

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'Hamed Bougara, Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Master Génétique

**Génotypage du variant -786C/T de l'eNOS dans la fièvre Méditerranéenne
familiale**

Présenté par :

CHENAH Cherrine

Soutenu le 20/07/2023, devant le jury :

Présidente :	AYATI Houria	Maitre assistante A	UMBB
Examinatrice :	BOULDJENNET Faiza	Maitre de conférence B	USTHB
Promotrice :	AIT-IDIR Djouher	Maitre de conférence A	UMBB

Promotion 2022/2023

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame AIT IDIR. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé. Merci pour tout

Je remercie également les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail.

Merci encore pour tout le personnel du laboratoire pédagogique de biologie cellulaire et moléculaire.

Et pour finir, j'aimerais remercier toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à mon feu père, à ma mère, mon frère, et mes deux sœurs.

LISTE DES ABREVIATIONS

AP1 : protéine activatrice 1

BH4 : Tetrahydrobiopterin

DE : Dysfonctionnement Endothelial

eNOS : Endothelial Nitric Oxide Synthase

FAD : Flavin adenine dinucleotide

FMF : Fièvre méditerranéenne familiale

FMN : Flavine mononucléotide

FRH : Fièvres récurrentes héréditaires

IgA : Immunoglobuline A

IL-17 : d'interleukines-17

IM : infarctus du myocarde

iNOS : Inductible Nitric Oxide Synthase

LDL : lipoprotéines de basse densité

LPS : lipopolysaccharide

MAI : maladies auto inflammatoires

MEFV : MEditerranean FEVer

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF-Kb : nuclear factor-kappa

nNos : Neuronal Nitric Oxide Synthase

NO : Oxyde Nitrique

NOS : Nitric oxide synthases

PCR : réaction en chaine par polymérase

PMN: polymorphonucléaires

RFLPL: Restriction Fragment Length Polymorphism

siRNA: small interference RNA

SNP: Single nucleotide polymorphism

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

VNTR: variable number of tandem repeats

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les isoformes de la NO synthase.....	9
Tableau II : Résultats fonctionnels des polymorphismes eNOS couramment étudiés	13
Tableau III : caractéristiques cliniques et génétiques des patients étudiants.....	14
Tableau IV :: composition du milieu réactionnel.....	17
Tableau V : Conditions d'amplification.....	18
Tableau VI : : Les fréquences génotypiques et alléliques chez les témoins et les patients.....	24

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Inflammation et évènements vasculaires.....	7
Figure 2 : Représentations des trois types d'enzymes de <i>NOS</i>	10
Figure 3 : Structure du gène <i>eNOS</i> et les polymorphismes.....	11
Figure 4 Etapes de la PCR.....	15
Figure 5 : : Principe schématique de RFLP.....	17
Figure 6 : : Electrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose (2%).....	21
Figure7 : : produits RFLP obtenus avec <i>MspI</i> et les différents génotypes.....	21
Figure8 : : Electrophorès sur gel d'agarose (2,5%) pour les produits RFLP des individus sains.....	23
Figure 9 : : Electrophorèse sur gel d'agarose (2,5%) pour les produits RFLP des patients.....	24
Figure 10 : Histogramme montrant les fréquences génétiques chez les témoins et les patints.....	25
Figure11 : Histogramme montrant les fréquences alléliques chez les témoins et les patients.....	26

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	01
I. Généralités sur la Fièvre Méditerranéenne Familiale.....	03
II. Génétique de la Fièvre Méditerranéenne Familiale.....	04
II.1. Expression du gène <i>MEFV</i>	04
II.2. Mutations associées au gène <i>MEFV</i>	05
III. Atteinte vasculaire au cours de la FMF.....	05
III.1. Dysfonctionnement endothélial dans la FMF.....	06
III. 2. Oxyde Nitrique (NO).....	07
IV. NOSynthases.....	08
IV.1. Généralités.....	08
IV.2. Structure biochimique des NOS.....	10
IV.3. Le gène eNOS.....	10
IV.3.1. Niveau d'expression des eNOS	11
IV3.2. Polymorphismes génétique du gène eNOS.....	12
IV.3.2.1. Types de polymorphismes du gène eNOS et leurs conséquences fonctionnelles	12
CHAPITRE II : Partie expérimentale	
Matériel et méthodes.....	14
1) Individus.....	14
1.1) Témoins.....	14
1.2) Patients.....	14
2) Recherche du polymorphisme -786 T>C.....	15
2.1)Amplification de l'ADN par PCR	
- Dénaturation	16

- Hybridation.....	16
-- Elongation ou Extention.....	16
2..2)Principe de la technique RFLP pour la détection des polymorphismes.....	16
2.3) Application de la PCR-RFLP pour la recherche du polymorphisme -786T>C.....	17
2.3.1) Amplification de la région contenant le polymorphisme -786T>C.....	17
2.3.2) Condition d'amplification.....	18
2.3.3) Mise en évidence du polymorphisme -786T>C par RFLP.....	18
2.3.4) Electrophorèse des acides nucléiques.....	19
3) Traitement statistique.....	20
CHAPITRE III :Résultats et discussion	
A Résultats.....	21
1) Amplification de la région d'ADN contenant le SNP -786 T>C.....	21
2) Exploration du polymorphisme d'intérêt.....	21
2.1) Génotypes identifiés chez les témoins et les patients analysés.....	22
2.2) Fréquences génotypiques et alléliques chez les individus analysés.....	24
B . Discussion.....	27
Conclusion / Perspective.....	29

Références bibliographiques

Introduction

La fièvre Méditerranéenne familiale (FMF, OMIM) est la première maladie auto inflammatoire (MAI) surtout monogénique qui a été décrite. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive qui touche les populations originaires du bassin Méditerranéen (Ben-Chetrit and Touitou, 2009 ; Ozdogan and Ugurlu, 2019). Le gène responsable de la FMF est le *MEFV* situé sur le bras court du chromosome 16 humain. Il est formé de 10 exons et code pour la pyrine/marenostrine, protéine impliquée dans la régulation de la réaction inflammatoire (The International FMF Consortium, 1997 ; The French FMF Consortium, 1997).

Cliniquement, la FMF évolue par des crises fébriles récurrentes, souvent associées aux douleurs abdominales, articulaires et thoraciques (Ben-Chetrit and Levy, 1998 ; Berkun and Eisenstein, 2014). Les formes graves de la FMF se compliquent par une amylose rénale de type AA qui peut conduire à une insuffisance rénale terminale et dialyse (Grateau et al., 2005 ; Scarpioni et al., 2016). Aussi, une inflammation persistante au cours de la FMF pourrait conduire à une dysfonction endothéliale (DE) et à des lésions vasculaires (Yüksel et al., 2010 ; Sönmez et al., 2023). D'une manière générale, bien que la fièvre soit la caractéristique prédominante des MAI, d'autres systèmes, y compris le système cardiovasculaire, peut expliquer l'activité impliquée dans le processus de la maladie (Abbara et al., 2019 ; Sönmez et al., 2023).

Les mécanismes de la DE reposent essentiellement sur une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), principal facteur vasodilatateur libéré par l'endothélium, qui résulte d'un déséquilibre entre sa production et sa dégradation (Benhamou et al., 2014). Une baisse de l'expression ou une altération des voies de transduction des enzymes responsables de sa production **NO** peuvent induire une baisse de sa biodisponibilité (Benhamou et al., 2014).

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre synthétisé à partir de la L-arginine. La réaction est catalysée par une famille d'enzymes, les NO Synthases (nitric oxide synthases) (Griffith and Stuehr, 1995). Deux sont constitutives : NOS endothéliale (*eNOS*) et NOS neuronale (*nNOS*), et l'autre est inductible (*iNOS*) (Griffith and Stuehr, 1995 ; Förstermann and Sessa, 2012).

La *eNOS* (NOS-III) a été initialement identifiée dans les cellules endothéliales, elle est également exprimée dans d'autres types cellulaires comme les neurones de l'hippocampe de rat et dans les neurones moteurs humains (Förstermann et al., 1998). Elle est largement associée aux membranes des cellules endothéliales (Griffith and Stuehr, 1995).

Synthèse bibliographique

La eNOS est une protéine de 130KDa codée par un gène situé en 7q35-7q36 et formé de 26 exons (Wang and Marsden, 1995 ; Förstermann et al., 1998). De nombreux polymorphismes ont été identifiés dans ce gène, dont trois ont été particulièrement étudiés :

- Le polymorphisme VNTR dans l'intron 4 du gène (4b/a) qui a été associé à une diminution des taux sérique du NO, ce qui refléterait une diminution de l'activité de l'enzyme eNOS.
- Le polymorphisme G894T (Glu298Asp; rs1799983) situé dans l'exon 7 qui a été associé à une diminution de l'activité de l'enzyme eNOS.
- Polymorphisme T786C (-786T/C ; rs2070744) situé dans la région du promoteur du gène qui induit la réduction de la transcription du gène eNOS.

Parmi ces polymorphismes, seul le VNTR a été exploré chez des patients FMF originaires de Turquie (Türkeli et al., 2022). Par conséquent, leur éventuelle implication dans le processus physiopathologique de la FMF n'est pas connue. Ainsi, l'objectif de la présente étude porte sur la recherche du polymorphisme -786T/C chez les patients atteints de FMF ainsi que chez les Individus sains.

Pour cela, l'étude sera organisée de la manière suivante :

1. Identification des génotypes au niveau du locus *eNOS* chez un groupe de patients atteints de la FMF, et des sujets sains par la PCR-RFLP.
2. Comparaison entre les individus sains et les patients FMF, par une étude statistique

I. Généralités sur la fièvre Méditerranéenne familiale

Les maladies auto-inflammatoires monogéniques sont des anomalies génétiques codant des protéines intervenant dans l'immunité innée. Leur caractéristique principale se manifeste par un syndrome inflammatoire biologique en phase de poussée clinique et en l'absence d'infection. Les maladies les mieux connues sont médiées par l'interleukine-1 comme la fièvre méditerranéenne familiale (Georgin *et al.*, 2018).

La fièvre méditerranéenne familiale (FMF) appartient au groupe des fièvres récurrentes héréditaires (FRH) monogéniques classées dans l'ensemble des maladies auto inflammatoires pour les distinguer des maladies auto-immunes (Bodar *et al.*, 2009).

Un premier cas évoquant des fièvres avec douleurs abdominales a été décrit en 1908 chez une enfant juive (Janeway and Mosenthal, 1908). La FMF fut décrite en 1945 par Siegal sous le nom de péritonite paroxystique bénigne (Siegal, 1945). Les premières publications Israéliennes lui ont attribué le nom actuel de la fièvre méditerranéenne familiale (Heller *et al.*, 1958).

