

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamedBougara de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Génétique**

Diagnostic génétique de la fièvre Méditerranéenne familiale chez un groupe de patients Algériens : Recherche de trois variants pathogènes dans l'exon 10 du gène *MEFV*

Présenté par :

- **AIT KACEM Kamilia**
- **BOUZNAD Sara**
- **CHEMLI Maria Zedjiga**

Soutenu le :15 /07/2021, devant le jury :

Présidente :	KHEMILI-TALBI Souad.....	MCA (UMBB)
Promotrice :	AIT-IDIR Djouher.....	MCA (UMBB)
Examinatrice :	BOULDJENNET Faiza.....	MAB (USTHB)

Promotion 2020/2021

Remerciements

A notre encadreur Mme. Ait Idir D qui a réussie à former un trinôme solide aux compétences complémentaires. Sachez que tous les mots du monde ne peuvent assez exprimer notre reconnaissance. Nous tenons à vous remercier vivement pour l'encadrement, votre disponibilité et de tous les conseils qu'on a pu bénéficier tout au long de l'encadrement. C'était une chance inouïe pour nous d'y être sous votre aile. On a eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous.

On tient aussi à remercier les membres du jury pour leur présence, pour leur lecture attentive de notre mémoire ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail.

Durant toute notre scolarité, certains professeurs marquent plus nos esprits que d'autres. En effet, certains enseignants savent et aiment transmettre leur savoir. Et ils peuvent même faire bien plus. Ils peuvent donner le goût de l'apprentissage, aider les élèves à se surpasser et à prendre confiance en eux. Sur ce, on aimerait remercier toute l'équipe de formation de la SNV, plus précisément l'équipe de formation de la biologie moléculaire et de la génétique.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Aux êtres les plus chers de ma vie,

A mes parents, ma source de force et d'admiration, qui m'ont soutenues et encouragées durant toutes mes années d'études. Merci de m'avoir mise au monde et pour tout ce que vous avez fait pour moi pour que je réalise mes rêves et mes ambitions.

Mon frère, merci de m'avoir supportée, aidée et épaulée lorsque j'en avais besoin.

A mon grand-père Allah yarahmo ainsi que ma grand-mère.

A tous les membres de ma famille ainsi que mes amies que je chéris profondément, surtout **Hafsa, Houda, Hadjer et Taehyung**.

Et pour finir, je remercie mes collègues **Sara et Kamilia** pour ce travail d'équipe et d'avoir surmonté toutes les difficultés main dans la main sans jamais succomber.



Dédicaces

Je dis avant tout merci au Bon Dieu le tout puissant qui m'a donnée la vie et m'a aidée à réaliser ce travail.

Je dédie ce mémoire :

À mes chers parents qui n'ont jamais cessés de tout me donner durant toute ma vie,

À mon frère Mohamed, Ma sœurs Kahina, À mes grands-parents, À ma famille, mes proches et tous mes ami(e)s qui m'ont toujours encouragée, et à qui je souhaite plus de succès.

Sans oublier, mes collègues Maria et Kamilia

Enfin je remercie tous mes collègues de l'université ainsi que toutes les personnes que je connais pour tout le support qu'elles m'ont apportées.



Dédicaces

Je dédie ce travail surtout à mes parents (mon cher père et ma chère mère) qui ont dépensés pour moi sans compter. En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie. Avec toute ma tendresse.

A mon cher époux "Saïd ".

A mes chers frères "Farid", "Younes", "Massinissa" et "Ghilasse".

A mes oncles, tantes, cousins et cousines et ma grande mère.

Spécial dédicace à ma chère sœur "Hafida" qui m'a bien aidée le long de mon parcours universitaire et qui m'a donnée beaucoup de succès et aussi à mes chères collègues Maria Zedjiga et Sara.

A tous les membres de ma promotion.



Sommaire

Introduction	
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1 Généralités sur la FMF	4
1.1 Epidémiologie	4
1.2 Manifestations cliniques	4
2 Aspect génétique	5
2.1 Description du gène	5
2.2 Mutations du gène MEFV	5
2.3 Origine et propagation des mutations fondatrices à travers le monde	7
2.4 Produit du gène MEFV : la pyrine	9
3 Corrélation génotype phénotype	10
4 La physiopathologie	11
5 Traitement	11
Chapitre II : Partie expérimentale	
1 Patients	14
2 Analyse génétique	14
2.1 Extraction de l'ADN génomique à partir du sang total	14
2.1.1 Isolement des leucocytes	14
2.1.2 Lyse des leucocytes et déprotéinisation	15
2.1.3 Précipitation de l'ADN génomique par l'éthanol absolu	15
2.2 Recherche des mutations	15
2.2.1 Principe de la PCR-ARMS	15
2.2.2 Détection des mutations par PCR-ARMS	17
2.3 Electrophorèse et visualisation des produits d'amplification	20
Chapitre III : Résultats et discussion	
1 Résultats	22
1.1 Traitement des données cliniques des patients	22
1.2 Quantification et évaluation de la qualité de l'ADN	23
1.3 Recherche de mutations	23
1.3.1 Fréquence des allèles mutés	28
2 Discussion	29
Conclusion	
Perspectives	
Références bibliographiques	

Liste des abréviations:

AA: Amylose A

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNg : ADN génomique

ASC: Apoptosis-Associated Speck-like protein containing

FMF: Fièvre Méditerranéenne Familiale

GTPase: enzyme Guanosine Triphosphate

IL-1 β : Interleukine 1 Beta

INFEVERS: Internet Fevers

MAI: Maladies Auto-immune

MEFV: MEditerranean FeVer

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDB: Protein Data Bank

PRY: Pyrine domain

RhoA: Ras homolog family member A

VUS: variant of uncertain significance

Liste des figures :

Figure 1: Structure du gène <i>MEFV</i> et quelques variants de séquence qui peuvent toucher certains exons (exons 2, 3, 5 et 10)	6
Figure 2: Origine et les voies de propagation des deux mutations, p.M694V et p.V726A	8
Figure 3: Représentation schématique des domaines de la pyrine ainsi que les exons les codant	9
Figure 4: Structure tridimensionnelle native (PDB ID : 2WL1) du domaine pyrine B30.2 visualisé par PDBe	10
Figure 5: Schéma légendé du principe de la PCR-ARMS.	16
Figure 6: Séquence amplifiée montrant les mutations recherchées.	18
Figure 7: Répartition des signes cliniques de FMF observés dans notre cohorte.	22
Figure 8: Profil électrophorétique sur un gel d'agarose de 1,5% pour la mise en évidence de la mutation p.M694I.	24
Figure 9: Profil électrophorétique sur un gel d'agarose de 1,5% pour la mise en évidence de la mutation p.M694I.	25
Figure 10: Profil électrophorétique sur un gel d'agarose de 1,5% pour la mise en évidence de la mutation p.M694V.	26
Figure 11: Profil électrophorétique sur un gel d'agarose de 1,5% pour la mise en évidence de la mutation p.M680I.	27

Liste des Tableaux

Tableau I: Séquence des amorces utilisées pour l'identification des mutations recherchées ..	17
Tableau II: Composition du milieu réactionnel.....	19
Tableau III: Conditions d'amplification.....	20
Tableau IV: Les différents génotypes obtenus lors de l'analyse de l'ADNg des 13 patients...	28
Tableau V: Fréquence allélique des mutations identifiées.....	28

Introduction

Introduction

La fièvre méditerranéenne familiale (FMF ; OMIM 249100) est la fièvre héréditaire la plus récurrente affectant la Méditerranée orientale, à savoir les Arabes, les Juifs séfarades, les Turcs et les Arméniens (Ben-Chetrit et *al.*, 2009; El-Shanti et *al.*, 2006). Cependant, la FMF est maintenant reconnue, dans le monde entier, pour inclure des populations d'origine non méditerranéenne (Verrecchia et *al.*, 2015). Cliniquement, elle se caractérise par la survenue depuis l'enfance d'épisodes récurrents de fièvre avec majoritairement des douleurs abdominales et un syndrome inflammatoire biologique (Georgin-Lavialle et *al.*, 2018).

Le traitement de la FMF repose sur la colchicine prise tous les jours, à vie, afin de prévenir l'apparition l'amylose rénale (Goldfinger, 1972) qui est la complication à long terme la plus délétère pouvant entraîner une insuffisance rénale et la mort chez les patients non traités (Obici and Merlini, 2012; Scarpioni and Obici, 2018).

Génétiquement, il s'agit d'une maladie à transmission autosomique récessive associée à des mutations dans le gène *MEFV* (Mediterranean Fever), identifié en 1997 (The International FMF Consortium, 1997; The French FMF Consortium et *al.*, 1997).

Le gène *MEFV*, est localisé sur le chromosome 16 (16p13.3) (The International FMF Consortium, 1997; The French FMF Consortium et *al.*, 1997) et code pour une protéine de 781 acides aminés pyrine/marenostriane, principalement exprimée dans les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques et les fibroblastes (Centola et *al.*, 2000).

Bien que 389 variants du gène *MEFV* ont été à ce jour identifiés dans la base de données INFEVERS (<https://infevers.umai-montpellier.fr/>), cinq seulement d'entre eux sont principaux et sont responsables de plus de 85% des cas de FMF: p.M680I, p.M694V, p.M694I et p.V726A, ils sont regroupés dans l'exon 10, tandis que p.E148Q dans l'exon 2 (Ozdogan and Ugurlu, 2019; Touitou, 2001). Plusieurs études ont rapporté des mutations fondatrices associées à la FMF, différemment réparties entre les populations méditerranéennes (El-Shanti et *al.*, 2006; Papadopoulos et *al.*, 2008; Touitou, 2001) mais en Algérie, les variants pathogènes du gène *MEFV* restent encore mal explorés.

L'exploration moléculaire du gène *MEFV* est toujours en cours par recrutement de nouveaux patients potentiels. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de la présente étude en recherchant trois mutations qui touchent l'exon 10 du *MEFV* : p.M694I, p.M694V et p.M680I chez un groupe de patients, cliniquement suspectés de FMF. En effet, ces mutations ont été identifiées comme les plus récurrentes parmi les patients FMF Algériens (Ait-Idir and Djerdjouri, 2020). Pour cela, la technique utilisée est la PCR spécifique d'allèles.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1 Généralités sur la FMF

La fièvre méditerranéenne familiale (FMF, OMIM 249100), anciennement appelée maladie périodique, appartient au groupe des maladies auto-inflammatoires monogéniques qui résultent d'une dérégulation de l'immunité innée. Ces maladies ont été initialement définies par la présence d'un syndrome inflammatoire biologique non spécifique, et par opposition aux maladies auto-immunes, par une absence d'auto-anticorps et de lymphocytes T activés (McDermott et *al.*, 1999). Par la suite, il a été mis en évidence que l'IL1 β , principale cytokine pro-inflammatoire, joue un rôle majeur dans la physiopathologie de cette nouvelle classe de maladies. De ce fait, elles ont été redéfinies comme des affections liées à une sécrétion non contrôlée d'IL1 β par les cellules de l'immunité innée (Di Donato et *al.*, 2021).

1.1 Epidémiologie

On estime à 150000 le nombre de personnes atteintes de FMF dans le monde. Cette maladie touche les populations qui sont surtout originaires du pourtour méditerranéen : ainsi, les populations les plus à risque sont arménienne, turque, juive séfarade et arabe (Verrecchia et *al.*, 2015).

Du fait des mouvements importants de populations depuis le XXe siècle, la FMF peut se voir partout dans le monde (Ben-Chetrit and Touitou, 2009; Verrecchia et *al.*, 2015). Les cas de FMF au Japon étaient rares avant l'avènement de la génétique mais ils sont maintenant rapportés à une fréquence croissante, soit environ 320 patients au total (Migita et *al.*, 2016).

1.2 Manifestations cliniques

Les principales manifestations sont des poussées inflammatoires des séreuses impliquant classiquement le péritoine, la plèvre ou les articulations accompagnées typiquement de fièvre et d'une élévation des marqueurs sériques d'inflammation (Georgin-Lavialle et *al.*, 2018).

