

SPECTRE MUTATIONNEL DE LA MALADIE DE GAUCHER EN TUNISIE: FORTE FREQUENCE DES HETEROZYGOTES COMPOSITES N370S/REC NcIl

W. CHERIF^{1, 2}, H. BEN TURKIA², N. TEBIB², O. AMARAL³, F. BEN RHOUMA¹,
M.S. ABDELMOULA², H. AZZOUZ², C. CAILLAUD³, M-C. SÀ MIRANDA⁴,
S. ABDELHAK¹ ET M-F. BEN DRIDI^{2*}.

¹ Unité 26/04 d'Exploration Moléculaire des Maladies Orphelines d'Origine Génétique, Institut Pasteur de Tunis, Tunisie.

² Unité 25/04 de Dépistage et de Prise en charge des Maladies Hérititaires du Métabolisme, Service de Pédiatrie du CHU la Rabta Tunis, Tunisie.

³ Laboratoire de Génétique Métabolique, Faculté de Médecine de Cochbin, France.

⁴ Département de Neurobiologie Génétique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, université de Porto, Portugal.

* Auteur correspondant: E-mail: sadok.yalaoui@rns.tn

RESUME

La maladie de Gaucher est la maladie de surcharge lysosomale la plus fréquente, de transmission autosomique récessive. Elle est due à un déficit enzymatique en β -glucocérébrosidase qui entraîne l'accumulation pathologique de son principal substrat (le glucosylcéramide) dans les lysosomes, cette surcharge est en partie responsable des manifestations cliniques de l'affection. Depuis la découverte du gène GBA qui code pour cette enzyme, plus de 200 mutations ont été rapportées parmi lesquelles les mutations récurrentes N370S, L444P et c.84insG. Leur fréquence et leur distribution sont variables selon les populations étudiées. Afin d'étudier le spectre mutationnel de cette affection en Tunisie, nous avons recherché les mutations récurrentes chez dix enfants tunisiens non apparentés atteints de maladie de Gaucher. Le dépistage des mutations récurrentes par PCR/ RFLP et séquençage direct a révélé que la mutation N370S est la plus fréquente (6/20 allèles mutés, 30%), suivie par l'allèle recombinant (RecNcIl) qui a été retrouvé chez cinq patients étudiés (5/20 allèles mutés, 25%), la mutation L444P présente une fréquence de l'ordre de 20% (4/20 allèles mutés). Notre étude a permis de révéler que cinq patients parmi dix étudiés, sont hétérozygotes composites N370S/RecNcIl (50%). La recherche de ces mutations en priorité fournit un outil de diagnostic moléculaire pour la majorité des patients, elle permet ainsi un dépistage des hétérozygotes indispensable pour le conseil génétique. Par ailleurs, la mutation N370S étant neuro-protectrice, sa recherche a donc une valeur pronostique.

Mots clés: Maladie de Gaucher, gène GBA, diagnostic moléculaire, N370S, RecNcIl, mutation, Afrique du Nord.

ABSTRACT

Gaucher disease is the most common lysosomal storage disorder; it results from the inherited deficiency of the enzyme glucocerebrosidase, the accumulation of its substrate causes many clinical manifestations.

Since the discovery of GBA gene, more than 200 different mutations have been identified, but only handful mutations are recurrent (N370S, L444P and c.84insG).

In order to determine the mutation spectrum in Tunisia, we performed recurrent mutation screening in ten unrelated Tunisian children with Gaucher disease.

Screening of recurrent mutation by PCR/RFLP and direct sequencing, has shown that N370S is the most frequent mutation (6/20 mutant alleles, 30%), followed by recombinant allele (RecNcIl) which is found in five patients (5/20 mutant alleles, 25%), the L444P mutation represent 20% (4/20 mutant alleles).

Our findings revealed that five among ten studied patients, were compound heterozygous N370S/RecNcIl (50%). The screening of these mutations provides a simple tool for molecular diagnosis of Gaucher disease in Tunisian patients and allows also genetic counselling for their family members.

Key words: Gaucher disease, GBA gene, molecular diagnosis, N370S, RecNcIl, mutation, North African.