La FMF affecte essentiellement les groupes ethniques originaires du bassin méditerranéen, Juifs Séfarades, Arméniens, Turcs et Arabes. De manière beaucoup moins fréquente, elle peut également affecter d'autres populations, en générale d'origine européenne (Ben-Chetrit and Touitou, 2009).

La FMF est une maladie essentiellement pédiatrique dont les symptômes se présentent sous formes de douleurs abdominales, des signes digestifs, de type anorexie, constipation, nausées, vomissement. Les douleurs peuvent conduire dans certains cas à des appendicectomies inutiles (Ben-Chetrit and Levy, 1998) accompagnée d'une fièvre avec une péritonite, une pleurite et/ou une synovite. Des symptômes plus rares tels que l'érythème cutané de type érysipèle ou la myalgie suite à l'effort peuvent aussi se manifester pendant les crises (Medlej *et al.*, 2004). Les signes cutanés peuvent accompagner les crises dans 7 à 40% des cas. La lésion cutanée la plus caractéristique est la plaque érysipéloïde. Elle survient en même temps qu'une poussée articulaire. Il s'agit d'une plaque érythémateuse bien délimitée siégeant sur la face antérieure du pied ou de la jambe, elle disparaît spontanément en quelques jours (Hentgen *et al.*, 2013).

La présence aussi de douleurs articulaires ont été décrites au cours de la FMF ; arthrite asymétrique non destructrice, arthrite chronique destructrice avec sacro- iléite (2-5%), polyarthrite migratoire. Les atteintes articulaires peuvent se prolonger au -delà des 72 heures habituelles et persister plusieurs semaines (Hentgen *et al.*, 2013). Les douleurs thoraciques sont

dues à une pleurésie unilatérale qui se manifestent par une douleur thoracique brutale unilatérale chez 25 à 80% des patients (Ben-Chetrit and Levy, 1998). La complication la plus grave est l'amylose inflammatoire qui se manifeste principalement par une insuffisance rénale associée à un syndrome néphrotique. Depuis 1972, la colchicine est le traitement de référence de la maladie, elle permet de limiter et de prévenir l'apparition de l'amylose inflammatoire (Savey *et al.*, 2021).

II. Génétique de de la FMF

La FMF, maladie héréditaire à transmission essentiellement autosomique récessive. Le gène responsable de la maladie est le gène *MEFV* (Mediterranean FeVer), localisé sur le bras court du chromosome humain (16p13.3). Ce n'est qu'en 1997 que le gène a été identifié simultanément par les deux consortiums, international et français, qui l'ont appelé gène *MEFV*. Il comprend 10 exons et couvre environ 14 Kb d'ADN génomique (The French FMF Consortium and The International FMF Consortium, 1997).

Le mode de transmission pseudo-dominant, pourrait s'expliquer par la fréquence relativement élevée des mutations, ainsi que par l'importance de la consanguinité observée dans certaines populations, une parenté éloignée et « oubliée » pouvant expliquer la survenue de la FMF chez ces patients en réalité apparentés (Yuval *et al.*, 1995).

II.1. Expression du gène *MEFV*

Le gène *MEFV* est transcrit en un ARN de 3,7 Kb abondant dans les granulocytes, notamment les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et les éosinophiles, présent en proportions variables dans les monocytes, mais absent dans les lymphocytes. Le transcrit a aussi été détecté dans les leucocytes de la moelle osseuse, suggérant un rôle de la protéine dans la voie pro inflammatoire de différenciation myélo monocyttaire. La stimulation de monocytes *in vitro* par des cytokines pro-inflammatoires et par le lipopolysaccharide (LPS) augmente la transcription de *MEFV* (Centola *et al.*, 2000).

Le gène de la FMF code pour une protéine dénommée marénostérine (du nom latin de la mer Méditerranée, marenostrium) (The French FMF Consortium, 1997) et pyrine (du mot grec qui désigne le feu et la fièvre) (The International Consortium, 1997). Elle est formée de 781 acides aminés, répartis en plusieurs domaines :

- Un domaine pyrine N-terminal, c'est le domaine PYD
- Un domaine B box zinc finger

- Un domaine en hélice alpha (colled call)
- Un domaine B30 (PRYSPRY) C-terminal.

Le domaine B30 est codé par l'exon10 qui est le siège de la plupart des mutations liées au phénotype sévère de la FMF (Bodar *et al.*, 2009).

II.2. Mutations associées au gène *MEFV*

Quatre mutations ponctuelles ou variants pathogènes ont été identifiées dans l'exon 10 du gène *MEFV* provoquant des changements nucléotidiques, les plus sévères (M694V, M680I, V726A et M694I) :

- p.M694V (p.Met694Val; c.2080A>G),
- p.M680I (p.Met680Ile; c.2040G>C),
- p.V726A (p.Val726Ala; c.2177T>C),
- p.M694I (p.Met694Ile; c.2082G>A).

Une cinquième a été identifié dans l'exon 2 : p. E148Q (p.Glu148 Gln; c442G>C).

Il existe deux points chauds dans le gène *MEFV* : l'un dans l'exon 10 et l'autre dans l'exon 2.

Ces mutations se rencontrent chez environ 80% des sujets atteints de la FMF dans les populations à risque (Touitou, 2001). Des variants de type SNP (Single nucléotide polymorphisme) identifiés chez les patients atteints de FMF, ils sont fréquents dans la population générale non pathologiques comme le variant p.R202Q (Shinar *et al.*, 2012).

Ces mutations sont responsables de la dérégulation de l'apoptose et de l'inflammation en raison de la capacité réduite de la protéine pyrine mutée à moduler l'activité de l'inflammasome et de l'interleukine-1b (IL-1bêta) (Yuksell *et al.*, 2010).

III. Atteintes vasculaires au cours de la FMF

Bien que la fièvre soit la caractéristique prédominante des maladies auto inflammatoires en général, d'autres systèmes, y compris le système cardiovasculaire, peut être atteint par la maladie. En effet, une inflammation continue au cours de la FMF pourrait aboutir à une dysfonction endothéliale et à des lésions vasculaires (Somnez, 2023).

Cependant, l'existence ou non d'un risque accru de maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de FMF est un sujet de controverse, car il existe des données limitées sur ce risque chez les patients atteints de FMF et également chez les patients atteints d'amylose rénale AA secondaire à la FMF et à d'autres maladies auto inflammatoires (Sahin *et al.*, 2022).

III.1. Dysfonctionnement endothélial dans la FMF

Les mécanismes de la DE reposent essentiellement sur une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), principal facteur vasodilatateur libéré par l'endothélium, qui résulte d'un déséquilibre entre sa production et sa dégradation (Benhamou et al., 2014).

Les cellules endothéliales jouent un rôle crucial dans la migration des neutrophiles activés dans l'espace sous-endothélial et dans l'initiation de l'inflammation de la paroi vasculaire (Muller, 2009). Bien que les agents cellulaires et moléculaires impliqués dans les maladies cardiovasculaires ne soient pas entièrement explorés dans le cadre de la FMF, les neutrophiles sont considérés comme les principales cellules inflammatoires impliquées dans la dysfonction endothéliale, le stress oxydatif et la surproduction des molécules d'adhésion dans ce trouble. Les neutrophiles des patients atteints de la FMF peuvent rester hyperactifs pendant la période sans crise en raison de la surproduction soutenue d'interleukines-17 (IL-17) et -18 (IL-18). La période sans attaque dans la FMF est caractérisée par des dommages endothéliaux continus avec élévation des marqueurs circulants de la dysfonction endothéliale tels que la thrombomoduline adrénomédulline et des nitrites, associés aux lésions vasculaires et dysfonction endothéliale (Figure 1) (Yuksell et al., 2010).

La réponse immuno- inflammatoire sous le contrôle de cytokines induit à la production du monoxyde d'azote (NO) (Fels et al., 2010). Cette production est nécessaire dans différentes circonstances physiologiques et pathologique (Nadaud et al., 2000).

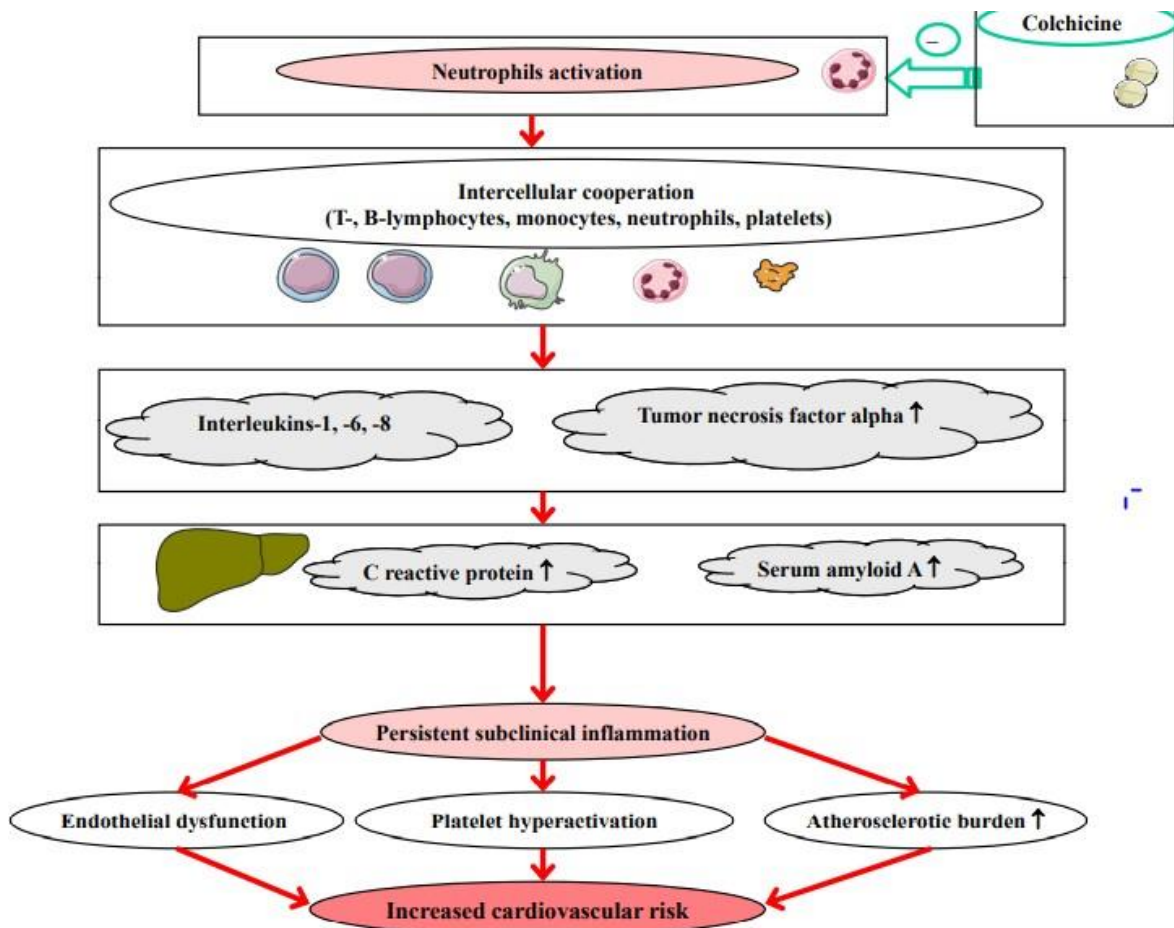


Figure 1: Inflammation est évènements vasculaires (Yüksel *et al.*, 2010)

III.1. Oxyde Nitrique (NO)

Le NO a été impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques. Il régule le tonus vasculaire et le maintien de la pression sanguine. Il joue le rôle de neurotransmetteur et intervient dans l'immunité pour la défense de l'hôte contre les agents infectieux (Moncada and Higgs, 1993; Vallance and Collier, 1994).