Les premiers symptômes de la FMF apparaissent à l'enfance dans 50% des cas (Ben-Chetrit and Levy, 1998), et avant l'âge de 20 ans chez environ 90% des patients (Sohar et *al.*, 1967).

La FMF évolue par des attaques récurrentes et de résolution spontanée de fièvre et d'inflammation de séreuses, de durée 12- 71 heures(Ben-Chetrit and Levy, 1998; Padeh and Berkun, 2016).

L'intervalle entre les épisodes est extrêmement variable, allant de quelques semaines à plusieurs années (Sari *et al.*, 2014).

L'Amylose rénale AA est la complication à long terme la plus délétère qui peut conduire à une insuffisance rénale et au décès chez les patients non traités (Obici and Merlini, 2012; Scarpioni and Obici, 2018).

2 Aspect génétique

2.1 Description du gène

Le gène *MEFV* (*MEditerraneanFeVer*) responsable de la FMF a été identifié en 1997 sur le bras court du chromosome 16 humain, par l'approche de clonage positionnel (French FMF Consortium., 1997; The International FMF Consortium., 1997). Le *MEFV* est un gène dont la taille est environ 10kb, composé de 10 exons et code pour un transcrit de 3505 nucléotides (Figure 1). Ce gène code pour une protéine pyrine/marenostriane de 781 acides aminés (French FMF Consortium., 1997; The International FMF Consortium., 1997).

2.2 Mutations du gène *MEFV*

Dans les populations à risque, 75 à 85% des cas de FMF sont dus aux mutations touchant :

L'exon 10: p.M694I (c.2082G>A), p.M694V (c.2080A>G), p.M680I (c.2040G>C) et p.V726A (c.2177T>C).

- L'exon 2 : p.E148Q (c.442G>C) (Ozdogan and Ugurlu, 2019; Touitou, 2001).

Actuellement, d'après la base de données INFEVERS, 389 variants ont été rapportés. Ces variants ont été classés selon leur signification clinique :

- Variants pathogènes (en rouge, figure 1) : décrits uniquement dans l'exon 10. Ils'agit des variants: p.M694I, p.M694V, p.M680I et p.V726A.
- Variants probablement pathogènes (Likely pathogenic) : (bleu, figure 1).
- Variants de signification incertaine ou VUS (Variant Uncertain Significance) (vert, figure 1): parmi ces variants, figure p.E148Q.
- Variants probablement bénins.
- Variants bénins.
- Variants non résolus (unsolved).
- Variants non classés.

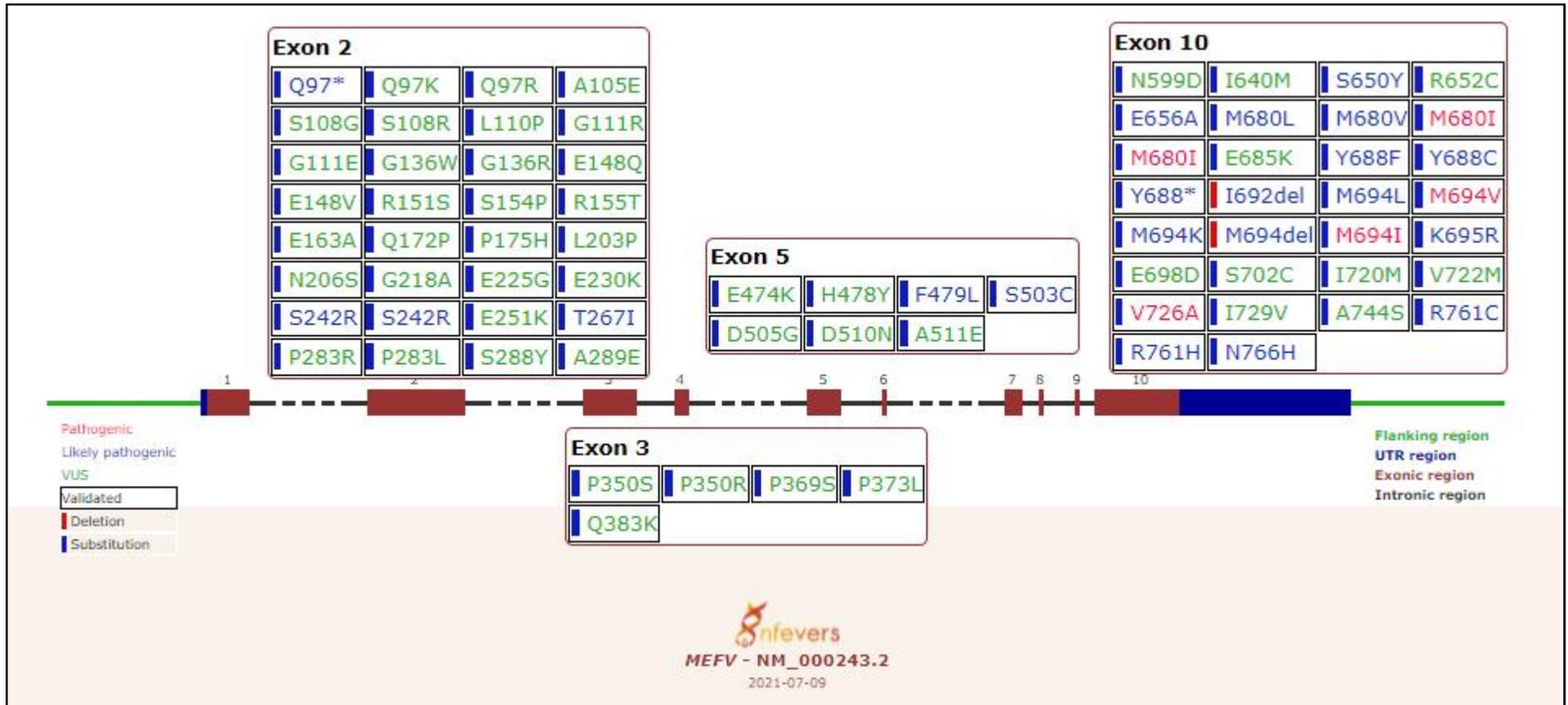


Figure 1: Structure du gène *MEFV* et quelques variants de séquence qui peuvent toucher certains exons(exons 2,3,5 et 10)

(<https://infovers.umai-montpellier.fr/>)

De plus parmi les variants rapportés, certains ont statut validé et d'autre leur statut n'est pas encore validé, c'est-à-dire leur classification peut être changée (<https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=1>).

2.3 Origine et propagation des mutations fondatrices à travers le monde

La fréquence trèsfréquent des mutations pathogènes du *MEFV* dans le bassin méditerranéen s'explique principalement par un effet fondateur (Milenković J et *al.*, 2020). Les mutations du *MEFV* sont probablement apparues à l'époque prébiblique et ont été disséminées dans diverses populations, où elles se trouvent encore aujourd'hui, avec une distribution non uniforme.

Mutation p.M694V a été introduite en Espagne et en Afrique du nord probablement par les marins (Phéniciens) qui sillonnaient la méditerranée depuis le Moyen-Orient. Plus tard au 8^{ème} siècle, l'arrivée des musulmans par voie terrestre a contribué à la propagation de cette mutation dans ces deux régions du monde (Ben-Chetrit and Touitou, 2009).

Depuis le Moyen-Orient, la mutation p.V726A est arrivée en Arménie, Turquie et en Europe soit par les voies terrestres soit par la voie maritime (Ben-Chetrit and Touitou, 2009).

La mutation p.M694I pourrait également être considérée comme ancienne, présente chez la population autochtone d'Afrique du nord (Berbères). Ainsi, cette mutation était présente en Afrique du Nord avant l'islamisation au VIIe siècle de notre ère (Yepiskoposyan and Harutyunyan, 2007).

La datation des principales mutations du *MEFV* a permis d'estimer l'apparition des mutations p.M694V, p.M694I, p.V726A, p.M680I et p.E148Q, respectivement à 7000, 8500, 15000, 23000 et 30000 avant JC (Jalkh et *al.*, 2008).

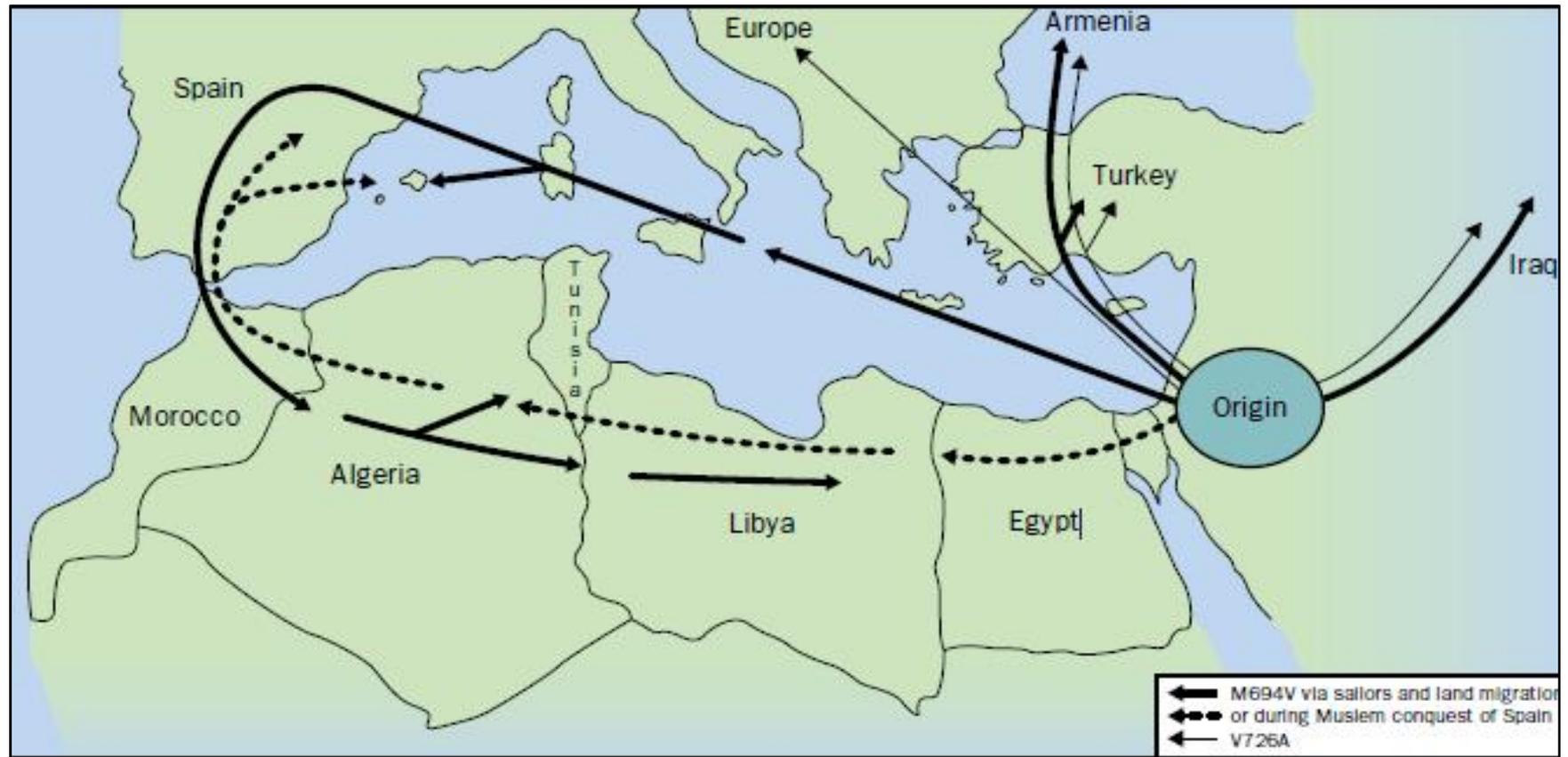


Figure 2: Origine et les voies de propagation des deux mutations, p.M694V et p.V726A (Ben-Chetrit and Levy, 1998)

2.4 Produit du gène *MEFV* : la pyrine

La pyrine est une protéine composée de cinq domaines distincts :

- Le domaine PYRIN (résidus 1 à 95), codé par l'exon 1 ;
- Le domaine basique du facteur de transcription bZIP (résidus 266 à 280), dont la région codante se situe dans l'exon 2 ;
- Le domaine du doigt de zinc B-box (résidus 375 à 407), codé par une région située dans l'exon 3 ;
- Un domaine hélicoïdal (bobine enroulée) (résidus 408–594), codé par les exons de 3 à 8 ;
- Le domaine B30.2 (PRYSPRY) C-terminal (résidus 598 à 774) codé par l'exon 10.