INTRODUCTION

La maladie de Gaucher (OMIM 230800) est une maladie de surcharge lysosomale panethnique, ayant une fréquence de 1/50 000 à 1/100 000 mais elle est plus fréquente (1/1000 à 1/1200) dans la population juive ashkénaze^{1,2}. Elle est due à un déficit en β -glucocérébrosidase, l'enzyme lysosomale qui catalyse la première étape de la transformation du glucocérébroside en glucose et céramide, le déficit enzymatique entraîne l'accumulation du substrat dans les lysosomes des cellules du système réticulo-endothélial³. La maladie de Gaucher est caractérisée par un très large spectre de manifestations cliniques: une hépato-splénomégalie, des anomalies hématologiques (une anémie, une thrombocytopénie), des lésions osseuses et parfois une atteinte cardiaque. Le diagnostic est orienté par la mise en évidence des cellules de Gaucher sur les prélèvements tissulaires (moelle osseuse, foie, rate). La confirmation du diagnostic se fait par dosage de l'activité enzymatique de la β -glucocérébrosidase sur leucocytes ou fibroblastes en culture^{3,4}.

Cette affection présente une importante variabilité clinique, trois types majeurs sont classiquement distingués sur la base de la présence ou non et la sévérité de l'atteinte primitive du système nerveux central. Le type 1 est la forme la plus fréquente, son évolution est chronique, sans atteinte neurologique. L'âge de début et la sévérité des symptômes sont très variables. Le type 2 correspond à la forme infantile, avec une atteinte neurologique d'évolution aiguë. L'âge moyen du début de la maladie est de 3 mois; les manifestations neurologiques apparaissent vers 6 mois. Le type 3 ou la forme juvénile, débute comme une maladie purement viscérale superposable au type 1, et se complète dans l'enfance ou l'adolescence par une détérioration neurologique d'évolution subaiguë⁵.

Le pronostic de cette maladie a été bouleversé par l'agrément de la thérapie enzymatique substitutive⁶. L'hétérogénéité clinique est due en partie à des mutations du gène GBA qui code pour l'enzyme, β -glucocérébrosidase. Ce gène est formé de 11 exons et s'étend sur une région de 8,8 Kb^{7,8}.

Depuis la découverte de ce gène, plus de 200 mutations ont été rapportées parmi lesquelles les mutations récurrentes N370S, L444P et c.84insG (www.hgmd.org). Leur fréquence et leur distribution sont variables selon les populations étudiées.

D'autre part, en aval du gène GBA, se trouve son

pseudogène *pGBA* de taille 5Kb. Il présente 96% d'homologie de séquence avec le gène fonctionnel. Certaines mutations décrites dans la maladie de Gaucher, notamment l'allèle complexe *RecNcil*, résultent de réarrangements chromosomiques complexes qui impliquent le gène et son pseudogène⁸. La corrélation phénotype-génotype bien qu'imparfaite, a été retrouvée avec certaines mutations: l'homozygotie pour la mutation L444P est corrélée aux formes neurologiques (type 2 et 3), alors que la mutation N370S est toujours associée à la forme viscérale (type 1)⁹. La mutation D409H est retrouvée dans le type 3 C avec calcifications valvulaires¹⁰.

On rapporte ici l'étude préliminaire du spectre mutationnel de la maladie de Gaucher chez des patients tunisiens d'âge pédiatrique.

PATIENTS, MATERIEL ET METHODES

Patients

Onze patients atteints de la maladie de Gaucher appartenant à dix familles non apparentées et originaires de différentes régions de la Tunisie et suivis au service de pédiatrie de la Rabta de Tunis, ont été explorés sur le plan moléculaire.

Le diagnostic de maladie de Gaucher a été évoqué sur la survenue d'une hépato-splénomégalie associée à des anomalies hématologiques et/ou des lésions osseuses (Tableau I).

Le diagnostic clinique a été confirmé chez tous les cas étudiés par dosage de l'activité de l'enzyme β -glucocérébrosidase sur leucocytes en utilisant un substrat synthétique fluviométrique 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside¹¹.

Au moment où cette étude a été réalisée aucun patient n'avait développé de signe neurologique.

Matériel et Méthodes

Après l'obtention du consentement éclairé des familles, 5ml de sang a été prélevé sur anticoagulant (EDTA 15%) pour chaque patient et ses parents.

L'ADN a été extrait à partir du sang total selon la procédure standard d'extraction au phénol/chloroforme.

• PCR et séquençage direct

Les exons 9 et 10 ont été amplifiés par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant les amorces rapportées dans le tableau II. La réaction d'amplification par PCR est effectuée dans un thermocycleur (Applied Biosystems, 9700), dans un volume final de 50 μ l contenant 100ng d'ADN

Tableau I: Description et profil mutationnel des patients.