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre synthétisé à partir de la L-arginine par deux réactions oxydatives successives, qui libèrent simultanément la L-citrulline et le NO. La réaction est catalysée par une famille d'enzymes, les NO synthases (nitric oxide synthases) (Griffith and Stuehr, 1995 ; Halliwell, 1996). La production endogène de NO est catalysée par les NO synthases (NOS).

Les NOS appartiennent à la famille des oxygénases et sont présentes dans les cellules sous forme de monomères inactifs (Förstermann and Sessa, 2012). La forme active dimérique de NOS catalyse la réaction de formation de NO à partir de la L-arginine et du dioxygène (O₂), en

présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), de tétrahydrobioptérine, de flavine mononucléotide, de flavine adénine dinucléotide et d'un groupement hème. Dans une première étape, la L-arginine est oxydée en N-hydroxy-L-arginine, qui dans une deuxième étape, est transformée en L-citrulline et NO (Dahboul, 2013) dont les réactions sont les suivantes (Hickok and Thomas, 2010):

- $2 \text{ L-arginine} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{N- hydroxy- L-arginine} + 2\text{NADP}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$
- $2\text{N-hydroxy-L-arginine} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{L-citrulline} + 2\text{NO} + \text{NADP}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$

La réaction globale s'écrit:

- $2 \text{ L-arginine} + 3\text{NADPH} + 3\text{H}^+ + 4\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ L-citrilline} + 2\text{NO} + 3\text{NADP}^+ + 4\text{H}_2\text{O}$

En plus de la régulation du tonus vasculaire, le NO régule l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, inhibe le muscle lisse vasculaire, la prolifération cellulaire et l'agrégation plaquettaire, et il régule la masse osseuse et le remodelage osseux, la consommation d'oxygène et l'angiogenèse (Albrecht *et al.*, 2003).

IV. NO Synthèses

IV.1. Généralités

Trois isoformes de l'oxyde nitrique synthase (NOS) ont été identifiés selon l'ADNc, leurs séquences protéiques et la celles des gènes qui les codent (Albrecht *et al.*, 2003).

- **L'isoforme de type I (NOS1, NOS neuronale ou nNOS)** est exprimée majoritairement dans les neurones et également dans les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales (Förstermann and Sessa, 2012).
- **L'isoforme de type II (NOS2, NOS inductible ou iNOS)** fonctionne indépendamment d'une augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} . Elle est induite dans de nombreux types de cellules après exposition à des composants bactériens ou des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 et le TNF alpha (Suschek *et al.*, 2002).
- **L'isoforme de type III (NOS3, NOS endothéliale ou eNOS)** a d'abord été retrouvée au niveau des cellules endothéliales, elle est essentielle pour garantir les propriétés de l'endothélium et la fonction vasculaire. Son expression a été également retrouvée dans les cardiomyocytes, et les cellules épithéliales bronchiques (Lachaux., 2019).

Tableau I : Les isoformes de la NO synthase (Moncada *et al.*, 1997 ; Reiss and Komatsu, 1998).

Caractéristiques	eNOS (NOS-3)	nNOS (NOS-1)	iNOS (NOS-2)
Localisation du gène	7q35-7q36	2q24.2	17cen-17q11.2
Structure du gène	26 exons	29 exons	27 exons
Taille du gène	21 Kb	160 Kb	37 Kb
Taille du peptide	1203 aa	1434 aa	1153 aa
Poids moléculaire	130 KDa	160 KDa	131 KDa
Expression cellulaire	Cellules endothéliales; astrocytes; plaquettes	Neurones, muscle squelettique	Macrophages
Localisation subcellulaire	Membrane ; cytosol	Cytosol	Cytosol; membrane
Régulation	Ca ²⁺ /calmoduline dépendante; constitutive mais aussi inductible par les cytokines	Ca ²⁺ /calmoduline ; constitutive mais également induite par les cytokines	Ca ²⁺ indépendante ; induite par le LPS, IFN- et TNF-
Activités	Petites quantités de NO (p molaire)	Petites quantités de NO (p molaire)	Grande quantité de NO (μ molaire)

IV.2. Structure biochimique des NO synthases

Les trois isoformes ont une structure à deux domaines :

- Un domaine catalytique oxygénase N-terminal qui lie le substrat, la L-arginine, l'hème et le tétrahydrobioptérine (BH4)
- Un domaine réductase C-terminal qui lie les cofacteurs : NADPH, FAD et FMN.

La dimérisation des enzymes (260 KDa) est requise pour l'activité enzymatique. La dimérisation des monomères protéiques nécessite la présence de l'hème, BH4 et le substrat. Les isoformes humaines : nNOS, iNOS et eNOS requièrent respectivement les résidus Cystéines 415, 200 et 184 pour la fixation de l'hème dans la région N-terminale (Figure 2) (Hobbs *et al.*, 1999).

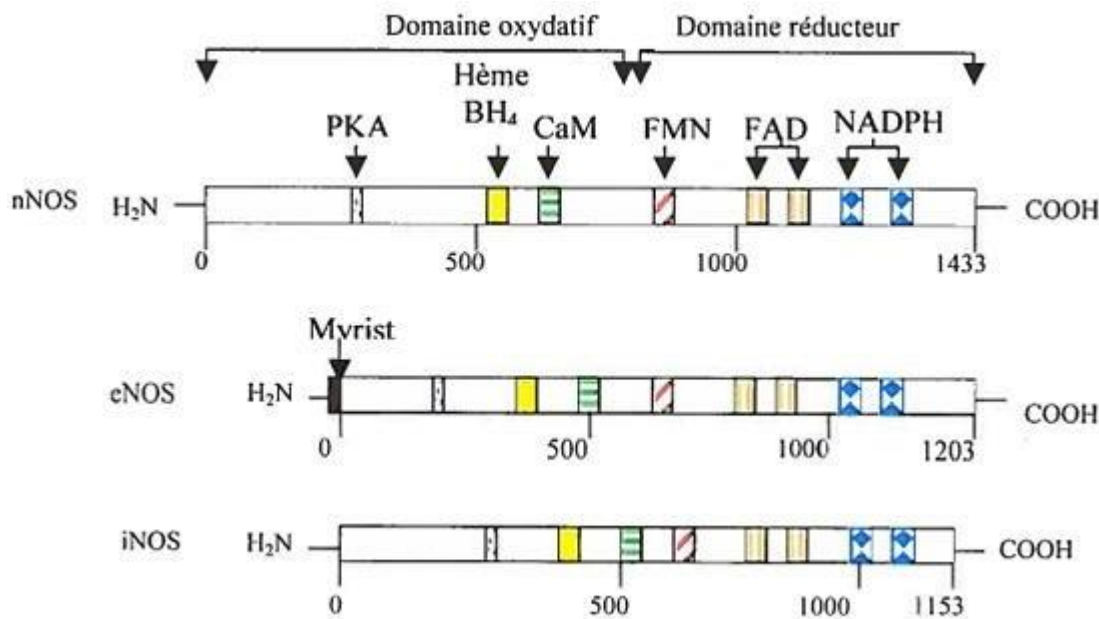


Figure 2 : représentation des trois différents types d'enzymes de NOS (Hobbs *et al.*, 1999).

IV.3. Gène *eNOS*

Le gène *eNOS* est situé dans la région 7q35-7q36 du chromosome 7 chez l'homme (Marsden *et al.*, 1993). Ce gène est présent en une seule copie dans le génome humain haploïde et contient 21–22 kb, 25 introns et 26 exons, qui codent pour un ARNm de 4052 nucléotides (Marsden *et al.*, 1993). Fait intéressant, la séquence d'ADNc de *eNOS* codant pour l'homme a montré environ 90 % d'homologie avec la séquence d'ADNc de *eNOS* murine, bovine et porcine (Li *et al.*, 2002), montrant ainsi un degré élevé de similarité de l'ADNc de *eNOS* entre différentes espèces.

La caractérisation de la région flanquante en 5' a montré que le promoteur eNOS humain est "TATA-less" et affiche des éléments proximaux tels que les motifs Sp1 et GATA compatibles avec un gène exprimé de manière constitutive (Karantzoulis-Fegaras *et al.*, 1999). De plus, le promoteur *eNOS* présente des homologies avec plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription, notamment NF 1, AP-1, NF- κ B, les éléments de réponse au stress de cisaillement et les éléments régulateurs des stérols (voir figure 3) (Li *et al.*, 2002).

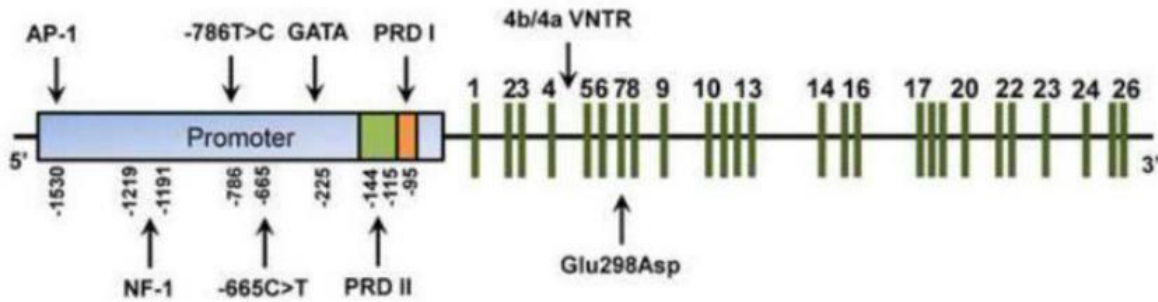


Figure 3 : Structure du gène *eNOS* et les polymorphismes associés (Li *et al.*, 2002).

