journal of clinical chemistry*. 2011 ; 412 : 2326–2331.
- 19 Khedhiri S, Chkioua L, Bouzidi H, Dandana A, Ferchichi S, Ben Turkia H, Miled A, Laradi S. Mucopolysaccharidosis IVA within Tunisian patients : Confirmation of the two novel GALNS gene mutations. *Pathologie-biologie*. 2012 ; 60 : 190–192.
- 20 Bunge S, Kleijer WJ, Tylki-Szymanska A, Steglich C, Beck M, Tomatsu S, Fukuda S, Poorthuis BJ, Czartoryska B, Orii T, Gal A. Identification of 31 novel mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene reveals excessive allelic heterogeneity among patients with Morquio A syndrome. *Human mutation*. 1997 ; 10 : 223–232.