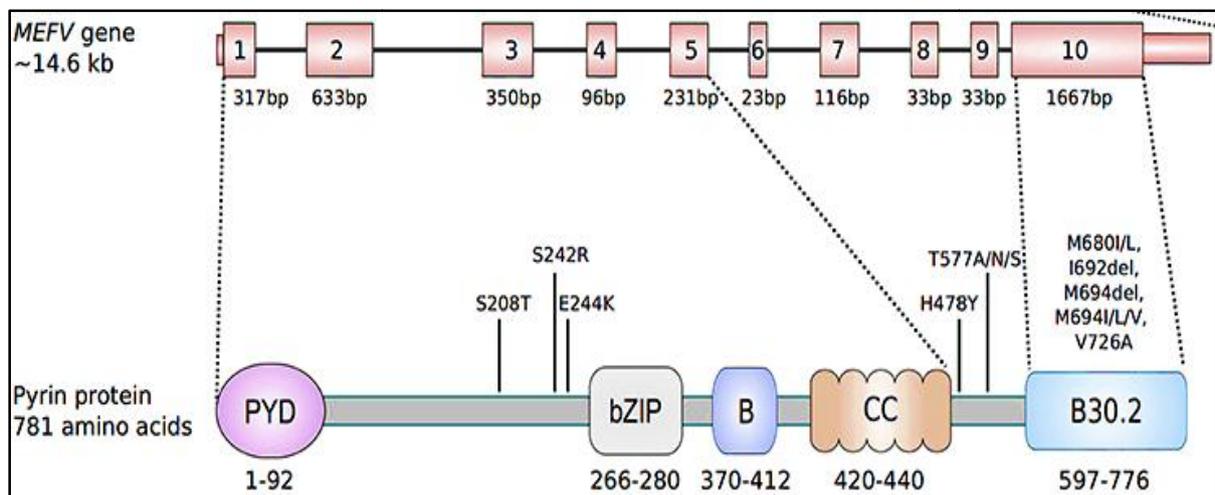


Figure 3 : Représentation schématique des domaines de la pyrine ainsi que les exons les codant (Schnappauf et *al.*, 2019)

La structure tertiaire de la protéine entière est inconnue, seule la structure tertiaire du domaine PYD (PDB id : 2MPC), B30.2 (PDB id : 2WL1) (Figure 4) et du fragment C-terminal coiled-coil/B30.2 (PDB id : 4CG4) sont étudiés par approche bioinformatique (Weinert et *al.*, 2015).

D'un point de vue fonctionnel, le domaine B30.2 est particulièrement intéressant car il est le siège de sept des huit mutations les plus courantes associées à la FMF dont la p.M694I (c.2082 G>A), p.M694V (c.2080 A>G) et p.M680I (c.2040 G>C) (Weinert et *al.*, 2015).

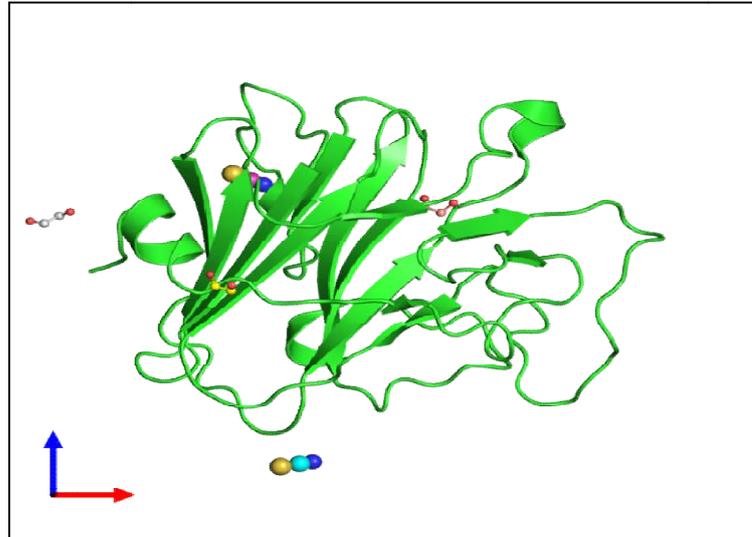


Figure 4: Structure tridimensionnelle native (PDB ID : 2WL1) du domaine pyrine B30.2 visualisé par PDBe(<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/node/1>)

3 Corrélation génotype phénotype

La FMF est caractérisée par une hétérogénéité clinique due à une hétérogénéité génétique. Le spectre clinique associé aux mutations du gène varie de l'absence totale des symptômes aux complications sévères, telles que le développement de l'amylose. En effet, les mutations qui causent la FMF peuvent avoir une pénétrance incomplète et une expressivité très variable. Elle est retrouvée dans la plupart des allèles complexes identifiés, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs génétiques, ou environnementaux dans l'expression phénotypique de la FMF (Medlej-Hashim et *al.*, 2004).

De nombreux génotypes ont été observés, les patients étant soit homozygotes pour une mutation donnée, soit hétérozygotes composites, chaque allèle étant porteur d'une mutation différente. Des allèles complexes ont également été observés, comportant 2 ou 3 mutations différentes en *cis* sur le même allèle. La maladie est généralement décrite comme ayant une transmission autosomique récessive, mais des hétérozygotes symptomatiques sont de plus en plus rapportés (Moradian et *al.*, 2010).

La pénétrance de p.M694V est très élevée. Plusieurs études ont montré qu'elle est corrélée à des phénotypes particulièrement sévères. Les homozygotes pour cette mutation présentent souvent des accès inflammatoires fréquents avec atteinte articulaire et myalgies fébriles de durée prolongée, et une prévalence élevée de l'amylose rénale (Ece et *al.*, 2014; Kasifoglu et *al.*, 2014).

De plus, Le génotype homozygote pour p.M694V est associé à un début précoce de la maladie en comparaison avec les autres génotypes (Ebrahimi-Fakhari et *al.*, 2013).

Les patients homozygotes pour p.M694I ou p.M680I ou hétérozygotes composites pour les deux mutations affectant les codons 694 et 680, peuvent également avoir un phénotype aussi sévère que celui des homozygotes pour p.M694V (Touitou, 2001).

4 La physiopathologie

Il est aujourd'hui admis que la production de l'IL-1 dépend de la formation d'un inflammasome intracellulaire par l'intervention de la protéine pyrine qui est codée par le gène *MEFV* et cela en cas d'activation de la cellule immunitaire via des signaux de dangers (Park et *al.*, 2016). En l'absence de stimulation, la pyrine est inhibée grâce à une protéine régulatrice dénommée Pyr 14.3.3 qui se fixe à la pyrine via un résidu phosphorylé lui-même dépendant de la protéine transmembranaire RhoAGTPase. En l'absence de stimulation de la RhoAGTPase transmembranaire, celle-ci entraîne une phosphorylation de la pyrine qui permet la liaison avec la protéine régulatrice. En cas de mutation de la pyrine, la phosphorylation ne peut pas s'effectuer, on observe donc une activation constitutionnelle de l'inflammasome pyrine responsable d'une sécrétion accrue d'interleukine 1. En présence de colchicine, la phosphorylation pourrait être restaurée, expliquant l'efficacité de ce médicament dans la fièvre méditerranéenne familiale (Gao et *al.*, 2016).

5 Traitement

Les objectifs du traitement de la FMF sont l'amélioration de la qualité de vie, la réduction de la fréquence, de la sévérité et de la durée des crises et la prévention des dommages à long terme, en particulier l'amylose AA, en minimisant l'inflammation chronique/subclinique. Il existe une grande hétérogénéité entre les individus en ce qui concerne le type et la sévérité des crises. Par conséquent, le traitement doit être adapté individuellement en surveillant

les crises et les marqueurs inflammatoires/la protéinurie (Knieper et al., 2017).

Le traitement de la FMF peut être divisé en trois parties :

- Le traitement des crises et la prophylaxie de l'amylose AA,
- Traitement des épisodes aigus,
- Gestion des affections comorbides et des complications.

Avant 1972 et l'observation séminale que la prophylaxie par la colchicine diminue les crises de la FMF et par conséquent le risque d'amylose AA, plus de 50 % des patients atteints de la FMF mouraient d'amylose (Sohar et al., 1967; Zemer et al., 1986). Mais même récemment, l'amylose AA est un problème majeur chez les patients atteints de FMF, affectant jusqu'à 10% des patients dans de grandes séries (Kasifoglu et al., 2014). Quatre essais contrôlés randomisés (Goldstein and Schwabe, 1974; Zemer et al., 1974) et des décennies d'expérience concrétisent la sécurité et l'efficacité de la colchicine dans le traitement de la FMF. Le risque d'amylose chez les patients qui adhèrent au traitement à la colchicine est inférieur à 1 % à long terme, même en l'absence d'un contrôle complet des crises (Zemer et al., 1986). Par conséquent, la prophylaxie à vie par la colchicine est recommandée chez tous les patients atteints de FMF, quels que soient les symptômes, à moins qu'un effet secondaire grave ne survienne ou une résistance à la colchicine (non-réponse) qui est un cas très rare (moins de 5%) on parle de colchicino-résistance, malgré des doses maximales de la colchicine et après avoir vérifié que l'observance est parfaite et qu'il n'y a pas d'autre maladie inflammatoire associée (Corsia et al., 2017; Gül, 2016; Ozen et al., 2016; Ozen et al., 2017). Dans ce cas les inhibiteurs de l'IL-1 sont les premiers candidats compte tenu de l'implication de cette interleukine dans la physiopathologie des crises. En France, les molécules inhibitrices de l'IL-1 disponibles sont l'anakinra et le canakinumab (Georgin-Lavialle et al., 2018), mais vu que la colchicine est le seul traitement qui a prouvé son efficacité pour prévenir l'apparition de l'amylose AA, il est conseillé de la poursuivre lorsqu'on introduit une biothérapie, par prudence on conserve 1 mg/j à adapter à la fonction rénale (Hentgen et al., 2013; Ozen et al., 2016). On l'arrêtera en cas de contre-indication à la colchicine et en cas de dialyse.

Chapitre II : Partie expérimentale

L'objectif de cette étude a consisté en l'identification du profil mutationnel du gène *MEFV* chez des patients Algériens cliniquement suspectés de FMF ; pour cela trois mutations, p.M694I, p.M694V et p.M680I, situées dans l'exon 10 ont été recherchées par la technique de PCR spécifique d'allèles ou PCR-ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*).

1 Patients

Cette étude a impliqué 13 patients (sept de sexe masculin et six de sexe féminin) non apparentés, recrutés des services de :

- Néphrologie (C.H.U. de Tlemcen),
- Pédiatrie (Hôpital central de l'armée, hôpitaux de Thénia et El-Bayad).

Pour chaque patient un questionnaire a été rempli pour obtenir des informations sur les :

- Données démographiques : sexe, date de naissance.
- Manifestations cliniques : fièvre, douleurs abdominales, articulaires et/ou thoraciques,
- Antécédents familiaux de la FMF et la consanguinité.
- Traitement à la colchicine.

2 Analyse génétique

La recherche des mutations p.M694I, p.M694V et p.M680I par PCR-ARMS a été réalisée à partir d'ADN génomique extrait à partir de sang total.

2.1 Extraction de l'ADN génomique à partir du sang total

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir du sang total, recueilli sur des tubes contenant un anticoagulant (EDTA).

La méthode utilisée est « salting-out » ou de relargage par les sels dont le principe est basé sur l'utilisation d'une solution saline saturée conduisant à l'élimination des protéines par précipitation (Miller et *al.*, 1988).