IV.3.1. Niveau d'expression de la *eNOS*

Il existe de nombreux facteurs connus pour affecter le niveau d'expression de base et l'activité de l'enzyme, comme l'hypoxie, le stress, les hormones, telles que les œstrogènes, les lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées, et forces mécaniques. Ces facteurs peuvent induire la transcription du gène *eNOS*, par exemple par l'activation de AP-1 pendant l'hypoxie ou conduire à l'activation d'*eNOS* en augmentant le Ca^{2+} intracellulaire, causé soit par afflux de Ca^{2+} extracellulaire ou libération de Ca^{2+} . L'enzyme *eNOS* est exprimée dans les cellules endothéliales, les plaquettes, cellules musculaires lisses, myocytes cardiaques, cellules osseuses. Le NO peut aussi activer les canaux potassiques calcium-dépendants, entraînant une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium, conduisant à une vasodilatation. Ainsi, toutes les relaxations dépendantes de l'endothélium peuvent s'expliquer par la libération de NO ou de prostacycline (Albrecht *et al.*, 2003).

NO dérivé de la *eNOS* a plusieurs fonctions importantes, notamment la régulation du tonus vasculaire et du flux sanguin régional, la suppression de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et la modulation des interactions leucocytes-endothélium (Barbosa., 2017).

IV.3.2 Polymorphismes génétiques du gène *e NOS*

La régulation d'*eNOS* aux niveaux transcriptionnels, post-transcriptionnel et post-traductionnel peut être influencée par des polymorphismes génétiques dans le gène *eNOS*.

De nombreux sites polymorphes ont été décrits dans le gène *eNOS* humain, notamment des polymorphismes bi-alléliques ou SNP (*single nucleotide polymorphisms*), des polymorphismes multi-alléliques comme les VNTR (*variable number of tandem repeats*) et les microsatellites, ainsi que les insertions/délétions (Cooke *et al.*, 2007 ; Oliveira-Paula *et al.*, 2016). Actuellement, plus de 1700 variations génétiques du gène *eNOS* humain sont rapportées dans la base de données SNP (Oliveira-Paula *et al.*, 2016). Plusieurs études ont montré les conséquences fonctionnelles et les implications cliniques de polymorphismes *eNOS* (Wattanapayakul *et al.*, 2001).

IV.3.1.1. Types de polymorphismes du gène *eNOS* et leurs conséquences fonctionnelles

Certains polymorphismes *eNOS* sont considérés comme fonctionnels car ils affectent l'expression de la *eNOS* ou de son activité (Tableau II). Parmi ces polymorphismes :

- a) **g.-786T>C (Le SNP rs2070744)** situé dans le promoteur du gène. Il affecte l'expression de *eNOS* au niveau transcriptionnel. Des études avec des tests de gène rapporteur de la luciférase ont démontré que le remplacement de la thymine par la cytosine à la position -786 du promoteur réduit l'activité transcriptionnelle de *eNOS* de manière importante (Nakayama *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2002).
- b) **Un VNTR** caractérisé par une répétition de 27 pb dans l'intron 4 du gène *eNOS* régule *eNos* au niveau post-transcriptionnelle en affectant la formation de petits ARN interférents (sirRNA). Ce polymorphisme est communément appelé 4b/4a VNTR (Zhang *et al.*, 2008a ; Zhang *et al.*, 2008).
- c) **Glu298Asp (Le SNP rs1799983)** est situé dans l'exon 7 et correspond à un changement de guanine en thymine dans la position 894 du gène *eNOS*, résultant en une substitution de la glutamine par l'aspartate à la position 298 de la protéine (Marsden *et al.*, 1993).

Tableau II : Résultats fonctionnels des polymorphismes *eNOS* couramment étudiés (Oliveira-Paula *et al.*, 2019)

Nombre (rs)	Noms communs	Localisation	Conséquences fonctionnelles
rs2070744	g.-786T>C	Promoteur	L'allèle C entraîne une activité transcriptionnelle du gène <i>eNOS</i> diminuée par rapport à l'allèle T
	4b/4a VNTR	Intron 4	La fonctionnalité de 4b/4a VNTR est associée à la formation de sirRNA. Les cellules endothéliales contenant l'allèle 4b (cinq copies de 27 pb) montrent des niveaux accrus de sir RNA, conduisant à une expression plus faible de <i>eNOS</i> par rapport aux cellules contenant l'allèle 4a (quatre exemplaires de 27 pb).
rs1799983	Glu298Asp	Exon 7	Réduction de l'activité de la <i>eNOS</i> et donc diminution de la production du NO
rs3918226	g.-665C>T	Promoteur	L'allèle T est associé à une transcription réduite du gène <i>eNOS</i> par rapport à l'allèle C.

L'importance cruciale du NO dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire a été démontrée à travers plusieurs études. Dans le système vasculaire, la eNOS est la principale isoforme qui produit le NO qui favorise la vasodilatation et contrôle la pression artérielle. Pour cette raison, l'expression et l'activité réduites de la eNOS3 entraînent une altération de la production de NO conduisant à une variété d'états pathologiques. Ceci pourrait être lié aux polymorphismes fonctionnels du gène *eNOS*, qui affectent l'expression ou l'activité enzymatique. Ainsi, ces polymorphismes ont été associés à de nombreuses maladies et peuvent être considérés comme des marqueurs génétiques d'un risque accru de développer les maladies cardiovasculaires..

Matériel et méthodes

Les expériences de cette étude ont été réalisées au laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de la faculté des sciences (UMBB).

L'objectif de l'étude a porté sur la même évaluation du polymorphisme situé dans le promoteur du gène de l'eNOS, g-786T>C, chez les patients atteints de la fièvre Méditerranéenne familiale (FMF), ainsi que chez les individus sains.

1) Individus

1.1) Témoins

Cette étude a impliqué 38 individus sains (témoins) recrutés de la population générale, dans les centres de transfusion sanguine des hôpitaux de Rouïba et d'Ain-Taya (Alger). Les témoins ont été sélectionnés sur la base de l'absence de mutations dans le gène *MEFV*. En effet, aucune mutation n'a été identifiée dans les exons 2, 3, 5 et 10 après séquençage (Ait-Idir et *al.*, 2011).

1.2) Patients

Cette étude impliqué 20 patients non apparentés, génétiquement confirmés FMF. Les principales caractéristiques des patients étudiés sont résumées dans le tableau III.

Tableau III : caractéristiques cliniques et génétiques des patients de l'étude.

Données démographiques	Sexe	- Masculin : 9 - Féminin : 11
	Age médian	39 ans [17- 70 ans]
Symptômes cliniques	Fièvre	75%
	Douleurs abdominales	66%
	Douleurs articulaires	45%
	Douleurs thoraciques	13%
Complication rénale	Amylose rénale de type AA	14 dont 7 en dialyse
Génotypes du <i>MEFV</i>	M694I/M694I	8
	M694V/M694V	1
	M694I/M694V	2
	M694V/M680I	2
	M694I/M680I	2
	M694I/-	2
	M694V/-	3

2) Recherche du polymorphisme -786 T>C

Cette recherche a été réalisée par la technique de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) utilisant l'enzyme de restriction MspI (HpaII).

La technique PCR-RFLP est l'association entre les techniques d'amplification et d'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restriction.

Les étapes suivies pour la PCR-RFLP sont :

- Amplification de la région d'intérêt par la PCR (Polymerase Chain reaction).
- Vérification des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose.
- Digestion des produits d'amplification par l'enzyme de restriction.
- Visualisation des produits de restriction sur le gel d'agarose.

2.1) Amplification de l'ADN par PCR

L'amplification en chaîne par polymérisation (PCR) est une technologie née de l'ère de la biologie moléculaire moderne. L'ADN peut être dupliqué enzymatiquement jusqu'à des millions de copies en dehors des systèmes vivants sur une échelle logarithmique avec des amorces et en peu de temps. Le but est d'amplifier une partie spécifique de l'ADN qui contient habituellement les informations recherchées (Khalil, 2021).

La PCR classique comprenant trois étapes répétitives, dénaturation, hybridation et élongation, qui forment la base de la réaction en chaîne (Figure 4).

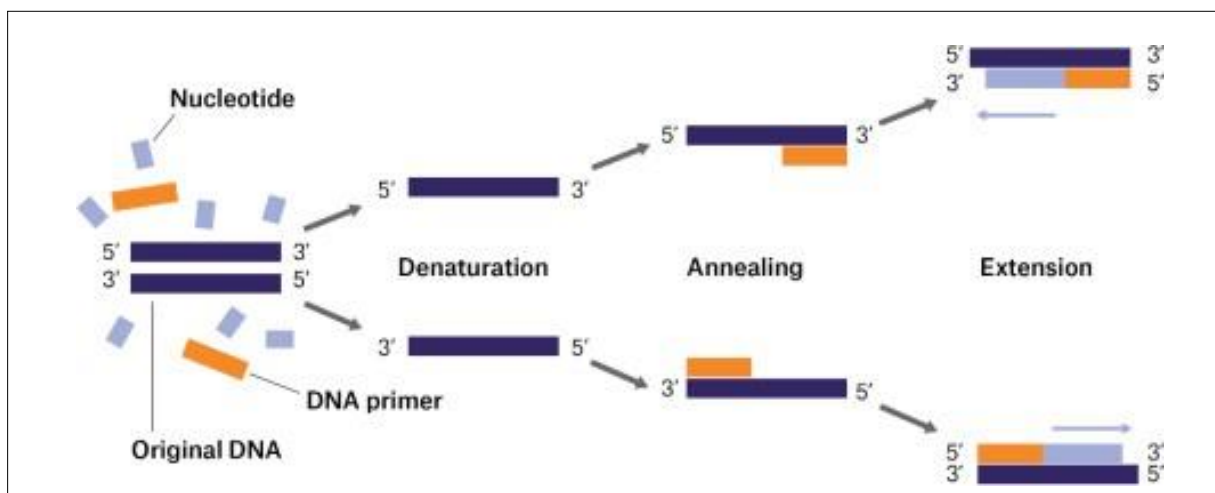


Figure 4 : Etapes de la PCR (Khalil, 2021)

- Dénaturation

Cette étape commence par élever la température du mélange à 94 °C pour séparer les deux brins d'ADN l'un de l'autre, dans laquelle la double chaîne est transformée en un seul brin.. Cela se produit dans une période de temps allant de 1 à 9 minutes (Khalil, 2021).

- Hybridation

Cette étape permet l'hybridation (annealing) de deux amorces, l'amorce sens (5'-3') et l'amorce anti-sens (3'- 5'), autour de la région à amplifier. Elle se produit à une température inférieure ou égale à la température de fusion (55- 68°C). La température d'hybridation dépend de la longueur et du pourcentage en bases G et C du fragment d'intérêt (Khalil, 2021).

- Elongation ou Extension

Il s'agit de la dernière étape du processus de la PCR et se produit à une température de 72 ° C, qui est une température optimale pour l'élongation de l'ADN. Cette étape commence à l'aide de l'enzyme polymérase en ajoutant les bases azotées dans le sens 5' → 3' (Khalil, 2021).