Famille	Consanguinité	Origine	Patient	Sexe	Organomégalie	Atteinte hématologique	Lésions osseuses	Age de début	Age au moment de l'étude	Génotype
F1	1 ^{er} degré	Jendouba	GBA1*	F	Sévère	Sévère	Sévère	9 mois	6 ans	L444P/L444P
F2	3 ^{ème} degré	Sfax	GBA2	M	Modéré	Non	Non	2 ans	10 ans	N370S/ RecNciI
F3	1 ^{er} degré	Médenine	GBA3*	M	Sévère	Sévère	Non	14 mois	2 ans	L444P/L444P
			GBA4*	M	Sévère	Modéré	Non	3 ans	19 ans	N370S/ RecNciI*
F4	Non	Bizerte	GBA4'	F	Modéré	Modéré	Non	8ans	11 ans	N370S/ RecNciI
			GBA5	M	Sévère	Sévère	Modéré	3 ans	15 ans	N370S/ RecNciI
F6	1 ^{er} degré	Béja	GBA6	F	Sévère	Sévère	Modéré	2 ans	7 ans	inconnu*
F7	1 ^{er} degré	Kef	GBA7	M	Sévère	Sévère	Modéré	3 ans	8 ans	inconnu*
F8	1 ^{er} degré	Sfax	GBA8	F	Sévère	Sévère	Sévère	10 mois	5 ans	N370S/•
F9	Non	Monastir	GBA9	M	Modéré	Non	Sévère	5 ans	11 ans	N370S/ RecNciI
F10	Non	Bizerte	GBA10	M	Sévère	Modéré	Non	5 ans	6 ans	N370S/ RecNciI

* Ni N370S, L444P, D409H et RecNciI ; • Autre allèle inconnu ; * Patient décédé.

génomique, 10 μ M de chaque primer; 250 μ M de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP: dATP, dCTP, dTTP, dGTP); 1,5 mM de MgCl₂ et une unité de Taq polymérase (Invitrogen). Le tampon d'amplification 10X contient 20mM de Tris HCl pH 8,8 et 50mM de KCl. L'amplification est effectuée en 40 cycles d'une minute de dénaturation à 94°C, une minute d'hybridation à la température adéquate (Tableau II) et une minute d'extension à 72°C. Un dernier cycle de 7 mn à 72°C fixe la fin de l'élongation et achève ainsi la réaction de PCR.

Les fragments amplifiés ont été purifiés par le kit QIAquick (QIAGEN) selon les instructions du fournisseur, et séquencés avec le Kit Big Dye Terminator sur un séquenceur ABI Prism 377 ou ABI 3130 (Applied Biosystems), en utilisant successivement les amorces sens et anti-sens (Tableau II).

• Détection des mutations N370S et L444P par digestion enzymatique

Le dépistage des mutations récurrentes N370S et L444P a été fait par digestion enzymatique. Les produits de l'amplification des exons 9 et 10 sont digérés respectivement par les enzymes *XhoI* et *NciI*, ensuite ils sont testés sur un gel de polyacrylamide à 12% ou un gel d'agarose 2%.

Pour dépister la mutation N370S, une partie du site de reconnaissance de l'enzyme *XhoI* est introduite par PCR en utilisant une amorce modifiée comme décrit par Beutler et al. en 1990¹². Le produit issu de

l'amplification de l'exon 9 du gène GBA, de taille 105pb, est digéré par l'enzyme de restriction *XhoI*, cette enzyme reconnaît le motif CTCGAG/ GAGCTC et va couper seulement la séquence mutée en donnant deux fragments 89pb et 16pb, un individu homozygote pour la mutation donnera deux bandes visibles sur un gel de polyacrylamide, un individu hétérozygote va se présenter avec trois bandes de taille 105pb, 89pb et 16pb (Tableau II).

La présence de la mutation L444P et/ou l'allèle complexe RecNciI est dépistée par digestion du produit de l'amplification de l'exon 10 avec l'enzyme *NciI*. La distinction entre les deux allèles se fait par séquençage direct du produit de PCR¹³ (Tableau II).

