

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 de Boumerdès



Faculté des Sciences  
Département de Biologie

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

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

Filière : **Sciences biologiques**

Spécialité : **Génétique**

**Thème :**

**Etude des facteurs génétiques liés au développement de  
l'amylose rénale AA secondaire à la Fièvre Méditerranéenne  
Familiale**

**Présenté par :** Mr GOUGAM Hocine  
Mr ISSAD Yanis  
M<sup>lle</sup> KHITER Ouahiba

Soutenu le : 09/11/2020, devant le jury :

<b>Présidente :</b>	Mme KHEMILI-TALBI Souad.....	MCA	(UMBB)
<b>Promotrice :</b>	Mme AIT-IDIR Djouher.....	MCA	(UMBB)
<b>Examinatrice :</b>	Mme BOUKERCHA Aziza.....	MCB	(UMBB)
<b>Examinatrice :</b>	Mme BENHABYLES-BOUTTABA Narimen.....	MCB	(UMBB)

Promotion 2019/202

**Ce travail est dédié à nos parents.**

## Remerciements

Au terme de notre cursus universitaire suivi à l'UMBB, couronné par l'élaboration de ce mémoire de fin d'étude, mémoire qui nous aura demandé patience, endurance et surtout exigence, nous tenons à adresser nos sincères remerciements à:

Madame **AIT IDIR Djouher** qui dans son rôle de promotrice aura su, malgré les obstacles, trouver les ressources nécessaires afin de nous permettre de tirer le meilleur de nous-mêmes et dont l'écoute, la rigueur et la confiance auront été sans faille. Nous tenions également et surtout à vous remercier, Madame, pour le sens des responsabilités et du dévouement exemplaire dont vous avez fait part envers l'ensemble de notre promotion au moment où elle en avait le plus besoin.

Nous ne saurions poursuivre ces remerciements sans un mot de gratitude envers l'ensemble de nos professeurs et tout le corps universitaire, qu'il nous a été donné le privilège de côtoyer, pour tout ce qu'ils ont su nous apporter pendant ces années, ainsi qu'aux membre du jury qui nous ont fait l'honneur d'avoir pris sur eux la charge d'examiner et d'évaluer le fruit de nos efforts.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis qui nous auront toujours soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce projet, ainsi qu'à toute personne nous faisant l'honneur d'accorder du temps à sa lecture.

# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## **Partie 1 : Synthèse bibliographique**

<b>I – Fièvre méditerranéenne familiale (FMF).....</b>	<b>2</b>
--	----------

1) Aspects cliniques de la FMF.....	2
1.1) Symptomatologie.....	3
1.2) Complication rénale.....	3
2) Génétique de la FMF.....	4
2.1) Le gène <i>MEFV</i> .....	4
2.2) Variants nucléotidiques associés au <i>MEFV</i> .....	5
3) Mécanisme pathogénique de la FMF.....	6
3.1) Sécrétion de l'IL-1 $\beta$ : voie de l'inflammasome-pyrine.....	6
3.2) Effet des mutations de la pyrine sur la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ .....	7
3.3) Effets biologiques de l'IL-1 $\beta$ .....	8
4) Traitement de la FMF.....	9

<b>II – Amylose rénale AA secondaire à la FMF.....</b>	<b>10</b>
--	-----------

1) Amylose AA : définition.....	10
2) Prévalence de l'amylose AA.....	10
2.1) Prévalence de l'amylose AA selon les ethnies.....	10
2.2) Prévalence de l'amylose AA en fonction des maladies auto- Inflammatoires.....	11
3) Facteurs génétiques liés au développement d'amylose AA.....	12
3.1) Mutations dans le gène <i>MEFV</i> .....	12
3.2) Polymorphismes dans les gènes <i>SAA</i> .....	13
3.2.1) Famille des gènes <i>SAA</i> .....	13
3.2.2) Le gène <i>SAA1</i> : structure et régulation.....	13
3.2.3) Polymorphismes du gène <i>SAA1</i> liés à l'amylose rénale AA.....	16
4) Structure et isoformes de la protéine <i>SAA1</i> .....	17
5) Physiopathologie de l'amylose AA.....	18