2 Principe de la technique RFLP pour la détection des polymorphismes

Cette technique est basée sur l'utilisation d'endonucléases d'origine bactériennes qui ont la particularité de couper les molécules d'ADN bicaténares à des sites spécifiques de la séquence. Chaque enzyme de restriction reconnaît et coupe une séquence nucléotidique donnée. De ce fait, pour un polymorphisme donné, il y'a création ou abolition d'un site de restriction pour une enzyme donnée (Tagu et *al.*, 2018). Les produits de restriction sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide ou d'agarose en présence d'un marqueur de poids moléculaire. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction observé est utilisé comme critère d'identification. Par cette approche, deux individus pourront présenter des profils de restriction différents (Tagu *et al.*, 2018).

L'aspect le plus puissant de PCR-RFLP est sa simplicité, utilisée dans le génotypage post-amplification des variations d'ADN, et dans un large éventail d'applications de criblage pour caractériser les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) (Hashim et *al.*, 2019) voir (figure 5).

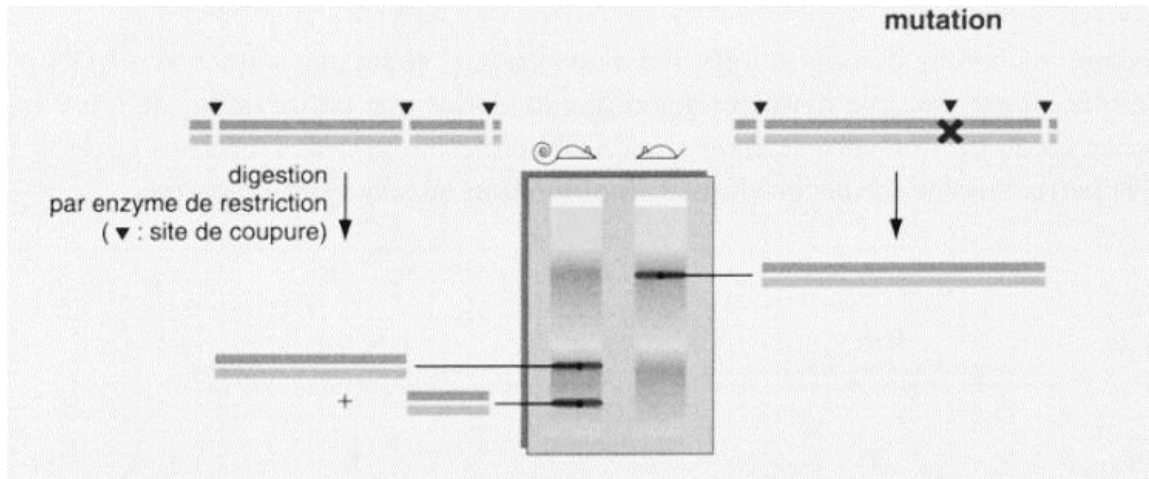


Figure 5 : Principe schématique de RFLP (Tagu et *al.*, 2018).

2.3) Application de la PCR-RFLP pour la recherche du polymorphisme -786T>C

2.3.1) *Amplification de la région contenant le polymorphisme -786T>C*

La région du promoteur contenant le polymorphisme étudié est amplifiée en utilisant les amorces suivantes (Santos et *al.*, 2011) :

5' -TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3' (amorce sens)

3' -GCCTCCACCCCAACCCTGTC-3' (amorce anti-sens)

Ces amorces permettent l'amplification d'une séquence de 184 pb.

Le Mélange réactionnel utilisé pour la réalisation des réactions de PCR est donné dans le tableau IV.

Tableau IV : composition du milieu réactionnel

Composants	Concentrations finales
Tampon de PCR 10X	1X
Mg ⁺² (25mM)	2mM
dNTP (5mM)	0.2mM
Amorce Forward (10uM)	0.2uM
Amorce Reverse (10uM)	0.2uM
Taq polymérase 5u/l	0,05U
Eau (QSP)	100ul

La répartition du mélange réactionnel a été effectuée à raison de 11,5 ul pour chaque 1ul d'ADN. Parallèlement aux échantillons d'individus à analyser, un témoin négatif dans lequel l'ADN est remplacé par 1ul d'eau ultra pure ayant servi au mélange réactionnel a été utilisé.

2.3.2 Condition d'amplification

Les réactions de PCR se sont déroulées dans un thermocycleur Biorad. La température d'hybridation des amorces est de 59°C (Tableau V).

Tableau V : Conditions d'amplification.

		Condition d'amplification	
Dénaturation initiale		94°C	7mn
35 Cycles	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation	59°C	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
Elongation finale		72° C	7mn

2.3.3) Mise en évidence du polymorphisme -786T>C par RFLP

La réaction RFLP a été réalisée uniquement après vérification sur les produits PCR amplifiés sur gel d'agarose. La digestion du produit PCR a été réalisée selon le protocole suivant en utilisant l'enzyme de restriction *MspI*:

Pour chaque 5ul de produit PCR, sont additionnés :

- 1ul de tampon 10X de l'enzyme.
- 1ul d'enzyme de restriction *MspI*.
- 3 ul d'eau distillée stérile.

Les réactions de digestion ont été réalisées en incubant les tubes à la température optimale de l'enzyme à 37°C pendant quatre heures.

Parallèlement, un témoin négatif appelé le non digéré est composé de 1ul de tampon et 4ul d'eau distillée et de 5ul de produits PCR a été incubé dans les mêmes conditions que le reste des échantillons analysés.

L'enzyme de *MspI* (*HpaI*) reconnaît la séquence : 5'...C//CGG...3' en coupant entre C et CGG. La séquence amplifiée contient deux sites reconnus par *MspI*, l'un est un site naturel (en gras) et l'autre est celui qui contient le site polymorphe (souligné).

TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCAcctgcattctgggaactgtagttccctagtcctccatgctcccaccaggcgc
aatctctccctggccggctgaccctgcctcagccctagctctctgctgacctgcggcc**ccggga**agcgtgcgtcactgaatGAC
AGGGTGGGGGTGGAGGC

- En présence de l'allèle T au niveau du site polymorphe, la séquence amplifiée est coupée seulement au niveau du site naturel pour donner deux fragments de 138pb et de 42pb.
- En présence de l'allèle C au niveau du site polymorphe, les deux coupures génèrent trois fragments de 92pb, 46pb et 42pb.

Les différentes tailles ont été obtenues en utilisant le site www.restrictionmapper.org.

2.4) Electrophorèse des acides nucléiques

L'électrophorèse fait référence à la séparation de molécules chargées en fonction de leur mobilité dans un champ électrique. Il s'agit d'une technique couramment utilisée à diverses fins de préparation et d'analyse, notamment la séparation, la purification et la caractérisation des acides nucléiques (ADN et ARN) et des protéines. Il s'agit d'une technique dans laquelle un mélange de molécules chargées est mis à migrer sous l'influence d'un champ électrique à travers un gel. Lors de la migration, la séparation des molécules chargées les unes des autres a lieu en fonction des différences de taille (Rana et *al.*, 2023)

La préparation du gel d'agarose à une concentration de 2% a été faite dans le tampon T.B.E 1X (Tris- Borate- EDTA) qui sert également de tampon de migration. Le bromure d'éthidium (BET) est ajouté au gel d'agarose en fusion à raison de 0.5ug/ml. Le gel est ensuite coulé dans une cuve horizontale, puis les peignes sont placés pour former les puits pour y déposer les échantillons d'ADN.

Les échantillons d'ADN sont mélangés avec le tampon de dépôt ou de charge (4 ul d'ADN pour 1ul de tampon), puis déposés dans le gel d'agarose.

La migration des échantillons analysés a été effectuée en parallèle avec le marqueur de poids moléculaire (100pb). L'électrophorèse a été réalisée dans un champ électrique de 100V pendant 60 minutes. Les bandes d'ADN sont révélées sous la lumière UV (Trans-illuminateur) grâce à la fluorescence émise par le bromure d'éthidium. L'image est observée directement sur un écran d'ordinateur relié au trans-illuminateur.

3) Traitement statistique

L'étude comparative est basée sur un traitement statistique par comparaison des proportions génotypiques et alléliques.

La comparaison des proportions entre les deux groupes a été effectuée par le logiciel de traitement statistique, Sigma-STAT, version 2018. Dans le cas des petits échantillons ($n < 30$), la correction de continuité doit être appliquée. Cette correction a pour effet de réduire la différence observée entre les deux proportions.

Le seuil de risque retenu est $\alpha = 0,05$. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

A. Résultats

1) Amplification de la région d'ADN contenant le SNP -786 T>C

Avant les réactions de digestion enzymatique, l'amplification de la région d'intérêt est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. La taille des amplicons correspond à 180pb. La figure 6 est une illustration de quelques échantillons d'ADN amplifiés.

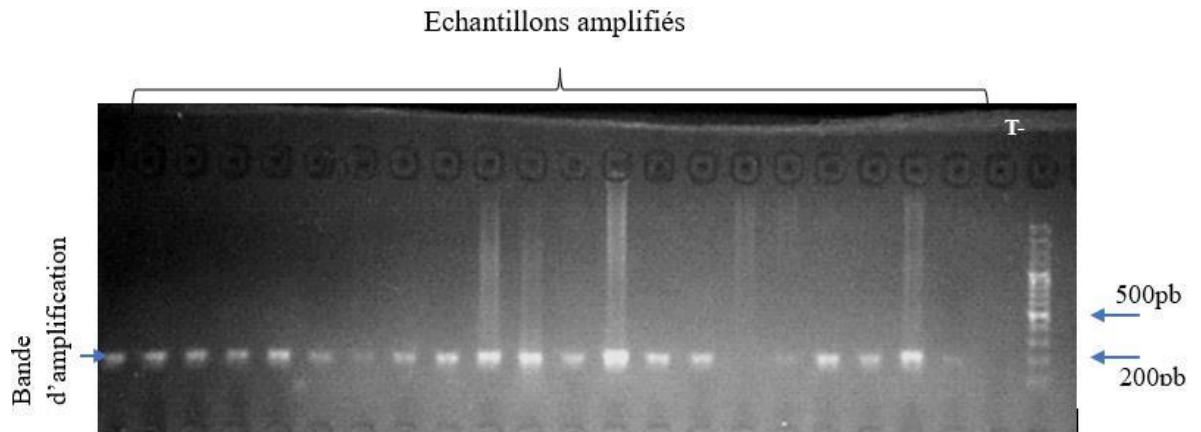


Figure 6: Electrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose (2%)

(T- : témoin négatif)

2) Exploration du polymorphisme d'intérêt

L'identification du SNP-786T>C a été réalisée par l'enzyme *MspI* qui permet la mise en évidence de 3 génotypes différents, T/T, C/C et T/C. La figure 7 résume les différents produits de restriction qui peuvent être théoriquement obtenus, ainsi que les génotypes correspondants.