RESULTATS ET DISCUSSION

Nous rapportons ici une étude préliminaire du spectre mutationnel de la maladie de Gaucher en Tunisie. Cette étude a porté sur 11 sujets atteints issus de 10 familles non apparentées, la consanguinité a été retrouvée chez 60% des familles étudiées (6/10) (Tableau I).

Dans un premier temps, nous avons commencé par rechercher les mutations les plus fréquentes chez cinq patients (GBA1, GBA2, GBA3 GBA4, GBA5). Les résultats obtenus par digestion enzymatique et séquençage direct, ont montré que trois étaient hétérozygotes composites N370S/RecNciI et deux étaient homozygotes pour la mutation L444P (Tableau I).

Tableau II : Détection des mutations par PCR/RFLP ^{12,13}.

Exon / Mutation recherchée	PCR				RFLP	
	Séquences des amorces (5'-3')	Ta (c°)	Taille du produit amplifié (pb)	Enzyme de restriction	Taille des fragments générés par digestion (pb)	
					Normal	Muté
Exon 9/N370S	F: GCCTTTGTCCTTACCCTC*G R: GACAAAGTTACGCACCCAA	50	105	XhoI	105	89 et 16
Exon 10/L444P	F: GGAGGACCCAATTGGGTGCGT R: ACGCTGTCTTCAGCCCCTTC	55	638	NciI	638	536 et 102

* mésappariement d'une base ; Ta : température d'hybridation des amorces

Dans un deuxième temps, les mutations N370S, L444P et RecNciI ont été recherchées chez les autres patients, leurs parents et la fratrie s'ils étaient disponibles. La recherche mutationnelle effectuée par PCR/RFLP et confirmée par séquençage, a montré que parmi six patients explorés, trois sont hétérozygotes composites N370S/RecNciI. Un patient est hétérozygote pour la mutation N370S, l'autre allèle ne correspondant pas à une mutation récurrente (Figure 1 et 2, Tableau II).

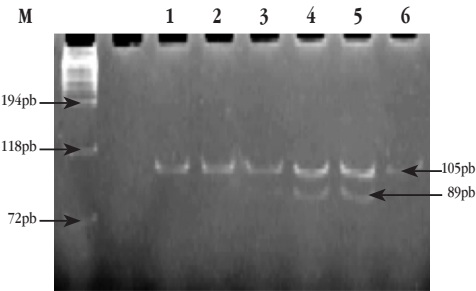


Figure 1. Profil électrophorétique de la digestion enzymatique de l'exon 9 du gène GBA par l'enzyme xhoI sur gel d'acrylamide à 12%. Résultats de la digestion enzymatique par XhoI des produits d'amplification de l'ADN génomique des patients atteints de la maladie de Gaucher, en utilisant l'amorce modifié et testé sur un gel de polyacrylamide à 12 %. Les pistes 3, 4 et 5 présentent deux bandes: 105pb et 89pb démontrant l'hétérozygotie des patients pour la mutation N370S. La bande correspondant à la taille 16pb ne figure pas sur ce gel. Pour la séquence normale, elle reste intacte (piste 1 : individu normal, piste 2: patient non porteur de la mutation N370S), piste 6: produit non digéré, M : marqueur Φ X174 digéré par HaeIII.

L'analyse de la fréquence relative déterminé sur 10 patients non apparentés, a révélé que sur 20 allèles mutés étudiés, la mutation N370S est présente dans 30% des allèles (6/20), suivie par l'allèle complexe (RecNciI) avec un taux de l'ordre de 25% (5/20), la mutation L444P présente 20% (4/20). Depuis la découverte du gène GBA, plus de 200 mutations ont été rapportées, seulement quelques mutations sont relativement plus fréquentes parmi lesquelles N370S.