## **Partie 2 : Approche méthodologique appliquée à la thématique étudiée**

1) Recrutement des patients.....	20
2) Analyse génétique.....	21
2.1) Extraction de l'ADN génomique à partir du sang total.....	21
2.1.1) Technique au salting-out.....	21
2.1.2) Méthode au phénol-chloroforme.....	22
2.1.3) Dosage spectrophotométrique et pureté de l'ADN extrait.....	22
2.1.4) Contrôle qualitatif des acides nucléiques extrait par électrophorèse sur gel d'agarose.....	23
2.2) Recherche des mutations dans le gène <i>MEFV</i> .....	23
2.2.1) Technique PCR-ARMS.....	23
2.2.2) Séquençage par la méthode de Sanger.....	25
2.2.3) Next Generation Sequencing (NGS).....	27
2.3) Recherche des polymorphismes dans le gène <i>SAAI</i> par PCR-RFLP.....	28
2.3.1) Principe de la PCR-RFLP.....	28
2.3.2) Action des enzymes de restriction sur le fragment amplifié.....	29
3) Analyse statistique.....	30
3.1) Comparaison de deux proportions.....	31
3.2) Régression logistique : variable indépendante dichotomique.....	31

## **Partie 3 : Etude cas-témoins**

<b>I – Résultats.....</b>	<b>33</b>
1) Patients et individus.....	33
2) Etude génétique.....	34
2.1) Mutations du gène <i>MEFV</i> .....	34
2.2) Polymorphismes du gène <i>SAAI</i> .....	37
2.3) Distribution des génotypes au locus <i>SAAI</i> en fonction des génotypes du <i>MEFV</i> .....	40
3) Estimation du risque par régression logistique.....	41
<b>II – Discussion.....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>47</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>48</b>
<b>Annexes.....</b>	
<b>Résumé.....</b>	

## **LISTE DES FIGURES**

**Figure 1** : Structure schématisée du gène *MEFV*, de la pyrine et ses partenaires d'interaction : p5.

**Figure 2** : Modèle hypothétique illustrant l'activation de l'inflammasome dépendant de la pyrine : p8.

**Figure 3** : Organisation du groupe de gènes SAA humains sur le chromosome 15 : p14.

**Figure 4** : Schéma des voies de transduction du signal impliquées dans l'induction des transcriptions du gène A-SAA lors de la réaction en phase aiguë (RPA) : p16.

**Figure 5** : Représentation schématique linéaire de la protéine SAA1 et les différentes isotypes SAA1 humains : p17.

**Figure 6** : Mécanisme de formation des dépôts amyloïdes à l'origine de l'amylose de type AA : p19.

**Figure 7** : Principe schématisé de la PCR-ARMS : p24.

**Figure 8** : Exemple de profil électrophorétique sur gel d'agarose (2%) pour la mise en évidence de la mutation p.M694I chez deux familles Algériennes : p25.

**Figure 9** : Synthèse de l'ADN complémentaire à partir de dNTPs et ddNTPs : p26.

**Figure 10** : Exemple d'un électrophérogramme chez un patient FMF hétérozygote composite : p26.

**Figure 11** : Principe schématisé de la PCR-RFLP : p29.

**Figure 12** : séquence amplifiée (<http://genome.ucsc.edu/>) contenant les deux SNP d'intérêt : p30.

**Figure 13** : Les différents profils de restriction en fonction du génotype au locus *SAA1*: p30.

**Figure 14** : Distribution des fréquences alléliques des variants du *MEFV* chez les patients atteints de FMF avec et sans amylose AA : p35.

**Figure 15** : Distribution des génotypes du gène *MEFV* chez des patients atteints de FMF avec et sans amylose rénale AA : p36.

**Figure 16, A** : Profil de restriction obtenu avec *BclI* chez quelques patients FMF : p37.

**Figure 16, B** : Profil de restriction obtenu avec *BanI* chez quelques patients FMF : p37.

**Figure 17** : Histogramme montrant les fréquences alléliques chez les trois groupes étudiés : p38.

**Figure 18** : Fréquences des génotypes du *SAA1* chez des patients atteints de FMF (avec et sans amylose) et chez des témoins sains : p40.

**Figure 19**: Répartition du génotype *SAAα/α* en fonction des génotypes du *MEFV* : p41.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau I :** Prévalence de l'amylose AA chez les patients atteints de FMF dans différents groupes ethniques : p11.

**Tableau II :** Prévalence de l'amylose AA dans des maladies auto-inflammatoires spécifiques en l'absence de traitement : p11.