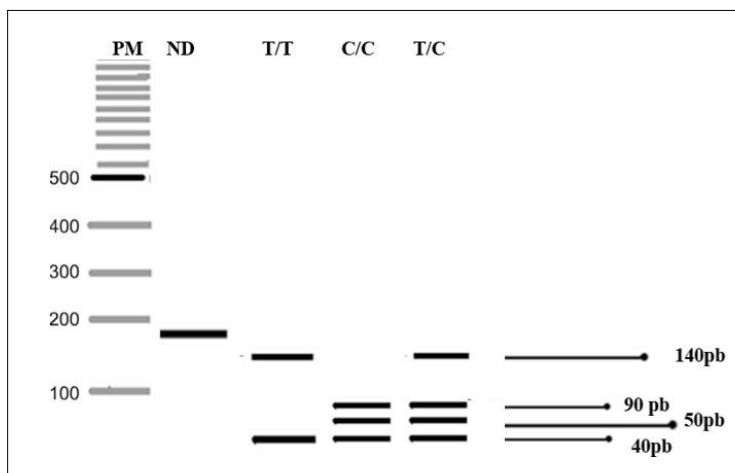


Figure 7 : produits RFLP obtenus avec *MspI* et les différents génotypes leur correspondant.

2.1) Génotypes identifiés chez les témoins et les patients analysés

L'analyse des profils de restriction obtenus chez l'ensemble des individus analysés a permis d'observer trois génotypes :

- -786 C/C
- -786 T/T
- -786 T/C

Dans le cas de cette étude, les tailles des produits RFLP retenues sont celles obtenues en utilisant le site www.restrictionmapper.org.

Les différents génotypes sont illustrés sur la figure 8 (témoins) et figure 9 (patients).

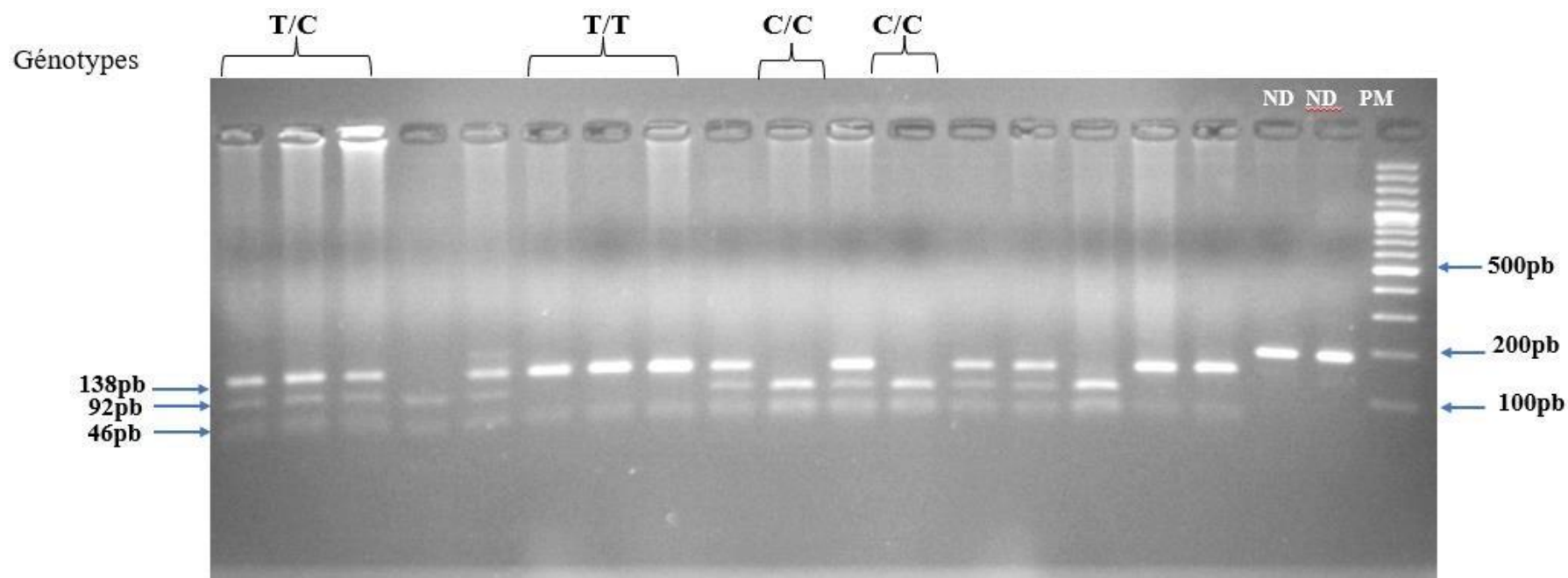


Figure 8 : Electrophorèse sur gel d'agarose (2,5%) pour les produits RFLP des individus sains

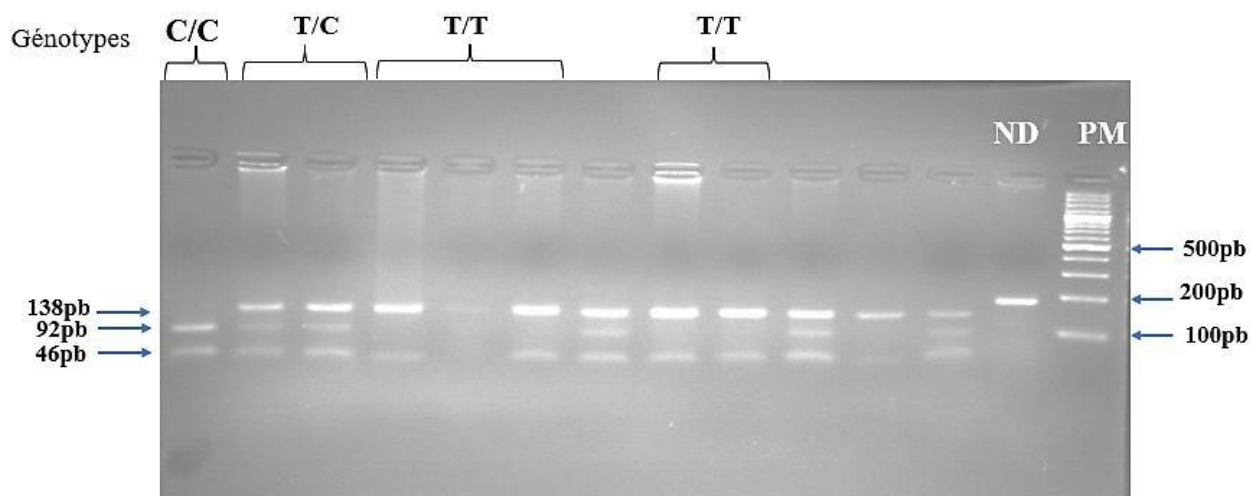


Figure 9 : Electrophorèse sur gel d'agarose (2,5%) pour les produits RFLP des patients.

2.2) Fréquences génotypiques et alléliques chez les individus analysés

Les trois génotypes ont été identifiés chez les deux groupes d'individus analysés, avec des proportions variables (Tableau VI).

Tableau VI : Les fréquences génotypiques et alléliques chez les témoins et les patients.

		Témoins n (%)	Patients FMF n (%)	p
Génotypes	-786T/T	16 (42,10)	6 (30)	0,1211
	-786T/C	13 (34,21)	9 (45)	0,0500
	-786C/C	9 (23,68)	5 (25)	0,3553
	Total	38 (100)	20 (100)	
Allèles	T	45 (59,21)	21 (52,5)	0,067
	C	31 (40,79)	19 (47,50)	0,050
	Total	76 (100)	40 (100)	

Les trois génotypes identifiés avec des fréquences variables entre les deux groupes d'individus étudiés. Dans tous les cas, les différences ne sont pas statistiquement significatives. Chez les témoins, la proportion du génotype homozygote -786 T/T est supérieure à celle observée chez les patients FMF (tableau VI), cependant la différence n'est pas significative ($p=0,1211$) (Figure 10).

Par contre le génotype hétérozygote -786T/C est plus élevé chez les patients FMF comparé aux témoins, mais la différence n'a pas atteint un seuil significatif ($p=0,0500$).

Les résultats ont permis de montrer que le génotype homozygote -786C/C est moins fréquent par rapport aux autres génotypes. Il est moins rencontré chez les patients comparé aux témoins ($p=0,3553$).

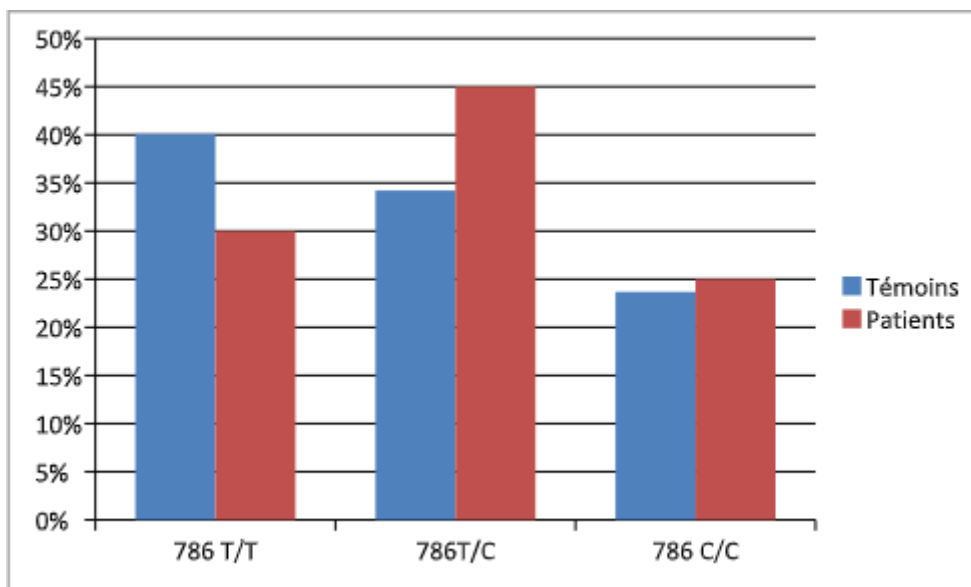


Figure 10 : Histogramme montrant les fréquences génotypiques chez les témoins et les patients.

La détermination des fréquences alléliques chez les individus témoins (N=76) et chez les patients (N= 40) (Tableau VI) a montré une prédominance non significative de l'allèle T chez les témoins comparé aux patients ($p= 0,067$). Inversement, l'allèle C est plus fréquent chez les patients FMF par rapport aux témoins, mais la différence n'est pas significative ($p= 0,050$).