L'extraction d'ADN génomique passe par 3 étapes :

2.1.1 Isolement des leucocytes

Le sang est d'abord traité avec une solution hypotonique : la solution de lyse des globules rouges (SLR) à base de Tris (Tris-base 10 mM à pH 7.6 ; MgCl₂ 5 mM et le NaCl 10 mM). Après incubation pendant 20 minutes dans des bacs de glace, les tubes sont centrifugés (5000 rpm, 4°C, 10 minutes). Le surnageant est éliminé et le culot leucocytaire est traité de nouveau

par la solution de SLR. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention de culots leucocytaires clairs.

2.1.2 Lyse des leucocytes et déprotéinisation

Les leucocytes purifiés sont remis en suspension dans 1 à 2ml d'une solution de lyse des globules blancs ou SLB (Tris-base 10mM à pH 7.6 ; EDTA 10mM à pH 8 ; NaCl 10 mM), additionné d'un détergent ionique, le SDS (sodium dodécyl-sulfate) à une concentration finale de 1% et de la protéinase K à une concentration finale de 100µg/ml. L'incubation se fait au bain-Marie sous agitation, à 37°C pendant toute la nuit.

La déprotéinisation est réalisée avec 800µl d'une solution saline saturée de NaCl 6M. Après centrifugation (7000 rpm, 25 minutes, 4°C), les surnageants contenant l'ADN génomique sont récupérés.

2.1.3 Précipitation de l'ADN génomique par l'éthanol absolu

L'ADN génomique est précipité par l'éthanol absolu en ajoutant deux volumes aux surnageants, ce qui permet sa récupération sous forme de filaments blancs (méduse).

La méduse obtenue est ensuite transférée dans un autre tube, puis rincée avec l'alcool à 70%. Après séchage, l'ADN est dissout dans une solution stérile de T.E (Tris-base 10mM ; EDTA 0.2mM, pH 8).

La concentration d'ADN génomique extrait a été déterminée en mesurant la densité optique (D.O) à 260nm.

La pureté de l'ADN extrait a été estimée par le rapport de la DO 260 /280 (un ADN pur possède un rapport compris entre 1,8 et 2).

2.2 Recherche des mutations

La recherche des mutations ponctuelles connues p.M694I, p.M694V et p.M680I a été réalisée par la technique de la PCR-ARMS.

2.2.1 Principe de la PCR-ARMS

La PCR est une technique permettant d'amplifier *in vitro* des séquences d'ADN par répétition d'un cycle de trois étapes (Mullis, 1990) :

- Dénaturation initiale de l'ADN,
- Hybridation des amorces,
- Elongation des amorces.

La PCR-ARMS est une variante de la PCR, appliquée pour distinguer deux allèles d'un même gène ne différant que par un seul nucléotide. Ainsi, elle est appliquée pour l'étude d'un polymorphisme bi-allélique ou à la recherche d'une mutation ponctuelle (Chiaroni et *al.*, 2011). Elle est basée sur le principe de mésappariement d'une amorce en 3' qui empêche l'amplification du fragment. Cette technique nécessite l'utilisation d'une ADN polymérase dépourvue d'une activité exonucléase 3'-5'.

Deux amplifications sont réalisées en parallèle. Une des amorces est commune aux deux réactions d'amplifications. La deuxième amorce existe en deux versions ne différant que par le dernier nucléotide en 3' :

- L'une spécifique de l'allèle normal qui s'hybride et amplifie spécifiquement l'allèle normal,
- L'autre spécifique de la séquence mutante s'hybride et amplifie l'allèle muté (Chiaroni et *al.*, 2011 ; Vassias, 2012) (Figure 5).

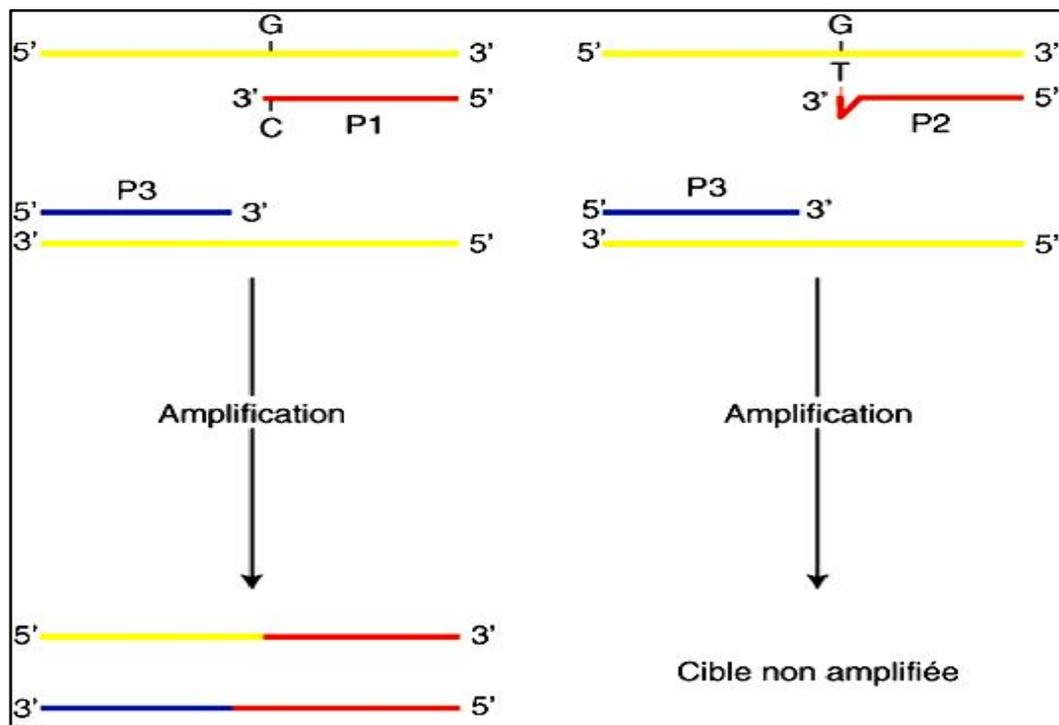


Figure 5: schéma légendé du Principe de la PCR-ARMS.

Les amorces P1 et P2 diffèrent en 3' d'une base. L'amorce P2 ne permettra pas l'amplification de l'allèle car le mésappariement en 3' ne permet pas l'élongation de l'amorce (Vassias, 2012).

2.2.2 Détection des mutations par PCR-ARMS

L'application de la PCR-ARMS pour l'identification des mutations touchant l'exon 10 du gène *MEFV* a été introduite par Eisenberg et al. (Eisenberg et al., 1998).

Pour chaque mutation recherchée, un couple d'amorces spécifiques a été utilisé (**Tableau I**).

Tableau I: Séquence des amorces utilisées pour l'identification des mutations recherchées (Eisenberg et al., 1998).

Amorces	Séquences des amorces	Taille de l'amplicon
p.M694I c.2082G>A	5'-TATCATTGTTCTGGGCTC-3'(C) 5'-CTGGTACTCATTTCCTTC-3' (N) 5'-CTGGTACTCATTTCCTTT-3' (M)	184pb
p.M694V c.2080A>G	5'-TGACAGCTGTATCATTGTTCTGGGCTCTCCG-3'(C) 5'-TCGGGGGAACGCTGGACGCCTGGTACTCATTTCCTTCCT-3'(N) 5'-TCGGGGGAACGCTGGACGCCTGGTACTCATTTCCTTCCC-3'(M)	212Pb
p.M680I c.2040G>C	5'-TTAGACTTGGAACAAGTGGGAGAGGCTGC-3' (C) 5'-ATTATCACCACCCAGTAGCCATTCTCTGGCGACAGAGCC-3'(N) 5'-ATTATCACCACCCAGTAGCCATTCTCTGGCGACAGAGCG-3'(M)	230pb

C : amorce commune ; N : amorce spécifique de l'allèle normal ; M : amorce spécifique de l'allèle muté

Les mutations recherchées touchent une partie de la séquence de l'exon10 du *MEFV* (Figure 6)

5'-TTAATGT					
GATTCTGGAT	GCAGAAACCG	CTTACCCCAA	CCTCATCTTC	TCTGATGATC	TGAAGAGTGT
TAGACTTGGA	AACAAGTGGG	AGAGGCTGCC	TGATGGCCCG	CAAAGATTTG	ACAGCTGTAT
CATTGTICTG	GGCTCTCCGA	GTTTCCTCTC	TGGCCGCCGT	TACTGGGAGG	TGGAGGTTGG
AGACAAGACA	GCATGGATCC	TGGGAGCCTG	CAAGACATCC	ATAAGCAGGA	AAGGGAACAT
GGCTCTGTCC	CCAGAGAATG	GCTACTGGGT	GGTGATAATG	AGGAAGGAAA	ATGAGTACCA
↓				↓ ↓	
C			c.2080A>G	GA c.2082G>A	
c.2040G>Cp.M			p.M694V	p.M694I	
680I					
GGCGTCCAGC	GTTCCCCCGA	CCCGCCTGCT	AATAAAGGAG	CCTCCCAAGC	GTGTGGGCAT-3'

Figure 6: Séquence amplifiée montrant les mutations recherchées (<https://infevers.umai-montpellier.fr/>).

En pratique, pour chaque échantillon d'ADN, deux réactions de PCR sont réalisées :

- Réaction 1 : concerne l'amplification de l'allèle normal avec l'amorce commune et l'amorce spécifique de l'allèle normal.
- Réaction 2 : concerne l'amplification de l'allèle muté avec l'amorce commune et l'amorce spécifique de l'allèle muté.

La PCR-ARMS est une technique qui permet de mettre en évidence trois situations possibles :

- a. La présence d'une bande d'amplification avec l'amorce spécifique de l'allèle normal seulement.
- b. Présence d'une mutation à l'état hétérozygote : présence d'une bande d'amplification avec l'amorce spécifique de l'allèle normal et une amplification avec l'amorce spécifique de l'allèle muté.
- c. Présence d'une bande d'amplification uniquement avec l'amorce spécifique à l'allèle muté : la mutation est à l'état homozygote.

La composition des milieux réactionnels pour les trois mutations diffère par la concentration en MgCl₂ en fonction de la mutation recherchée.

Tableau II: Composition du milieu réactionnel

Composants	Concentration finale des réactifs		
	p.M694I	p.M694V	p.M680I
Tampon de PCR(5X)	1X	1X	1X
MgCl ₂ (25mM)	3.5mM	1.5mM	1.5mM
dNTP(10mM)	0.2mM	0.2mM	0.2mM
Amorce commune (10μM)	0.1μM	0.1μM	0.1μM
Amorce N ou M(10μM)	0.1μM	0.1μM	0.1μM
<i>Taq</i> polymérase	0.25U	0.25U	0.25U
Eau ultra-pure, QSP	100μl	100μl	100μl

Les réactions de PCR se font dans un volume réactionnel de 25μl par tube: 2μl d'un échantillon d'ADN génomique à analyser (100- 200ng/μl) et 23μl du mélange réactionnel. Parallèlement aux échantillons d'ADN à analyser, 2 témoins dont les génotypes sont connus sont mis à amplifier :

Un témoin positif qui possède la mutation recherchée à l'état homozygote ou hétérozygote.

Un témoin normal qui ne possède pas de mutation.

Un témoin négatif (dans lequel l'ADN est remplacé par 2μl d'eau ultra-pure ayant servi au mélange réactionnel) a été également mis à amplifier dans les mêmes conditions que les autres échantillons.

Les conditions d'amplification sont spécifiques à chacune des trois mutations recherchées avec une différence portant sur les températures d'hybridation des amorces (Tableau III).

Tableau III: Conditions d'amplification

Les étapes de PCR		Mutation recherchées		
		p.M694I	p.M694V	p.M680I
Dénaturation initiale de l'ADN		94°C,10min	94°C,10min	94°C,10min
35 Cycles	Dénaturation	94°C, 15s	94°C,15s	94°C,15s
	Hybridation	56°C,30s	63°C, 30s	63°C,30s
	Elongation	72°C,10s	72°C,10s	72°C,10s
Elongation finale		72°C,10min	72°C,10min	72°C,10min

2.3 Electrophorèse et visualisation des produits d'amplification

L'électrophorèse sur un gel d'agarose consiste à séparer les macromolécules en fonction de leur vitesse de déplacement à travers un gel sous l'effet d'un champ électrique. Etant chargés négativement, les acides nucléiques migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur taille (Aaij and Borst, 1972).