**Tableau III :** Association entre les génotypes du *MEFV* et l'amylose AA chez les différents groupes ethniques: p12.

**Tableau IV :** Critères diagnostiques de Tel-Hashomer : p20.

**Tableau V :** Critères pédiatriques selon Yalcinkaya: p20.

**Tableau VI :** Nombres et fréquences alléliques des variants du *MEFV* chez les deux groupes de patients : p34.

**Tableau VII :** Répartition des génotypes identifiés chez les deux groupes de patients : p36.

**Tableau VIII :** Comparaison des nombres et des fréquences alléliques au locus *SAA1* chez des patients atteints de FMF avec ou sans amylose et chez des témoins sains : p38.

**Tableau IX:** Proportions des génotypes dans le locus *SAA1* chez les trois groupes analysés: p39

**Tableau X :** Tableau de contingence 2×2 montrant la distribution du génotype M694I/M694I et de l'amylose AA : p42.

**Tableau XI :** Tableau de contingence 2×2 montrant la distribution du génotype SAA1α/α et de l'amylose AA : p42.

**Tableau XII :** Résultats de la régression logistique : p42.

**Tableau XIII :** Liste des études incluses étudiant les génotypes du gène *MEFV* et les haplotypes du gène *SAA1* associés au risque de développement d'amylose secondaire à la FMF : p46.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**AA:** Amyloid Associated.

**ADP:** Adénosine Diphosphate.

**ADN :** Acide Désoxyribonucléique.

**AL:** Amyloïde à chaîne Légère

**AP-2:** Activating protein 2.

**ARNm :** Acide RiboNucléique message.

**A-SAA :** Protéine SAA1 et SAA2.

**ASC:** Apoptosis-associated Speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain.

**bBox:** B-box-type zinc finger domain

**bZip:** Basic Leucine Zipper

**CARD:** Caspase Activation and Recruitment Domains

**CC:** Coiled Coil

**C/EBP:** CCAAT-Enhancer-Binding Proteins.

**CRP :** Protéine C Réactive.

**HIDS:** Hyper-IgD syndrome.

**HRF :** Fièvres récurrentes héréditaires.

**IL-1 $\beta$ :** Interleukine 1 bêta.

**IL-8 :** Interleukine 8.

**MAI:** Maladie auto inflammatoire.

**MEFV:** Mediterranean Fever.

**MMP:** Métalloprotéases Matricielles.

**MVK:** Mévalonate Kinase.

**MWS:** Muckle–Wells syndrome.

**NaCl:** Chlorure de sodium.

**Na<sub>2</sub>EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic Acid, Disodium Salt.

**NF $\kappa$ B:** Nuclear factor-kappa B.

**ddNTP:** didésoxyribonucléotide triphosphates.

**DGGE :** Electrophorèse sur gel à gradient de dénaturation.

**DIRA :** Déficit en antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1.

**dNTPs :** Désoxyribonucléotides triphosphates.

**FCAS:** Familial cold autoinflammatory syndrome.

**FMF :** Fièvre Méditerranéenne Familiale.

**GDP:** Guanosine diphosphate.

**GTP:** Guanosine triphosphate.

**GEF-H1:** Guanine nucleotide Exchange Factors H1.

**H<sub>0</sub>:** Hypothèse nulle.

**HDL:** High Density Lipoprotein

**IL-6:** Interleukine 6.

**I $\kappa$ B:** Inhibitor of kappa B kinases

**LPS:** Lipopolysaccharide

**NF-IL6:** Nuclear Factor for Interleukin-6.

**NGS:** Next Generation Sequencing.

**NLRP3:** NLR Family Pyrin Domain Containing 3 gene.

**OR:** Odd ratio.

**PCR:** Polymerase chain reaction.

**PCR-ARMS:** Amplification Refractory Mutation System.

**PCR-RFLP:** Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism.

**PFAPA:** Periodic fever adenitis pharyngitis and aphthous stomatitis.

**PKN1:**Sérine/thréonine-Protein Kinase N1

**PYD:**Pyrin Domain.

**SAA:** Serum Amyloid A.

**SAF:** SAS-binding Factor.

**SAIDs :** Maladies auto-inflammatoires systémiques.

**SAS:** SAA-activating Sequence.

**SAP:** Serum-amyloid P.

**SDS:** Sodium dodécylsulfate.

**SNP:** Single-Nucleotide Polymorphism.

**Sp1:** Specificity protein 1.

**TNF $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**TRAPS:** TNF receptor-associated periodic fever syndrome.

**UTR:**

Untranslated Transcribed Region.**VUS:**

Variant of Uncertain significance.