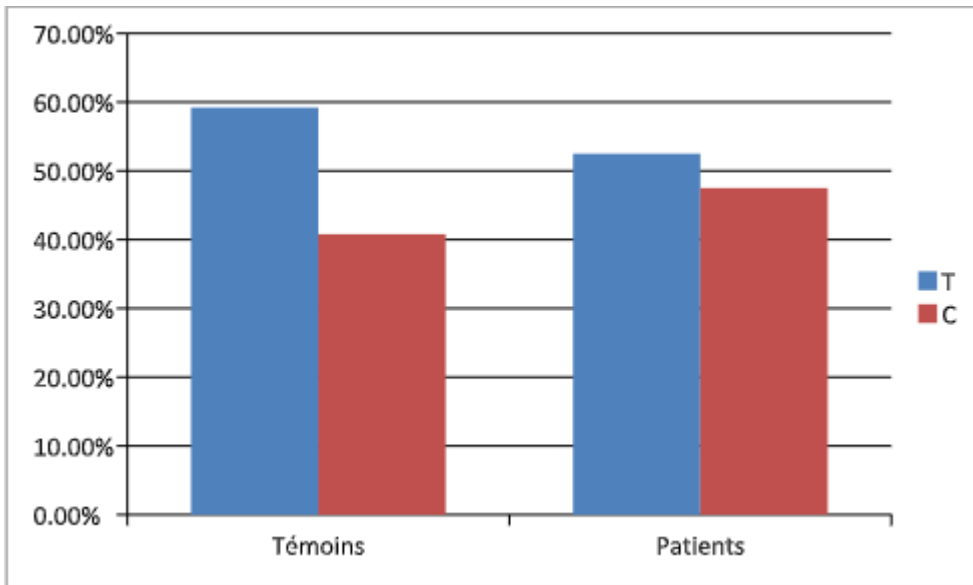


Figure 11 : Histogramme montrant les fréquences alléliques chez les témoins et les patients.

B- Discussion

Les variants polymorphes d'eNOS ont été largement étudiés pour déterminer leur impact, principalement dans les maladies cardiovasculaires (Vecoli, 2014).

Dans cette étude, l'exploration du SNP -786T>C a été réalisée chez un groupe d'individus sains et un groupe de patients FMF. La détermination des fréquences génotypiques et des fréquences alléliques n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes analysés. Ce résultat semble écarter l'implication du polymorphisme étudié dans le mécanisme pathologique de la FMF. Dans les autres populations, ce SNP n'a pas été exploré chez les patients FMF. Un seul variant du gène eNOS a été exploré. Il s'agit du VNTR dont l'implication dans le développement de la FMF ainsi que son association avec les symptômes cliniques a été recherchée chez 160 patients turques et 147 témoins ou individus sains. Trois génotypes ont été identifiés : 4a/4a, 4a/4b et 4b/4b. Le génotype 4b/4b était significativement plus élevé chez les patients FMF (67,5%) par rapport aux témoins (57,82%) ($p < 0,05$). Le génotype 4a/4a était moins fréquent, mais significativement plus élevé chez les patients FMF (5,62%) comparé aux témoins (2,04%). Concernant le génotype 4a/4b, aucune différence significative n'a été trouvée entre les patients (26,87%) et les contrôles (40,13%) ($p > 0,05$). Par ailleurs, cette étude n'a rapporté aucune association entre les symptômes cliniques de la FMF et le génotype au niveau du locus analysé. Cependant, il a été montré une résistance à la colchicine chez les patients homozygotes 4b/4b (Türkeli et al., 2022).

Dans la population Algérienne, le polymorphisme -786T/C de l'eNOS a été exploré dans d'autres situations pathologiques. Dans le cas de la rétinopathie secondaire au diabète de type 1, la prédominance du génotype C/C chez les patients ayant développé une rétinopathie a été démontrée. Inversement, le génotype T/T a été surtout observé chez les patients n'ayant pas développé la complication oculaire, mais la différence n'a pas atteint un seuil significatif (Mihoubi et al., 2019). Par ailleurs, l'allèle -786C a été rapporté comme un facteur de risque génétique lié à l'hypertension artérielle à partir d'un échantillon de patients originaires de la ville d'Oran. Dans cette étude, cet allèle a été retrouvé avec une fréquence significativement plus élevée chez les patients hypertendus par rapport aux témoins (Amrani-Midoun et al., 2019).

L'implication du polymorphisme -786T/C dans la néphropathie diabétique a été explorée chez les patients diabétiques Tunisiens. Le génotype T/T était significativement plus élevé chez les individus sains comparé aux patients diabétiques avec et sans néphropathie. Le génotype C/C était significativement plus élevé chez les patients diabétiques sans complication rénale (8,1%) par rapport aux patients avec néphropathie (6,7%), mais comparable avec les individus sains (4,9%). Ce résultat a permis de conférer un rôle protecteur au génotype -786C/C contre la néphropathie diabétique chez les patients Tunisiens (Ezzidi et al., 2008).

Conclusion et perspectives

Ce travail a eu comme principal objectif d'étudier la distribution du polymorphisme -786T/C chez un groupe de patients atteints de FMF et un groupe d'individus sains. Le résultat obtenu semble écarter une éventuelle implication de ce polymorphisme dans le mécanisme physiopathologique de la FMF. Par ailleurs, les résultats de ce mémoire constituent une contribution à la génétique des populations de la population Algérienne, puisque la répartition du SNP -786T/C a été également étudiée chez des individus sains pris au hasard de la population Algérienne.

Cette étude est limitée par le nombre d'individus analysés qui est relativement faible. Ainsi, il serait très intéressant d'inclure plus de patients et de témoins dans futures études. Aussi, cette étude doit être complétée par l'analyse des autres polymorphismes, à savoir le VNTR situé dans l'intron 4 et le SNP 894G>T situé dans l'exon 7 du gène *eNOS*. Sur le plan clinique, il faudrait rechercher une corrélation entre ces 3 polymorphismes et les symptômes cliniques de la FMF. Aussi, il serait intéressant d'explorer ces polymorphismes chez les patients FMF ayant développé une amylose rénale de type AA, ce qui pourrait constituer révéler autre marqueur moléculaire de cette complication rénale

Références bibliographiques

Abbara, S., Grateau, G., Ducharme-Bénard, S., Saadoun, D., Georgin-Lavialle, S., 2019. Association of Vasculitis and Familial Mediterranean Fever. *Front Immunol* 10, 763.

Ait Idir D., Khilan A., Djerdjouri B., et EL-shanti H., 2011. Spectrum of mutations and carrier frequency of familial Mediterranean fever gene in the Algerian population. *Rhumatol*, 20:2306-10

Albrecht, E.W., Stegeman, C.A., Heeringa, P., Henning, R.H., van Goor, H., 2003. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 199, 8-17

Amrani-Midoun, A., Kiando, S. R., Treard, C., Jeunemaitre, X., Bouatia-Naji, N. 2019 Genetic association study between T-786C NOS3 polymorphism and essential hypertension in an Algerian population of the Oran city. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(2), 1317-1320.

Barbosa, A. M., Silva, K. S. F., Lazares, M. H., Rodrigues, D. A., Da Costa, I. R., Morais, M. P., Moura, K. K. V. O. 2017. Atherosclerosis: analysis of the eNOS (T786C) gene polymorphism. *Genetics and Molecular Research* 16,1-9

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

Ben-Chetrit, E., Touitou, I., 2009. Familial Mediterranean fever in the world. *Arthritis Care & Research* 61, 1447-1453.

Benhamou, Y., Bellien, J., Armengol, G., Gomez, E., Richard, V., Lévesque, H., Joannidès, R., 2014. [Assessment of endothelial function in autoimmune diseases]. *Rev Med Interne* 35, 512-523.

Berkun, Y., Eisenstein, E.M., 2014. Diagnostic criteria of familial Mediterranean fever. *Autoimmun Rev* 13, 388-390.

Bodar, E.J., Drenth, J.P., Van Der Meer, J.W., Simon, A., 2009. Dysregulation of innate immunity: hereditary periodic fever syndromes. *British journal of haematology* 144, 279-302.

Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C., Kingma, D.W., Horwitz, M.E., Mansfield, E., Holland, S.M., 2000. The gene for familial Mediterranean fever,

Références bibliographiques

MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 95, 3223-3231.

Consortium, F.F., Bernot, A., Clepet, C., Dasilva, C., Devaud, C., Petit, J.-L., Caloustian, C., Cruaud, C., Samson, D., Pulcini, F., 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nature genetics* 17, 25-31.

Cooke, G.E., Doshi, A., Binkley, P.F., 2007. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease.

Dahboul, F., 2013. Évaluations physico-chimique, biochimique et pharmacologique de S-nitrosothiols: rôle des enzymes membranaires dans la libération de l'oxyde nitrique. Université de Lorraine.

Ezzidi, I., Mtiraoui, N., Mohamed, M. B. H., Mahjoub, T., Kacem, M., & Almawi, W. Y. 2008 Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T> C gene variants with diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes and its Complications*, 22(5), 331-338

Fels, J., Oberleithner, H., Kusche-Vihrog, K., 2010. Menage a trois: aldosterone, sodium and nitric oxide in vascular endothelium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1802, 1193-1202.

Förstermann, U., Boissel, J.P., Kleinert, H., 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12, 773-790.

Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 33, 829-837

Georgin-Lavialle, S., Rodrigues, F., Hentgen, V., Fayand, A., Quartier, P., Bader-Meunier, B., Grateau, G. 2018 Panorama des maladies auto-inflammatoires. *La Revue de Médecine Interne*, 39(4), 214-232

Grateau, G., Verine, J., Delpech, M., Ries, M., 2005. [Amyloidosis: a model of misfolded protein disorder]. *Medicine Sciences: M/S* 21, 627-633.

Griffith, O. W., Stuehr, D. J. 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annual review of physiology*, 57(1), 707-734.

H Oliveira-Paula, G., Lacchini, R., E Tanus-Santos, J., 2014. Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension. *Current drug targets* 15, 164-174.

Références bibliographiques

Hashim, H. O., Al-Shuhaib, M. B. S. 2019 . Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of applied biotechnology reports*, 6(4), 137-144.

HELLER, H., SOHAR, E., SHERF, L., 1958. Familial mediterranean fever. *AMA archives of internal medicine* 102, 50-71.

Hentgen, V., Grateau, G., Stankovic-Stojanovic, K., Amselem, S., Jéru, I., 2013. Familial Mediterranean fever in heterozygotes: are we able to accurately diagnose the disease in very young children? *Arthritis & Rheumatism* 65, 1654-1662.

Hickok, J. R., & Thomas, D. D. 2010. Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes. *Current pharmaceutical design*, 16(4), 381-391.

Hobbs, A.J., Higgs, A., Moncada, S., 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 191-220.

Janeway, T.C., Mosenthal, H., 1908. AN UNUSUAL PAROXYSMAL SYNDROME, PROBABLY ALLIED TO RECURRENT VOMITING: WITH A STUDY OF THE NITROGEN METABOLISM. *Archives of Internal Medicine* 2, 214-225.