La séparation des fragments amplifiés se fait par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5%. Le gel est préparé dans le tampon T.B.E.1X (Tris-base 53.9 g ; Borate 27.5g ; EDTA 2Na 3.72g ; pH=8.3) mélangé au bromure d'éthidium (0.5µg/ml), un agent fluorescent qui permet la visualisation des bandes d'ADN sous la lumière ultra-violette.

12 µl de chaque réaction de PCR sont mélangés avec 3µl de tampon de charge (tampon de dépôt dont la concentration est 6X), puis mis à migrer pendant 30min dans un champ électrique de 100V. Les marqueurs de taille ainsi que les témoins (positifs et négatif) sont également mis à migrer en même temps que les produits PCR.

Les bandes de migration sont révélés par les rayons UV émis par un trans-illuminateur relié à un écran d'ordinateur.

Chapitre III : Résultats et discussion

1 Résultats

1.1 Traitement des données cliniques des patients

L'analyse des données des patients choisis pour cette étude nous ont permis de savoir que la plupart des patients sont moins de 16ans donc à l'âge pédiatrique et seulement quatre patients qui ont dépassés 30ans.

Les symptômes cliniques des 13 patients étudiés sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (Figure 7)

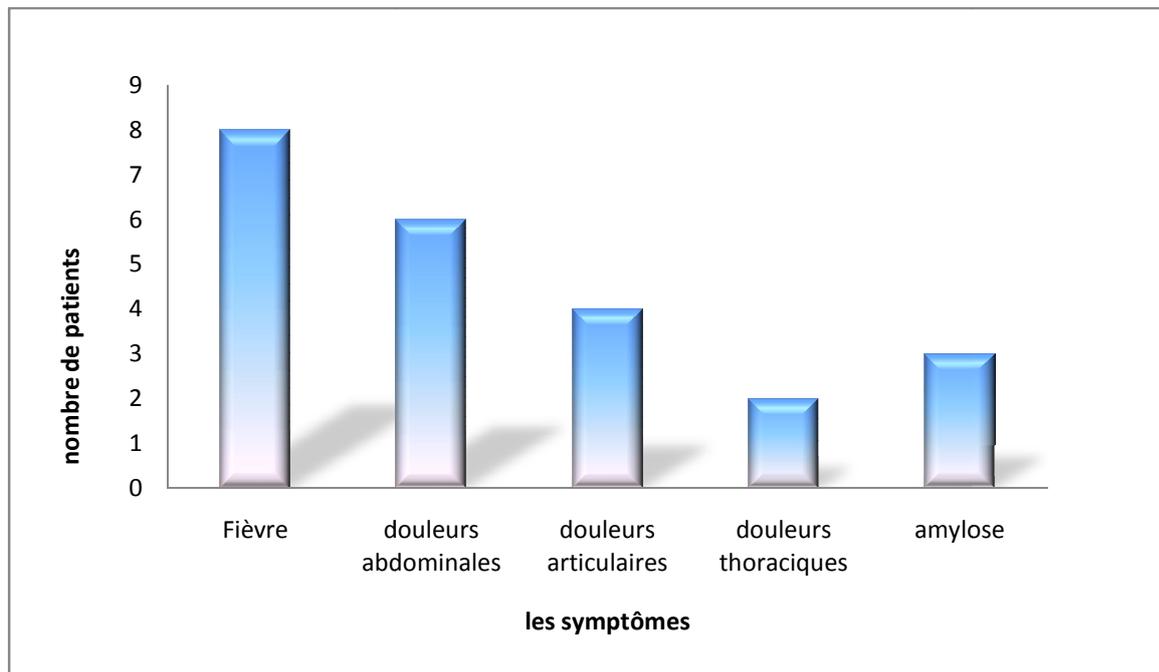


Figure 7:Répartition des signes cliniques de FMF observés dans notre cohorte.

La fièvre est le symptôme le plus dominant et on la trouve chez 8 patients sur 10 (les trois autres patients on n'a pas eu assez de données cliniques sur eux) suivie de douleurs abdominales comme étant le symptôme le plus courant chez ces patients.

L'amylose n'a été observé que chez trois patients uniquement dont l'âge est plus de 40ans.

1.2 Quantification et évaluation de la qualité de l'ADN

La méthode d'extraction de (salting-out) a permis l'obtention d'un ADN génomique en quantité et en qualité assez suffisantes pour réaliser l'analyse moléculaire par PCR-ARMS. Les concentrations de l'ADN varient entre 63-1099 μ g/ml (Tableau VI, annexe 1).

Les valeurs du rapport 260/280 varient entre 1,18-1,69 (Tableau VI, annexe 1). Etant inférieures à 1,8, les valeurs du rapport montrent une contamination de l'ADN extrait par les protéines.

1.3 Recherche de mutations

Parmi les patients analysés, quatre étaient porteurs d'au moins l'une des mutations recherchées, soit 30,77%.

Chez le reste des patients, aucune mutation n'a été identifiée.

a) La mutation p.M694I

L'analyse des profils électrophorétiques obtenus a montré que :

- Un patient (P1) était porteur de cette mutation à l'état homozygote (Figure 8), alors que le patient P17 était hétérozygote (Figure 9).

b) La mutation p.M694V

Cette mutation a été identifiée à l'état hétérozygote chez deux patients (P7 et P9) (Figure 10).

c) La mutation p.M680I

Ce variant a été identifié chez un seul patient (P7) (Figure 11)

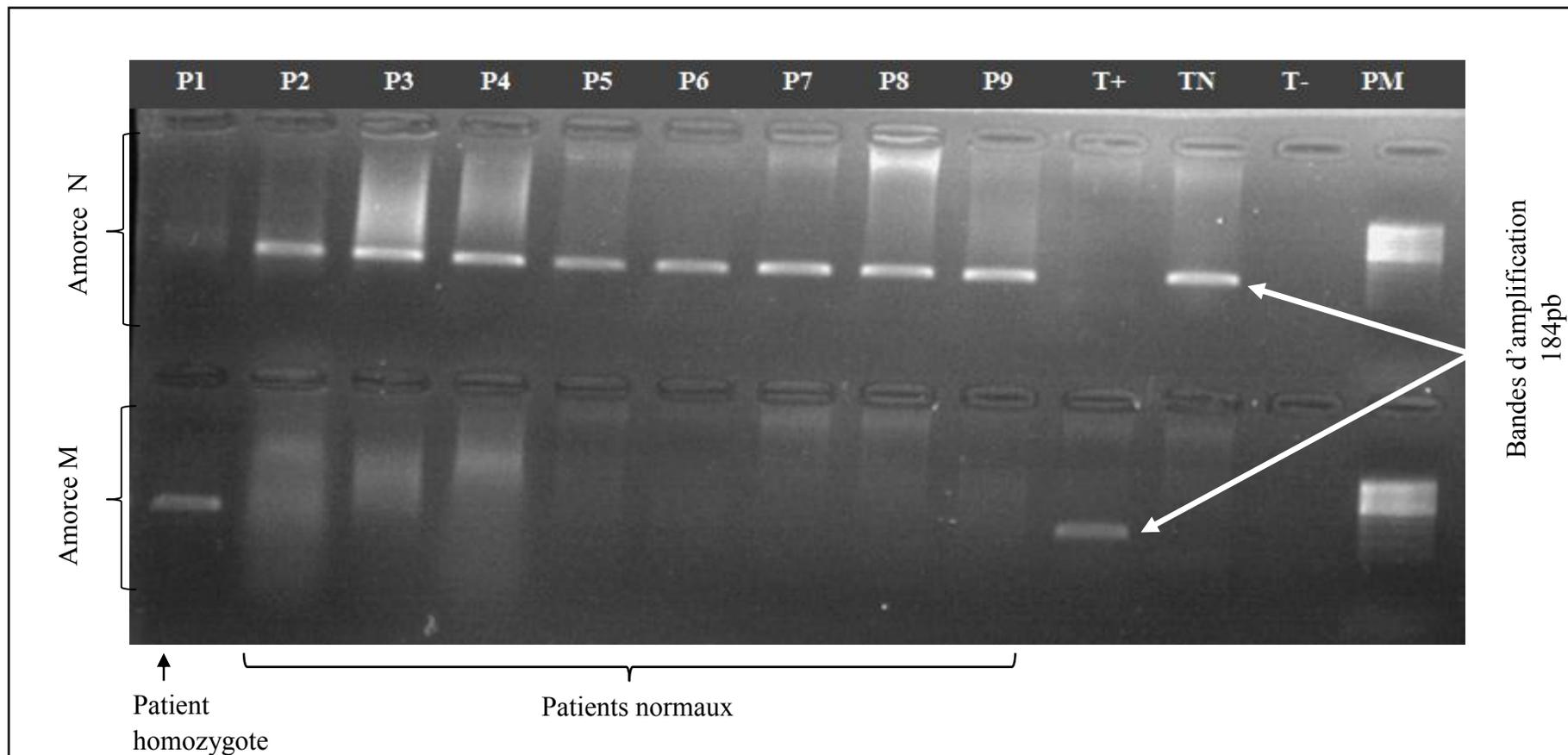


Figure 8: Profil électrophorétique sur un gel d'agarose de 1,5% pour la mise en évidence de la mutation p.M694I.

(P : patients ; T⁺ : Témoin porteur de p.M694I à l'état homozygote ; T^N : Témoin normal ; T⁻ : Témoin négatif, PM : marqueur de taille 100pb)

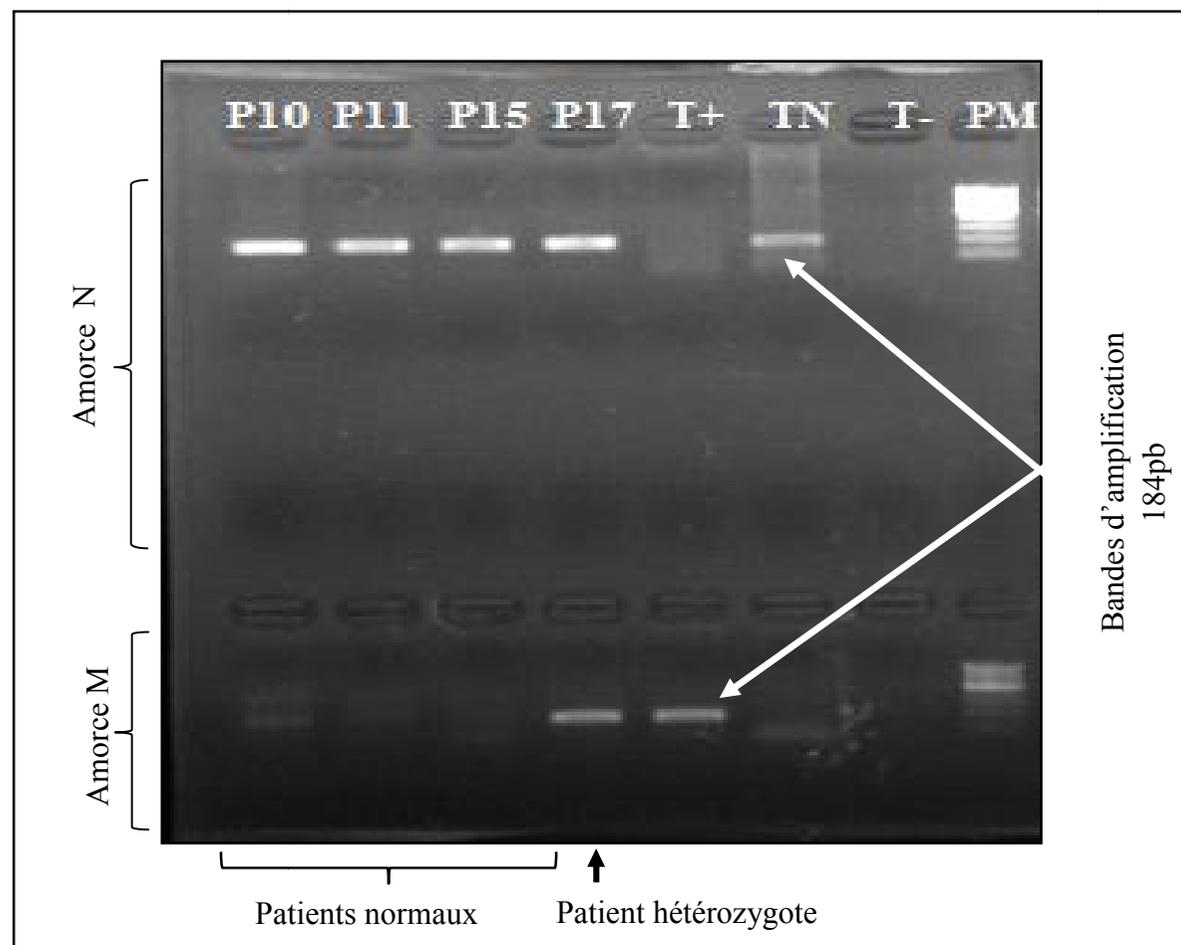


Figure 9: Profil électrophorétique sur un gel d'agarose de 1,5% pour la mise en évidence de la mutation p.M694I