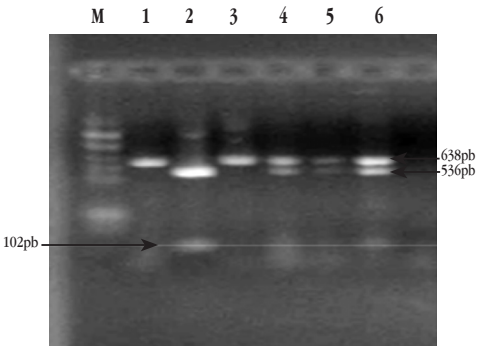


Figure 2. Profil électrophorétique de la digestion enzymatique de l'exon 10 du gène GBA par l'enzyme NciI Sur gel d'agarose à 2%. Résultats de la digestion enzymatique par NciI des produits d'amplification de l'ADN génomique des patients atteints de la maladie de Gaucher, testé sur un gel d'agarose à 2 %. La piste 2 présente deux bandes: 536pb et 102 pb démontrant l'homozygotie du patient pour la mutation L444P (confirmé par séquençage). Les pistes 4,5 et 6 présentent trois bandes : 638 pb, 536 pb et 102 pb, démontrant l'hétérozygotie des patients pour la mutation RecNciI (confirmé par séquençage). Pour la séquence normale, elle reste intacte (piste 1: individu normal, piste 3: patient non porteur de la mutation L444P ou RecNciI). M : marqueur Φ X174 digéré par HaeIII.

Dans la population juive ashkénaze, la fréquence de la mutation N370S est de l'ordre de 75%, suivie par la mutation c.84insG avec une fréquence de 13%. La mutation L444P est présente chez 3% des cas ¹⁴. Dans la population Japonaise, la mutation L444P est la mutation la plus fréquente, elle constitue 43,6% des allèles étudiés suivi par la mutation F213I (14,9%), la mutation N370S n'a pas été détectée ¹⁵. En Tunisie, d'après nos résultats, la mutation N370S semble être la mutation la plus fréquente; elle est présente avec un taux relatif de l'ordre de 30%, cette valeur est proche de celle retrouvée en Italie à savoir 36% ¹⁶.

L'analyse génotypique montre que N370S/RecNciI est le génotype le plus fréquent, il est rencontré chez 50% des cas étudiés (Tableau I). Ce génotype est rencontré dans toutes les régions géographiques (Nord, centre et sud) de la Tunisie. Quatre parmi les cinq familles où ségrège cet haplotype ne sont pas consanguines, il n'est donc pas étonnant que la majorité des patients soient hétérozygotes composites, ce qui serait en faveur de la fréquence relativement élevée de ces mutations dans la population générale.

Parmi les patients issus de mariage consanguin, un est homozygote pour la mutation L444P et deux autres ne portent pas de mutations connues, c'est ce qui suggère l'apparition d'événements mutationnels nouveaux favorisés par la consanguinité, ce phénomène a déjà été observé dans d'autres maladies autosomiques récessives étudiées dans notre population comme l'immunodéficience congénitale ¹⁷, la maladie d'Imerslund ¹⁸ et la granulomatose septique chronique ¹⁹.

En Tunisie, la fréquence exacte de la maladie de Gaucher est inconnue bien que cette affection ne soit pas exceptionnelle; en 2002, Chaabouni et al ont rapporté une série de 27 cas, ils ont constaté que le type1 est de loin la forme la plus fréquente ²⁰. Les formes adultes asymptomatiques restent sous diagnostiqués, ce qui rend l'estimation de la fréquence de la maladie difficile. Un registre national est en cours d'élaboration, il permettrait d'évaluer la prévalence et l'incidence de cette maladie dans notre pays.

En conclusion, la présente étude qui est, à notre connaissance, la première en Afrique du nord a démontré la présence des mutations N370S, RecNciI et L444P chez plus de la moitié des cas testés. Le dépistage de ces mutations en priorité chez les

sujets atteints de la maladie de Gaucher fournit un outil de diagnostic moléculaire indispensable pour le conseil génétique. En plus l'identification de la mutation N370S présente un intérêt pronostic important du fait que cette mutation soit neuroprotectrice. En effet, c'est la seule mutation qui présente une corrélation phénotype-génotype nette, elle est toujours associée au type1 ou la forme viscérale de la maladie.