**WES:**Whole exom sequencing.

**WGS:** whole genome sequencing.

**YY1:** Yin and Yang

# **Introduction**

Les maladies auto-inflammatoires (MAI) systémiques sont un groupe de troubles rares caractérisés par des épisodes inflammatoires spontanés. Elles se manifestent par des poussées de fièvre récurrentes, souvent accompagnées d'inflammations au niveau des séreuses (Ben-Chetrit et Levy, 1998). Parmi ces MAI, la fièvre méditerranéenne familiale (FMF) est la plus courante et la première à avoir été liée à des mutations génétiques (Samuels and Ozen, 2006). Elle touche particulièrement certains groupes ethniques, principalement les Juifs, les Turcs, les Arabes et les Arméniens (Ben-Chetrit et Toutou, 2009). La FMF est causée par des mutations qui touchent le gène *MEFV* et se transmet selon un mode autosomique récessif (International FMF consortium, 1997 ; The French FMF Consortium, 1997).

La complication la plus sévère de la FMF est l'amylose de type AA, qui touche principalement les reins, pouvant entraîner une insuffisance rénale terminale et le décès du patient (Ben-Chetrit and Levy, 1998). Son incidence varie selon les groupes ethniques (Mimouni *et al.*, 2000). La mutation p.M694V du gène *MEFV* s'est avérée être un facteur de risque important pour le développement de l'amylose chez différents groupes ethniques (Cazeneuve *et al.*, 1999; Mimouni *et al.*, 2000). L'autre facteur pouvant influencer le risque de survenue de cette complication est le gène *SAA1*. Les polymorphismes bi-alléliques dans l'exon 3 du gène *SAA1* définissent 3 haplotypes : SAA1 $\alpha$ , SAA1 $\beta$  et SAA1 $\gamma$ . Des études ont rapporté que chez les Caucasiens, les patients ayant un génotype SAA1 $\alpha/\alpha$  ont plus de risque de développer une amylose rénale secondaire à la FMF, indépendamment du génotype du *MEFV* (van der Hilst *et al.*, 2005).

Ce travail porte sur une étude rétrospective (étude cas-témoins) visant à analyser des résultats, déjà obtenus, afin d'identifier les facteurs de risque génétiques pouvant influencer la survenue de l'amylose AA au cours de la FMF dans la population Algérienne, par :

1. Une identification des mutations de l'exon 10 du gène *MEFV* les plus associées au développement de l'amylose AA.
2. Une identification des polymorphismes dans l'exon 3 du gène *SAA1* des différents groupes étudiés.

L'analyse a inclut une cohorte de 62 patients FMF Algériens non apparentés et 13 individus sains.

Le travail présenté ici s'articule comme suit :

- Une synthèse bibliographique,
- Une présentation des méthodes d'analyse génétique appliquées à la thématique étudiée,
- Une étude rétrospective cas-témoins.

**Partie I**

**Synthèse bibliographique**

## I) Fièvre méditerranéenne familiale (FMF)

La FMF appartient au groupe des fièvres récurrentes héréditaires (FRH) faisant partie des maladies auto-inflammatoires monogéniques. Le concept d'auto-inflammation a été proposé pour la première fois en 1999 par McDermott suite à la découverte du syndrome de TRAPS (*TNF receptor-associated periodic fever syndrome*)(McDermott *et al.*, 1999). Initialement, les maladies auto-inflammatoires ont été définies par la présence d'un syndrome inflammatoire biologique non spécifique et se distinguent des maladies auto-immunes, par l'absence d'auto-anticorps et de lymphocytes T auto-réactifs(McDermott *et al.*, 1999 ; McDermott et Aksentijevich, 2002). Plus récemment, les MAI ont été redéfinies comme étant un groupe de maladies génétiquement hétérogènes causées par des mutations qui touchent les gènes qui codent pour les protéines qui jouent un rôle clé dans la régulation de la réaction inflammatoire (Martorana *et al.*, 2017). Les MAI également appelées maladies auto-inflammatoires systémiques (SAIDs) résultent d'une activation exagérée du système immunitaire inné (Krainer *et al.*, 2020).