(P : patients ; T⁺ : Témoin porteur de p.M694I à l'état homozygote ; T^N : Témoin normal ; T⁻ : Témoin négatif, PM : marqueur de taille 100pb)

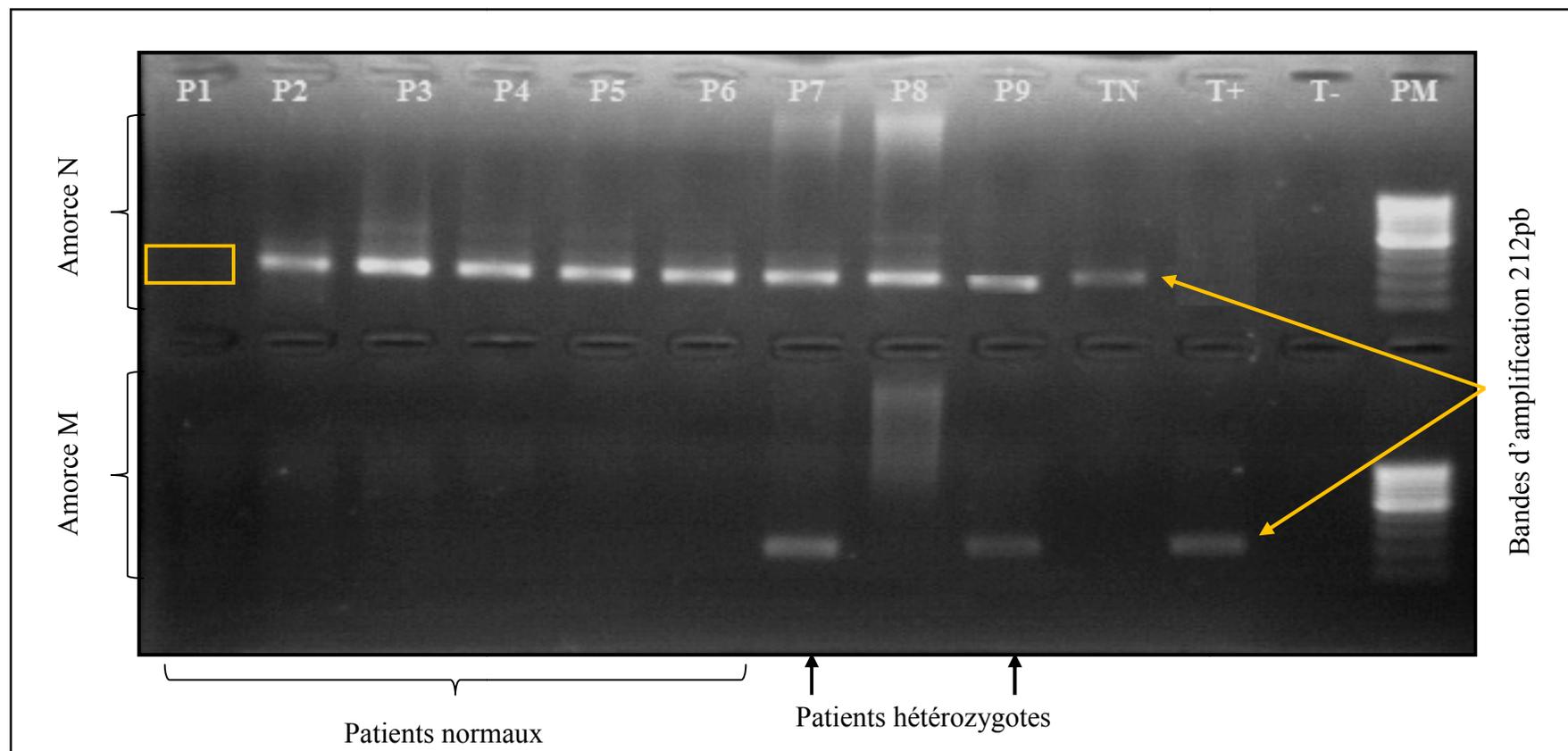


Figure 10: Profil électrophorétique sur un gel d'agarose de 1,5% pour la mise en évidence de la mutation p.M694V.

(P : patients ; T⁺ : Témoin positif homozygote pour p.M694V ; TN : Témoin normal ; T- : Témoin négatif ; PM : marqueur de taille 100pb)

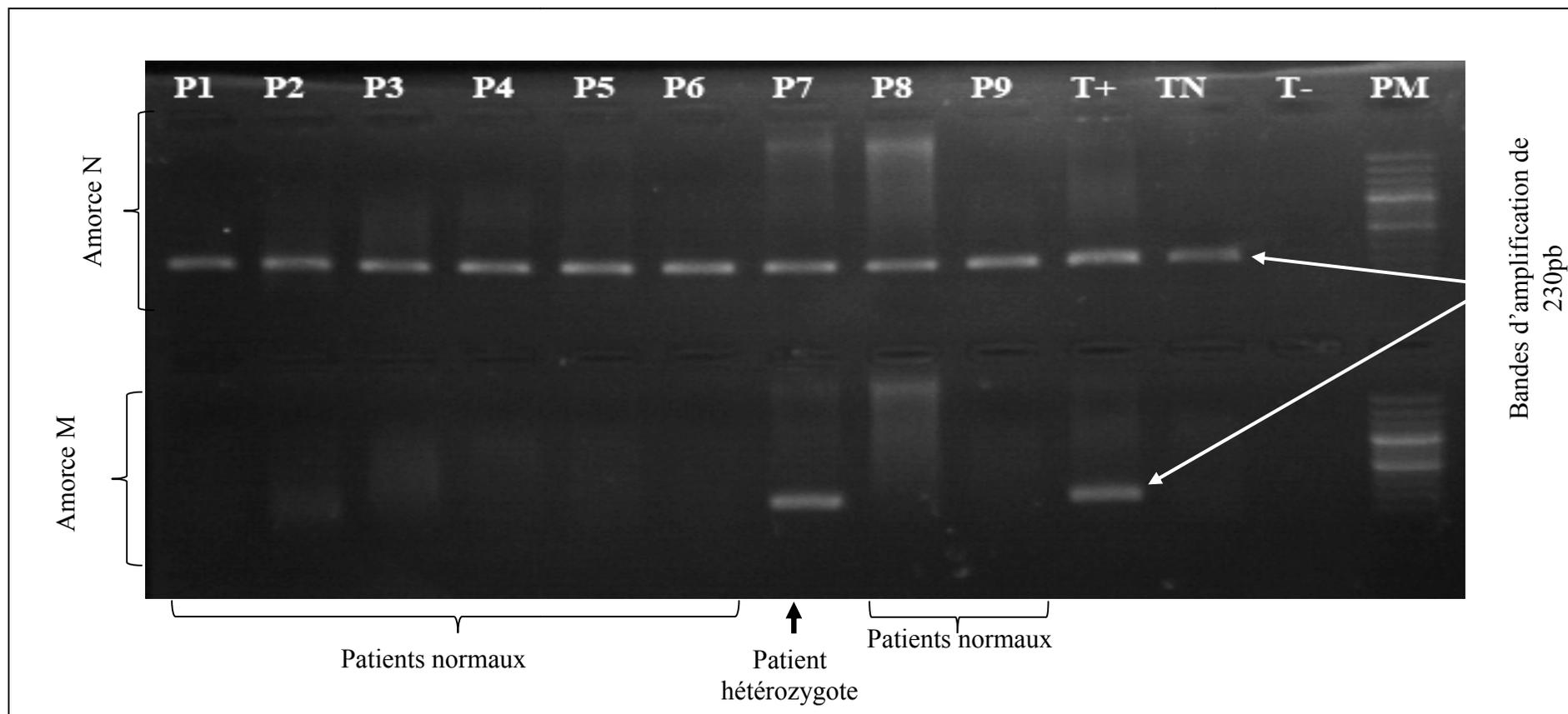


Figure 11: Profil électrophorétique sur un gel d'agarose de 1,5% pour la mise en évidence de la mutation p.M680I.

(P : patients, T+ : Témoin positif hétérozygote ; TN : Témoin normal ; T- : Témoin négatif ; PM : marqueur de taille 100pb)

Ainsi, les résultats obtenus ont permis d'identifier 4 génotypes dont l'un à l'état homozygote (M694I/M694I) et l'autre à l'état hétérozygote composite (M694I/M694V) (Tableau IV).

Tableau IV: Les différents génotypes obtenus lors de l'analyse de l'ADNg des 13 patients.

		Nombre de patients N= 13	Pourcentage
Homozygote	M694I/M694I	1	7,69%
	M694V/M680I	1	7,69%
	M694V/WT	1	7,69%
	M694I/WT	1	7,69%
	WT/WT	9	69,2%

WT : wild type ; non porteurs de mutations recherchées.

1.3.1 Fréquence des allèles mutés

Au cours de cette étude 26 allèles ont été analysés dont uniquement 6 qui sont porteurs des mutations recherchées (Tableau V).

Tableau V: Fréquence allélique des mutations identifiées

	Homozygote	Hétérozygote	Nombre d'allèles mutés (%)	Fréquences alléliques (n=26)
p.M694I	1	1	3 (50%)	11,5%
p.M694V	0	2	2 (33,3%)	7,7%
p.M680I	0	1	1 (16,7%)	3,8%
Total	1	4	6 (100%)	23%

Ainsi, la p.M680I est la moins fréquente selon les résultats des fréquences alléliques des mutations identifiées (Tableau V).

2 Discussion

La FMF est la plus ancienne et la plus fréquente de toutes les fièvres récurrentes héréditaires décrites. Les populations originaires du bassin méditerranéen sont les plus exposées à la FMF, mais cette maladie est de plus en plus reconnue dans de nombreuses régions du monde (Ozdogan and Ugurlu, 2019; Verrecchia et al., 2015).

La gravité de cette maladie est due à la complication de type amylose rénale AA qui peut être rencontrée chez 50% de patients (Obici and Merlini, 2012). Avant mise en place du traitement à la colchicine, la complication rénale était responsable de 67% de décès (Sohar et al., 1967). Des études plus récentes ont montré que la complication rénale reste fatale pour 35 à 60% de patients FMF (Twig et al., 2014). En Algérie, un taux de décès de 42,8% a été rapporté parmi les patients en stade terminal de l'insuffisance rénale ou dialyse (Ait-Idir et al., 2017) Ces données démontrent l'importance d'une analyse génétique précoce chez les patients suspectés de FMF.