Karantzoulis-Fegaras, F., Antoniou, H., Lai, S.-L.M., Kulkarni, G., D'Abreo, C., Wong, G.K., Miller, T.L., Chan, Y., Atkins, J., Wang, Y., 1999. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *Journal of biological chemistry* 274, 3076-3093.

Khalil, M.I., 2021. Different types of PCR. *Gsj*, 9.

Lacchini, R., Silva, P.S., Tanus-Santos, J.E., 2010. A Pharmacogenetics-based Approach to Reduce Cardiovascular Mortality with the Prophylactic Use of Statins. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 106, 357-361.

Lachaux, M., 2019. Nouvelles cibles pharmacologiques du traitement de la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique. *Normandie Université*.

Li, H., Wallerath, T., Förstermann, U., 2002. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7, 132-147.

Marsden, P.A., Heng, H., Scherer, S., Stewart, R., Hall, A., Shi, X., Tsui, L., Schappert, K., 1993. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of biological chemistry* 268, 17478-17488.

Références bibliographiques

Masters, S.L., Simon, A., Aksentijevich, I., Kastner, D.L., 2009. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annual review of immunology* 27, 621-668.

Medlej-Hashim, M., Loiselet, J., Lefranc, G., Mégarbané, A., 2004. La fièvre méditerranéenne familiale (FMF): du diagnostic au traitement. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé* 14, 261-266.

Méry, J.-P., Dodé, C., Grateau, G., 2001. Les fièvres récurrentes héréditaires à l'ère de la biologie moléculaire. *MS. Médecine sciences* 17, 1008-1016.

Moncada, S., Higgs, A., Furchgott, R., 1997. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacological reviews* 49, 137-142.

Mihoubi, E., Bouldjennet, F., Raache, R., Amroun, H., Azzouz, M., Benazouz, N., ...Attal, N. 2019. Polymorphisme T-786C de l'eNOS dans la rétinopathie du diabète de type 1 chez la population algérienne. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 42(6), 579-585.

Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England journal of medicine* 329, 2002-2012.

Muller, W.A., 2009. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circulation research* 105, 223-230.

Nadaud, S., Laumonier, Y., Soubrier, F., 2000. Aspects moléculaires de l'expression et de la régulation de la synthase endothéliale du monoxyde d'azote. *Journal de la Société de Biologie* 194, 131-135.

Nakayama, M., Yasue, H., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Kugiyama, K., Ogawa, H., Motoyama, T., Saito, Y., Ogawa, Y., Miyamoto, Y., 1999. T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99, 2864-2

Ozdogan, H., Ugurlu, S., 2019. Familial Mediterranean Fever. *Presse Med* 48, e61-e76

Rana, B., & Joshi, GK 2023. Électrophorèse : principe de base, types et applications. Dans *Biotechniques de base pour les bioprocédés et le bioentrepreneuriat* (pp. 183-193). Presse académique

Reiss, C.S, Komatsu, T., 1998. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *Journal of virology* 72,4547-4551.

Salvi, E., Kuznetsova, T., Thijs, L., Lupoli, S., Stolarz-Skrzypek, K., D'Avila, F., Tikhonoff, V., De Astis, S., Barcella, M., Seidlerová, J., 2013. Target sequencing, cell experiments, and a

Références bibliographiques

population study establish endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene as hypertension susceptibility gene. *Hypertension* 62, 844-852.

Sahin, S., Romano, M., Guzel, F., Piskin, D., Poddighe, D., Sezer, S., ... Demirkaya, E. 2022. Assessment of surrogate markers for cardiovascular disease in familial Mediterranean fever-related amyloidosis patients homozygous for M694V mutation in *MEFV* gene. *Life*, 12(5), 631

Santos, K. G., Crispim, D., Canani, L. H., Ferrugem, P. T., Gross, J. L., & Roisenberg, I. 2011. Association of eNOS gene polymorphisms with renal disease in Caucasians with type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 91(3), 353-362.

Savey, L., Grateau, G., Georgin-Lavialle, S., 2021. Fièvre méditerranéenne familiale en 2020. *Néphrologie & Thérapeutique* 17, S119-S125

Scarpioni, R., Ricardi, M., Albertazzi, V., 2016. Secondary amyloidosis in autoinflammatory diseases and the role of inflammation in renal damage. *World Journal of Nephrology* 5, 66.

Shinar, Y., Obici, L., Aksentijevich, I., Bennetts, B., Austrup, F., Ceccherini, I., Costa, J.M., De Leener, A., Gattorno, M., Kania, U., 2012. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Annals of the rheumatic diseases* 71, 1599-1605.

SIEGAL, S. 1945 Benign paroxysmal peritonitis. *Annals of internal medicine*, 23(1), 1-21.

Sönmez, H.E., Bayındır, Y., Batu, E.D., 2023. Cardiovascular manifestations of monogenic periodic fever syndromes. *Clinical Rheumatology*, 1-16.

Suschek, C.V., Bonmann, E., Kapsokefalou, A., Hemmrich, K., Kleinert, H., Förstermann, U., Kröncke, K.-D., Mahotka, C., Kolb-Bachofen, V., 2002. Revisiting an Old Antimicrobial Drug: Amphotericin B Induces Interleukin-1-Converting Enzyme as the Main Factor for Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression in Activated Endothelia. *Molecular pharmacology* 62, 936-946.

Tagu, D., & Jaubert-Possamai, S. 2018. *Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique: 3e édition revue et augmentée*. Quae

The International FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. 1997. *Nat Genet* 17, 25-31.

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

Touitou, I., 2001. The spectrum of familial Mediterranean fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics* 9, 473-483.

Références bibliographiques

Türkeli, Ö. S., Nursal, A. F., Yiğit, S., Tekcan, A. 2022. Analysis of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene VNTR Variant in Turkish FMF Patients. *Medical Journal of Bakirkoy*, 18.

Vallance, P., Collier, J., 1994. Fortnightly review biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ* 309, 453-457.

Vecoli, C 2014. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in cardiovascular disease. In *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp.387-406.

Wang, Y., Marsden, P.A., 1995. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 34, 71-90.

Wang, J., Dudley, D., Wang, X.L., 2002. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, e1-e4.

Wattanapitayakul, S.K., Mihm, M.J., Young, A.P., Bauer, J.A., 2001. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends in pharmacological sciences* 22, 361-368.

Yüksel, Ş., Ayvazyan, L., Gasparyan, A.Y., 2010. Familial Mediterranean fever as an emerging clinical model of atherogenesis associated with low-grade inflammation. *The open cardiovascular medicine journal* 4, 51.

Yuval, Y., Hemo-Zisser, M., Zemer, D., Sohar, E., Pras, M., 1995. Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever (FMF). *American journal of medical genetics* 57, 455-457.

Zhang, M.-X., Zhang, C., Shen, Y.H., Wang, J., Li, X.-N., Chen, L., Zhang, Y., Coselli, J.S., Wang, X.L., 2008a. Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. *Molecular biology of the cell* 19, 3997-4005.

Zhang, M.-Zhang, C., Shen, Y.H., Wang, J., Li, X.N., Zhang, Y., Coselli, J., Wang, X.L., 2008b. Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric-oxide synthase gene. *Journal of biological chemistry* 283, 14685-14693.

Résumé

.La fièvre méditerranéenne familiale (FMF) est une maladie à transmission autosomique récessive, due à des mutations qui touchent le gène MEFV. Il s'agit d'une maladie auto inflammatoire caractérisée par une inflammation chronique qui peut conduire à une amylose rénale AA, mais aussi à des lésions vasculaires. Le gène eNOS, siège des polymorphismes, dont l'un est exploré dans cette étude. Il s'agit du polymorphisme bi allélique g-786T>C, pour mettre en évidence son éventuelle implications dans la FMF. Pour cela une étude cas-témoins a été réalisée. Les génotypes TT, TC, CC ont été déterminés par la technique PCR-RFLP, en utilisant l'enzyme de restriction MspI. Les résultats obtenus écartent l'implication de ce polymorphisme dans FMF car les fréquences génotypiques et alléliques ne montrent aucune différence significative entre les deux groupes d'individus étudiés. Ainsi, une exploration des autres polymorphismes du gène eNOS est recommandé afin de rechercher la corrélation entre ces trois polymorphismes et les signes cliniques de la FMF.

Mots clés: eNOS, Fièvre Méditerranéenne familiale, polymorphisme g-786T>C, PCR-RFLP

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal disease recessive, due to mutations affecting the MEFV gene. It is a disease auto inflammatory disease characterized by chronic inflammation that can lead to AA renal amyloidosis, but also to vascular damage. The eNOS gene, seat of polymorphisms, one of which is explored in this study. This is the bi-allelic polymorphism g-786T>C, to highlight its possible implications in FMF. For a case-control study was carried out. The TT, TC, CC genotypes were determined by the PCR-RFLP technique, using the restriction enzyme MspI. The results obtained rule out the implication of this polymorphism in FMF because the genotypic and allelic frequencies do not show no significant difference between the two groups of individuals studied. So, an exploration of other polymorphisms of the eNOS gene is recommended in order to find the correlation between these three polymorphisms and the clinical signs of FMF. Key words

Key words: eNOS, Familial Mediterranean Fever, polymorphismg-786T>C, PC-RFLP

ملخص

حمى البحر الأبيض المتوسط العائلية (FMF) هي مرض وراثي جسيمي متنحي، ناجم عن طفرات تؤثر على جين MEFV. وهو مرض التهابي ذاتي يتميز بالتهاب مزمن يمكن أن يؤدي إلى الداء النشواني الكلوي AA ، ولكن أيضاً إلى آفات الأوعية الدموية. جين eNOS ، مقر تعدد الأشكال، والذي تم استكشاف أحده في هذه الدراسة. هذا هو تعدد الأشكال g-786T>C ثنائي الأليلية، لتسليط الضوء على آثاره المحتملة في FMF. ولهذا الغرض، تم إجراء دراسة الحالات والشواهد. تم تحديد الأنماط الجينية TT ، TC ، CC بواسطة تقنية PCR-RFLP باستخدام إنزيم التقطيع MspI. النتائج التي تم الحصول عليها تستبعد تورط هذا تعدد الأشكال في FMF لأن التكرارات الوراثية والأليلية لا تظهر فرقا كبيرا بين مجموعتي الأفراد الذين تمت دراستهم. وبالتالي، يوصى باستكشاف الأشكال المتعددة الأخرى لجين eNOS من أجل البحث عن العلاقة بين هذه الأشكال الثلاثة والعلامات السريرية لمرض FMF.

الكلمات المفتاحية: eNOS ، حمى البحر الأبيض المتوسط العائلية، تعدد الأشكال g-786T>C ، PCR-RFLP