REFERENCES

- 1- **H. Zhao, M. Keddache, L. Bailey, G.L. Arnold and G. Grabowski (2003).** Gaucher's disease: identification of novel mutant alleles and genotype-phenotype relationships. *Clin. Genet.*, **64**, 57-64.
- 2- **E. Beutler, T. Gelbart, W. Kuhl, A. Zimran and C. West (1992).** Mutations in Jewish patients with Gaucher disease. *Blood*, **79**, 1662-1666.
- 3- **E. Sidransky (2004).** Gaucher disease: complexity in a 'simple' disorder. *Mol. Genet. Metab.*, **83**, 6-15.
- 4- **P. Mistry and D.P. Germain (2006).** Phenotype variations in Gaucher disease. *Rev. Med. Interne*, **27** Suppl 1, S3-10.
- 5- **D. Hsia, J. Naylor and J.A. Bigler (1959).** Gaucher's disease: report of two cases in father and son and review of the literature. *New. Eng. J. Med.*, **261**, 164-169.
- 6- **F. Cornu (1998).** Maladie de Gaucher et traitement par enzymothérapie substitutive. *Ann. pharmac. Fran.*, **56**, 102-107.
- 7- **A. Zimran, J. Sorge, E. Gross, M. Kubitz, C. West and E. Beutler (1990).** A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder. *J. Clin. Invest.*, **85**, 219-222.
- 8- **M. Horowitz, S. Wilder, Z. Horowitz, O. Reiner, T. Gelbart and E. Beutler (1989).** The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*, **4**, 87-96.
- 9- **V. Koprivika, L.S. Deborah, J.K. Park, M. Callahan, A. Frisch, I.J. Cohen, N. Tayebi and E. Sidransky (2000).** Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 1777-1786.
- 10- **A. Chabas., B. Cormand, D. Grinberg, J.M. Burguera, S. Balcells, J.L. Merino, I. Mate, J.A.**

- Sobrinho, R. Gonzalez-Duarte and L. Vilageliu** (1995). Unusual expression of Gaucher's disease: cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation. *J. Med. Genet.*, **32**, 740-742.
- 11- S.P. Peters, P. Coyle and R.H. Glew** (1976). Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 569-582.
- 12- E. Beutler, T. Gelbart and C. West** (1990). The facile detection of the nt 1226 mutation of glucocerebrosidase by 'mismatched' PCR. *Clin. Chim. Acta.*, **194**, 161-166.
- 13- A.P. Judith, H. Rosenbaum and G.B. Ruth** (2004). Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1972-1977.
- 14- E. Beutler** (1992). Gaucher disease: New molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science*, **256**, 794-798.
- 15- H. Ida, O.M. Rennert, H. Kawame, K. Maekawa and Y. Eto** (1997). Mutation prevalence among 47 unrelated Japanese patients with Gaucher disease: identification of four novel mutations. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **20**, 67-73.
- 16- M. Filocamo, R. Mazzotti, M. Stroppiano, M. Seri, F. Giona, G. Parenti, S. Regis, F. Corsolini, S. Zoboli and R. Gatti** (2002). Analysis of the glucocerebrosidase gene and mutation profile in 144 Italian gaucher patients. *Hum. Mutat.*, **20**, 234-235.
- 17- F. Giona, G. Parenti, S. Regis, F. Corsolini, S. Zoboli and R. Gatti** (2002). Analysis of the glucocerebrosidase gene and mutation profile in 144 Italian gaucher patients. *Hum. Mutat.*, **20**, 234-235.
- 18- H. Elloumi-Zghal, M.R. Barbouche, J. Chemli, M. Bejaoui, A. Harbi, N. Snoussi, S. Abdelhak and K. Dellagi** (2002). Clinical and genetic heterogeneity of inherited autosomal recessive susceptibility to disseminated *Mycobacterium bovis* bacilli calmette-guerin infection. *J. Infect. Dis.*, **185**, 1468-1475.
- 19- C. Bouchlaka, C. Maktouf, B. Mahjoub, A. Ayadi, M.T. Sfar, M. Sioud, N. Gueddich, Z. Belhadjali, A. Rebai, S. Abdelhak and K. Dellagi** (2007). Genetic heterogeneity of megaloblastic anaemia type 1 in Tunisian patients. *J. Hum. Genet.*, **52**, 262-270.
- 20- R. El Kares, M.R. Barbouche, H. Elloumi-Zghal, M. Bejaoui, J. Chemli, F. Mellouli, N. Tebib, M.S. Abdelmoula, S. Boukthir, Z. Fitouri, S. M'Rad, K. Bouslama, H. Touiri, S. Abdelhak and M.K. Dellagi** (2006). Genetic and mutational heterogeneity of autosomal recessive chronic granulomatous disease in Tunisia. *J. Hum. Genet.*, **51**, 887-895.
- 21- M. Chaabouni, H. Aoulou, N. Tebib, M. Hachicha, S. Ben Becher, K. Monastiri, M. Yacoub, T. Sfar, M. Elloumi, N. Chakroun, M. Miled and M.F. Ben Dridi** (2004). La maladie de Gaucher en Tunisie (étude multicentrique). *La revue de médecine interne*, **25**, 104-110.