Les Maghrébins sont susceptibles de développer la FMF comme les autres populations du bassin méditerranéen mais le gène *MEFV* a été très peu étudié chez ces populations. Cependant, les résultats disponibles ont montré que ces populations partagent quelques variants pathogènes en commun dont p.M694I, p.M694V et p.M680I, mais dont la distribution est variable (Ait-Idir and Djerdjouri, 2020)

Au cours de cette étude, trois mutations (p.M694I, p.M694V et p.M680I) localisées dans l'exon 10 du gène *MEFV* ont été recherchées chez 13 patients suspectés de FMF. Ces variants étant les plus réponsus et les plus récurrents chez les patients Algériens (Ait-Idir and Djerdjouri, 2020).

Les résultats obtenus à partir des 13 patients analysés ont montré que seuls deux d'entre eux étaient porteurs de p.M694I, deux étaient porteurs de p.M694V, tandis que la mutation p.M680I a été identifiée chez un seul patient. L'homozygotie pour p.M694I a été rencontrée uniquement chez un seul patient. D'autres patients étaient porteurs de mutation à l'état hétérozygote ou d'aucune mutation recherchée. La taille de l'échantillon analysé dans cette étude est très réduite ; ainsi, les résultats obtenus ne permettent pas d'observer une prédominance d'une mutation par rapport à l'autre.

Le variant p.M694I est le variant pathogène le plus récurrent caractérisant les patients algériens, alors que chez les patients marocains et tunisiens, il est en deuxième position après

p.M694V, et représente, respectivement, 37% et 25% des allèles mutants (Belmahi et *al.*, 2006). La prédominance du p.M694V chez les patients marocains a été confirmée ultérieurement (47%) (Belmahi et *al.*, 2012), alors qu'il est présent avec une fréquence plus faible (14,5%) chez les patients algériens atteints de FMF. Chez les Tunisiens, p.M680I apparaît comme le variant pathogène le plus fréquent (32%), suivi de p.M694V (27%), et de p.M694I (13%) (Chaabouni et *al.*, 2007).

Dans une large étude menée sur 14 populations Méditerranéennes (Arabes, Arménienne, Crétoise, Chypriote, Française, Grecque, Italienne, Juives, Jordanienne, Libanaise, Espagnole, Syrienne, Tunisienne et Turc), la mutation p.M694V était prédominante, rencontrée chez 39,6% des 5915 patients analysés, suivie de p.V726A (13,9%), p.M680I (11,4%), p.E148Q (3,4%), alors que p.M694I était présente uniquement chez 2,9% des patients (Papadopoulos et *al.*, 2008) Ainsi en comparaison aux autres populations originaires du bassin Méditerranéen, les patients FMF Algériens semblent se démarquer par la prédominance de la mutation p.M694I.

Dans une étude comparative entre la population Japonaise et les populations Méditerranéennes, il a été montré que la mutation la plus fréquente chez les patients japonais était p.E148Q (40,2%), suivie de p.M694I (21,0%). En revanche, les mutations courantes observées chez les patients Méditerranéens, telles que p.M694V, p.V726A et p.M680I, n'ont pas été détectées dans cette population. Les caractéristiques cliniques du p.M694I étaient associées à une évolution clinique plus sévère par rapport à celles observées avec p.E148Q (Kishida et *al.*, 2014).

Lors de notre recherche des mutations citées plus haut, trois patients hétérozygotes ont été identifiés. Chez ces patients hétérozygotes, la présence d'un seul allèle muté n'exclut pas la présence d'une autre mutation sur le même exon ou sur un autre exon à l'état hétérozygote composite. Comme, il n'est pas exclu que ce génotype soit définitif. En effet, des cas de FMF hétérozygotes avec une seule mutation sont de plus en plus décrits (Marek-Yagel et *al.*, 2009). Environ, 1/3 des patients FMF sont porteurs d'une seule mutation et développent des signes cliniques bien qu'elle soit récessive (Ben-Chetrit et *al.*, 2009), posant ainsi l'éventualité d'une dominance chez certaines familles (Aldea et *al.*, 2004; Booth et *al.*, 2000).

La présence d'un seul variant pathogène du *MEFV* associé à des symptômes cliniques est suffisante pour justifier l'initiation d'un traitement à la colchicine. D'autre part, les patients hétérozygotes qui présentent un cas grave de FMF sont très probablement porteurs d'une

mutation moins courante non détectée dans leur gène *MEFV* et leur génotype doit être analysé plus en détail par séquençage (Moradian et al., 2010).

D'autre part, on a également identifié 9 patients qui ont présentés des manifestations cliniques de la FMF sans porter aucune des trois mutations recherchées qui sont communes en Algérie. L'absence des trois mutations recherchées chez le reste des patients n'exclut pas la présence d'autres mutations. Comme il est probable que certains de ces patients ne soient pas porteurs de mutations. Des cas de FMF sans mutations dans le *MEFV* ont été rapportés et la proportion peut atteindre 50% chez les patients Arabes.(El-Shanti et al., 2006)

Selon Ben-Chetrit et al., (2002), près de 60 % des personnes testées d'origine nord-africaine ne présentaient aucune mutation, ce qui suggère que l'ethnicité a été un facteur important dans la décision de rechercher d'autres mutations de FMF (Ben-Chetrit et al., 2002).

Bien que la FMF soit une maladie autoinflammatoire relativement bien décrite, il reste encore un certain nombre de questions non encore résolus, tels que le mécanisme exact de la maladie, les hétérozygotes symptomatiques et leur traitement, et le gestion de la résistance à la colchicine (Özen et al., 2017).

Conclusion

Conclusion

Le sujet de ce mémoire est basé sur la fièvre méditerranéenne familiale en particulier sur la recherche des trois mutations (p.M694I, p.M694V et p.M680I), les plus courantes qui touchent l'exon 10 du gène *MEFV* chez la population Algérienne.

Et comme résultats, un homozygote du variant pathogène p.M694I le plus récurrent chez les patients algériens a été identifié chez l'un des patients analysés qui pourrait développer une amylose s'il ne sera pas pris en charge à la colchicine. Trois autres patients porteurs d'un profil génotypique à l'état hétérozygote dont l'un à l'état hétérozygote composite, tandis que le reste des patients ne sont porteurs d'aucune des trois mutations recherchées, n'empêche qu'ils pourraient être porteurs d'autres mutations très rares qui provoquent un cas sévère de la maladie qui est l'Amylose rénale qui a été identifiée chez trois de ces patients. C'est pour cela que l'exploration moléculaire du gène *MEFV* devrait être poursuivie par recrutement de nouveaux patients potentiels pour prévenir quelconques complications sévères de la maladie chez les patients FMF dans le futur.

Perspectives

Perspectives

- Sensibilisation des médecins pour l'instauration d'un diagnostic génétique de la FMF en Algérie.
- Nous espérons que ce travail suscitera et renforcera la collaboration entre cliniciens et biologistes au service de la médecine et des malades.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

The International FMF Consortium, 1997. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 90, 797-807.

Aaij, C., Borst, P., 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 269, 192-200.

Ait-Idir, D., Djerdjouri, B., 2020. Differential mutational profiles of familial Mediterranean fever in North Africa. *Ann Hum Genet* 84, 423-430.

Ait-Idir, D., Djerdjouri, B., Bouldjennet, F., Taha, R.Z., El-Shanti, H., Sari-Hamidou, R., Khellaf, G., Benmansour, M., Benabadji, M., Haddoum, F., 2017. The M694I/M694I genotype: A genetic risk factor of AA-amyloidosis in a group of Algerian patients with familial Mediterranean fever. *Eur J Med Genet* 60, 149-153.

Aldea, A., Campistol, J.M., Arostegui, J.I., Rius, J., Maso, M., Vives, J., Yagüe, J., 2004. A severe autosomal-dominant periodic inflammatory disorder with renal AA amyloidosis and colchicine resistance associated to the MEFV H478Y variant in a Spanish kindred: an unusual familial Mediterranean fever phenotype or another MEFV-associated periodic inflammatory disorder? *Am J Med Genet A* 1, 67-73.

Belmahi, L., Cherkaoui, I.J., Hama, I., Sefiani, A., 2012. MEFV mutations in Moroccan patients suffering from familial Mediterranean Fever. *Rheumatol Int* 32, 981-984.

Belmahi, L., Sefiani, A., Fouveau, C., Feingold, J., Delpech, M., Grateau, G., Dodé, C., 2006. Prevalence and distribution of MEFV mutations among Arabs from the Maghreb patients suffering from familial Mediterranean fever. *C R Biol* 329, 71-74.

Ben-Chetrit, E., Levy, M., 1998. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 351, 659-664.

Ben-Chetrit, E., Peleg, H., Aamar, S., Heyman, S.N., 2009. The spectrum of MEFV clinical presentations--is it familial Mediterranean fever only? *Rheumatology* 48, 1455-1459.

Ben-Chetrit, E., Touitou, I., 2009. Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum* 61, 1447-1453.

Ben-Chetrit, E., Urieli-Shoval, S., Calko, S., Abeliovich, D., Matzner, Y., 2002. Molecular diagnosis of FMF: lessons from a study of 446 unrelated individuals. *Clin Exp Rheumatol* 20, S25-29.

Booth, D.R., Gillmore, J.D., Lachmann, H.J., Booth, S.E., Bybee, A., Soytürk, M., Akar, S., Pepys, M.B., Tunca, M., Hawkins, P.N., 2000. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *Qjm* 93, 217-221.

Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C., Kingma, D.W., Horwitz, M.E., Mansfield, E., Holland, S.M., O'Shea, J.J., Rosenberg, H.F., Malech, H.L., Kastner, D.L., 2000. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 95, 3223-3231.

- Chaabouni, H.B., Ksantini, M., M'Rad, R., Kharrat, M., Chaabouni, M., Maazoul, F., Bahloul, Z., Ben Jemaa, L., Ben Moussa, F., Ben Chaabane, T., Mrad, S., Touitou, I., Smaoui, N., 2007. MEFV mutations in Tunisian patients suffering from familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 36, 397-401.
- Corsia, A., Georgin-Lavialle, S., Hentgen, V., Hachulla, E., Grateau, G., Faye, A., Quartier, P., Rossi-Semerano, L., Koné-Paut, I., 2017. A survey of resistance to colchicine treatment for French patients with familial Mediterranean fever. *Orphanet J Rare Dis* 12, 017-0609.
- Di Donato, G., d'Angelo, D.M., Breda, L., Chiarelli, F., 2021. Monogenic Autoinflammatory Diseases: State of the Art and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 22.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Schönland, S.O., Hegenbart, U., Lohse, P., Beimler, J., Wahlster, L., Ho, A.D., Lorenz, H.M., Blank, N., 2013. Familial Mediterranean fever in Germany: clinical presentation and amyloidosis risk. *Scand J Rheumatol* 42, 52-58.
- Ece, A., Çakmak, E., Uluca, Ü., Kelekçi, S., Yolbaş, İ., Güneş, A., Yel, S., Tan, İ., Şen, V., 2014. The MEFV mutations and their clinical correlations in children with familial Mediterranean fever in southeast Turkey. *Rheumatol Int* 34, 207-212.
- Eisenberg, S., Aksentijevich, I., Deng, Z., Kastner, D.L., Matzner, Y., 1998. Diagnosis of familial Mediterranean fever by a molecular genetics method. *Ann Intern Med* 129, 539-542.
- El-Shanti, H., Majeed, H.A., El-Khateeb, M., 2006. Familial mediterranean fever in Arabs. *Lancet* 367, 1016-1024.
- Gao, W., Yang, J., Liu, W., Wang, Y., Shao, F., 2016. Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 1.
- Georgin-Lavialle, S., Hentgen, V., Stankovic Stojanovic, K., Bachmeyer, C., Rodrigues, F., Savey, L., Abbara, S., Conan, P.L., Fraisse, T., Delplanque, M., Rouet, A., Sbeih, N., Koné-Paut, I., Grateau, G., 2018. [Familial Mediterranean fever]. *Rev Med Interne* 39, 240-255.
- Goldfinger, S.E., 1972. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 287.
- Goldstein, R.C., Schwabe, A.D., 1974. Prophylactic colchicine therapy in familial Mediterranean fever. A controlled, double-blind study. *Ann Intern Med* 81, 792-794.
- Gül, A., 2016. Approach to the patients with inadequate response to colchicine in familial Mediterranean fever. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 30, 296-303.
- Hentgen, V., Grateau, G., Kone-Paut, I., Livneh, A., Padeh, S., Rozenbaum, M., Amselem, S., Gershoni-Baruch, R., Touitou, I., Ben-Chetrit, E., 2013. Evidence-based recommendations for the practical management of Familial Mediterranean Fever. *Semin Arthritis Rheum* 43, 387-391.
- Jalkh, N., Génin, E., Chouery, E., Delague, V., Medlej-Hashim, M., Idrac, C.A., Mégarbané, A., Serre, J.L., 2008. Familial Mediterranean Fever in Lebanon: founder effects for different MEFV mutations. *Ann Hum Genet* 72, 41-47.

Kasifoglu, T., Bilge, S.Y., Sari, I., Solmaz, D., Senel, S., Emmungil, H., Kilic, L., Oner, S.Y., Yildiz, F., Yilmaz, S., Bakirli, D.E., Tufan, M.A., Yazisiz, V., Pehlivan, Y., Bes, C., Cetin, G.Y., Erten, S., Gonullu, E., Temel, T., Sahin, F., Akar, S., Aksu, K., Kalyoncu, U., Direskeneli, H., Erken, E., Kisacik, B., Sayarlioglu, M., Korkmaz, C., 2014. Amyloidosis and its related factors in Turkish patients with familial Mediterranean fever: a multicentre study. *Rheumatology* 53, 741-745.

Kishida, D., Nakamura, A., Yazaki, M., Tsuchiya-Suzuki, A., Matsuda, M., Ikeda, S., 2014. Genotype-phenotype correlation in Japanese patients with familial Mediterranean fever: differences in genotype and clinical features between Japanese and Mediterranean populations. *Arthritis Res Ther* 16, 014-0439.

Knieper, A.M., Klotsche, J., Lainka, E., Berger, T., Dressler, F., Jansson, A.F., Rietschel, C., Oommen, P.T., Berendes, R., Niehues, T., Neudorf, U., Foell, D., Wittkowski, H., Kallinich, T., 2017. Familial Mediterranean fever in children and adolescents: factors for colchicine dosage and predicting parameters for dose increase. *Rheumatology* 56, 1597-1606.

Marek-Yagel, D., Berkun, Y., Padeh, S., Abu, A., Reznik-Wolf, H., Livneh, A., Pras, M., Pras, E., 2009. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 60, 1862-1866.

McDermott, M.F., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E.M., Ogunkolade, B.W., Centola, M., Mansfield, E., Gadina, M., Karenko, L., Pettersson, T., McCarthy, J., Frucht, D.M., Aringer, M., Torosyan, Y., Teppo, A.M., Wilson, M., Karaarslan, H.M., Wan, Y., Todd, I., Wood, G., Schlimgen, R., Kumarajeewa, T.R., Cooper, S.M., Vella, J.P., Amos, C.I., Mulley, J., Quane, K.A., Molloy, M.G., Ranki, A., Powell, R.J., Hitman, G.A., O'Shea, J.J., Kastner, D.L., 1999. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 97, 133-144.

Medlej-Hashim, M., Delague, V., Chouery, E., Salem, N., Rawashdeh, M., Lefranc, G., Loiselet, J., M egarban e, A., 2004. Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAA1 and MICA polymorphisms effects. *BMC Med Genet* 5, 1471-2350.

Migita, K., Izumi, Y., Jiuchi, Y., Iwanaga, N., Kawahara, C., Agematsu, K., Yachie, A., Masumoto, J., Fujikawa, K., Yamasaki, S., Nakamura, T., Ubara, Y., Koga, T., Nakashima, Y., Shimizu, T., Umeda, M., Nonaka, F., Yasunami, M., Eguchi, K., Yoshiura, K., Kawakami, A., 2016. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Japan. *Arthritis Res Ther* 18, 016-1071.

Milenkovi c J, M., Stojanovi c D, R., Najdanovi c J, G., 2020. Adaptation to Mediterranea, Genetic Variation. <https://www.intechopen.com/books/genetic-variation/adaptation-to-mediterranea>.

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16.

Moradian, M.M., Sarkisian, T., Ajrapetyan, H., Avanesian, N., 2010. Genotype-phenotype studies in a large cohort of Armenian patients with familial Mediterranean fever suggest clinical disease with heterozygous MEFV mutations. *J Hum Genet* 55, 389-393.

- Mullis, K.B., 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 48, 579-582.
- Obici, L., Merlini, G., 2012. Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. *Autoimmun Rev* 12, 14-17.
- Ozdogan, H., Ugurlu, S., 2019. Familial Mediterranean Fever. *Presse Med* 48, e61-e76.
- Özen, S., Batu, E.D., Demir, S., 2017. Familial Mediterranean Fever: Recent Developments in Pathogenesis and New Recommendations for Management. *Frontiers in immunology* 8.
- Ozen, S., Demirkaya, E., Erer, B., Livneh, A., Ben-Chetrit, E., Giancane, G., Ozdogan, H., Abu, I., Gattorno, M., Hawkins, P.N., Yuce, S., Kallinich, T., Bilginer, Y., Kastner, D., Carmona, L., 2016. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 75, 644-651.
- Ozen, S., Kone-Paut, I., Gül, A., 2017. Colchicine resistance and intolerance in familial mediterranean fever: Definition, causes, and alternative treatments. *Semin Arthritis Rheum* 47, 115-120.
- Padeh, S., Berkun, Y., 2016. Familial Mediterranean fever. *Curr Opin Rheumatol* 28, 523-529.
- Papadopoulos, V.P., Giaglis, S., Mitroulis, I., Ritis, K., 2008. The population genetics of familial mediterranean fever: a meta-analysis study. *Ann Hum Genet* 72, 752-761.
- Park, Y.H., Wood, G., Kastner, D.L., Chae, J.J., 2016. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol* 17, 914-921.
- Sarı, İ., Birlik, M., Kasifoğlu, T., 2014. Familial Mediterranean fever: An updated review. *Eur J Rheumatol* 1, 21-33.
- Scarpioni, R., Obici, L., 2018. Renal involvement in autoinflammatory diseases and inflammasome-mediated chronic kidney damage. *Clin Exp Rheumatol* 110, 54-60.
- Schnappauf, O., Chae, J.J., Kastner, D.L., Aksentijevich, I., 2019. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease, *Frontiers in Immunology*, p. 1745.
- Sohar, E., Gafni, J., Pras, M., Heller, H., 1967. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 43, 227-253.
- The French FMF Consortium, Bernot, A., Clépet, C., Dasilva, C., Devaud, C., Petit, J.L., Caloustian, C., Cruaud, C., Samson, D., Pulcini, F., Weissenbach, J., Heilig, R., Notanicola, C., Domingo, C., Rozenbaum, M., Ben-Chétrit, E., Topal lu, R., Dewalle, M., Dross, C., Hadjari, P., Dupont, M., Demaille, J., Touitou, I., Smaoui, N., Nedelec, B., Méry, J., Chaabouni, H., Delpech, M., Grateau, G., 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nature Genetics* 17, 25-31.
- Touitou, I., 2001. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 9, 473-483.

Twig, G., Livneh, A., Vivante, A., Afek, A., Shamiss, A., Derazne, E., Tzur, D., Ben-Zvi, I., Tirosh, A., Barchana, M., Shohat, T., Golan, E., Amital, H., 2014. Mortality risk factors associated with familial Mediterranean fever among a cohort of 1.25 million adolescents. *Ann Rheum Dis* 73, 704-709.

Verrecchia, E., Sicignano, L., Cerrito, L., Manna, R., 2015. Epidemiology of FMF Worldwide.

Weinert, C., Morger, D., Djekic, A., Grütter, M.G., Mittl, P.R.E., 2015. Crystal structure of TRIM20 C-terminal coiled-coil/B30.2 fragment: implications for the recognition of higher order oligomers. *Scientific Reports* 5, 10819.

Yepiskoposyan, L., Harutyunyan, A., 2007. Population genetics of familial Mediterranean fever: a review. *Eur J Hum Genet* 15, 911-916.

Zemer, D., Pras, M., Sohar, E., Modan, M., Cabili, S., Gafni, J., 1986. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 314, 1001-1005.

Zemer, D., Revach, M., Pras, M., Modan, B., Schor, S., Sohar, E., Gafni, J., 1974. A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial mediterranean fever. *N Engl J Med* 291, 932-934.

Annexes

Tableau VI (ANNEXE 1) : Tableau représentant les concentrations des ADN_g des patients étudiés ainsi que leurs rapports 260/280.

Les Echantillons	La concentration des échantillons (µg/ml)	Rapport 260/280
P1	173	1,38
P2	629	1,28
P3	544	1,48
P4	390	1,57
P5	162	1,69
P6	106	1,54
P7	426	1,66
P8	295	1,66
P9	411	1,29
P10	1099	1,18
P11	68	1,35
P15	125	1,26
P17	63	1,49

Résumé

La fièvre Méditerranéenne familiale (FMF, OMIM 249100) est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive, due à des mutations dans le gène *MEFV* situé sur le chromosome 16. Cliniquement, la FMF se manifeste par des épisodes fébriles récurrents associés à des douleurs abdominales, articulaires et/ou thoraciques.

L'objectif de cette étude consiste à identifier les trois mutations p.M694I (c.2082 G>A), p.M694V (c.2080 A>G) et p.M680I (c.2040 G>C) chez des patients Algériens suspectés de FMF, par PCR-ARMS.

Les résultats obtenus dans cette étude sont : un patient à l'état homozygote de la mutation p.M694I, trois hétérozygotes dont l'un est un hétérozygote composite tandis que le reste des patients ne portent aucune des trois mutations recherchées.

Mots clés : Fièvre Méditerranéenne Familiale, *MEFV*, Pyrine, PCR-ARMS

Abstract

Familial Mediterranean Fever (FMF, OMIM 249100) is an autosomal recessive inherited disease caused by mutations in the *MEFV* gene located on chromosome 16. Clinically, FMF is characterized by recurrent febrile episodes associated with abdominal, joint and/or chest pain. This study aimed to identify three mutations p.M694I (c.2082 G>A), p.M694V (c.2080 A>G) and p.M680I (c.2040 G>C) in Algerian patients suspected for FMF. Genetic testing was made by PCR-ARMS.

The results showed one homozygous patient for p.M694I mutation, three heterozygotes patients of which one is a compound heterozygote while the rest of the patients do not carry any explored mutations.

Key words : Familial Mediterranean Fever, *MEFV*, Pyrin, PCR-ARMS.

ملخص

حمى البحر الأبيض المتوسط العائلية (FMF) ، (OMIM 249100) هي مرض وراثي مع انتقال متنحي وراثي، بسبب طفرات في جين *MEFV* الموجود على الكروموسوم 16. يتم التعبير عنها في الخلايا الأحادية وتشفير إلسالبيرين / ماريو سترين، البروتين الذي يشارك في تنظيم الالتهاب، والذي يسبب تفاعلات التهابية ذاتية عند حدوث طفرة.

من الناحية السريرية، تظهر أعراض حمى البحر المتوسط على أنها نوبات حمى متكررة مرتبطة بالألم في البطن و / أو المفاصل و / أو آلام في الصدر. يعد الداء النشوان الكلوي من المضاعفات الرئيسية، والذي يؤدي غالباً إلى فشل كلوي في نهاية المرحلة في المرضى غير المعالجين. الكوليشيسين هو العلاج الوقائي الوحيد الفعال لعلاج. الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على الطفرات الثلاثة (p.M694I (c.2082 G>A)، p.M694V (c.2080 A>G)، و p.M680I (c.2040 G>C) في المرضى الجزائريين بواسطة PCR-ARMS. النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة هي مريض في حالة متماثلة للواقع للطفرة، p.M694I (c.2082 G>A) ثلاثة زيجوت متغايرة الزيجوت أحدها مركب متغاير الزيجوت بينما لا يحمل باقي المرضى أيًا من الثلاثة الطفرات.

الكلمات المفتاحية: حمى البحر الأبيض المتوسط العائلية، *MEFV*، البيرين، الداء النشوان الكلوي AA ، الكوليشيسين.