La FMF est la première FRH qui a été décrite et en même temps la plus répandue parmi les populations originaires du bassin Méditerranéen, comme les Arabes du Moyen-Orient, les Juifs, les Turcs, les Arméniens et les Nord-Africains (Maghrébins et Egyptiens)( El-Shanti *et al.*, 2006; Papadopoulos *et al.*, 2008 ; Ben-Chetrit et Touitou, 2009). Elle est rencontrée avec une prévalence élevée en Turquie (1/150 et 1/10 000), en Arménie (1/500) et chez les juifs (1/1000)(Sarı *et al.*, 2014). Cependant, la FMF est de plus en plus décrite à travers le monde, dans des pays n'appartenant pas au bassin Méditerranéen, comme l'Iran, le Japon, l'Allemagne (Ben-Chetrit et Touitou, 2009).

### 1) Aspects cliniques de la FMF

Les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement très tôt : avant 5 ans dans 75 % et avant 20 ans dans 90 % des cas (Ben-Chetrit et Levy, 1998). Ils se traduisent par des accès fébriles répétés de courte durée, à rémission spontanée, récurrentes à des intervalles variables. Les crises durent en général de 12 heures à 48 heures, mais ne dépassent pas 5 jours (Sohar *et al.*, 1967; Livneh *et al.*, 1997).

### **1.1) Symptomatologie**

La FMF évolue par des épisodes récurrents de fièvre qui peuvent être accompagnés de sérites péritonite stérile, synovite, pleurésie (Livneh *et al.*, 1997; Ben-Chetrit et Levy, 1998). La fièvre élevée et les douleurs invalidantes laissent le patient alité pendant les attaques (Onen, 2006). Outre la fièvre, les douleurs abdominales sont très fréquentes au cours de la FMF (90-93% des patients) (Padeh et Berkun, 2016). Elles peuvent être diffuses ou localisées, et varient d'une douleur légère à une douleur grave plus caractéristique avec des signes de péritonite.

L'atteinte articulaire est la deuxième manifestation la plus fréquente (25–30%). Dans la plupart des cas, elle est aiguë et touche l'une des grandes articulations des membres inférieurs et peut durer plus longtemps que les autres symptômes de la FMF. L'atteinte thoracique est souvent unilatérale. Elle est observée chez 15- 54% des patients (Padeh and Berkun, 2016).

D'autres manifestations sont moins fréquentes, comme l'atteinte cutanée de type érysipèle like-Erythema au niveau des membres inférieurs, la péricardite ou encore les maux de tête (Berkun and Eisenstein, 2014).

### **1.2) Complication rénale**

A long terme, les patients peuvent développer une amylose rénale de type AA qui est la complication la plus grave de la FMF. Il s'agit d'une amylose réactive, secondaire à un état inflammatoire chronique. L'amylose rénale est la principale cause de décès au cours de la FMF, même après introduction de la thérapie à la colchicine (Akar *et al.*, 2012; Twig *et al.*, 2014). La survie médiane, telle qu'elle ressort de plusieurs études, varie entre 24 et 53 mois à partir du diagnostic (van der Hilst *et al.*, 2005).

Les symptômes cliniques de l'amylose réactive sont généralement non spécifiques et dépendent de l'organe concerné. Plusieurs organes peuvent être affectés par l'amylose AA, mais ce sont les reins qui sont le plus souvent touchés, ce qui fait que les dépôts amyloïdes sont la principale cause de l'insuffisance rénale chez les patients atteints de FMF (Berkun et Eisenstein, 2014).

Le développement de l'amylose rénale AA passe par différentes phases (Stojanovic *et al.*, 2017):

- Phase préclinique : pendant laquelle les dépôts amyloïdes se forment, sans répercussion clinique.

- Néphropathie : la phase préclinique est suivie d'une phase clinique dont le signe révélateur est essentiellement la protéinurie, qui reflète l'atteinte rénale, essentiellement glomérulaire. Elle se traduit par la présence excessive de protéines dans l'urine.
- La néphropathie amyloïde évolue naturellement vers le syndrome néphrotique et l'insuffisance rénale chronique, dans un délai de 2 à 10 ans.

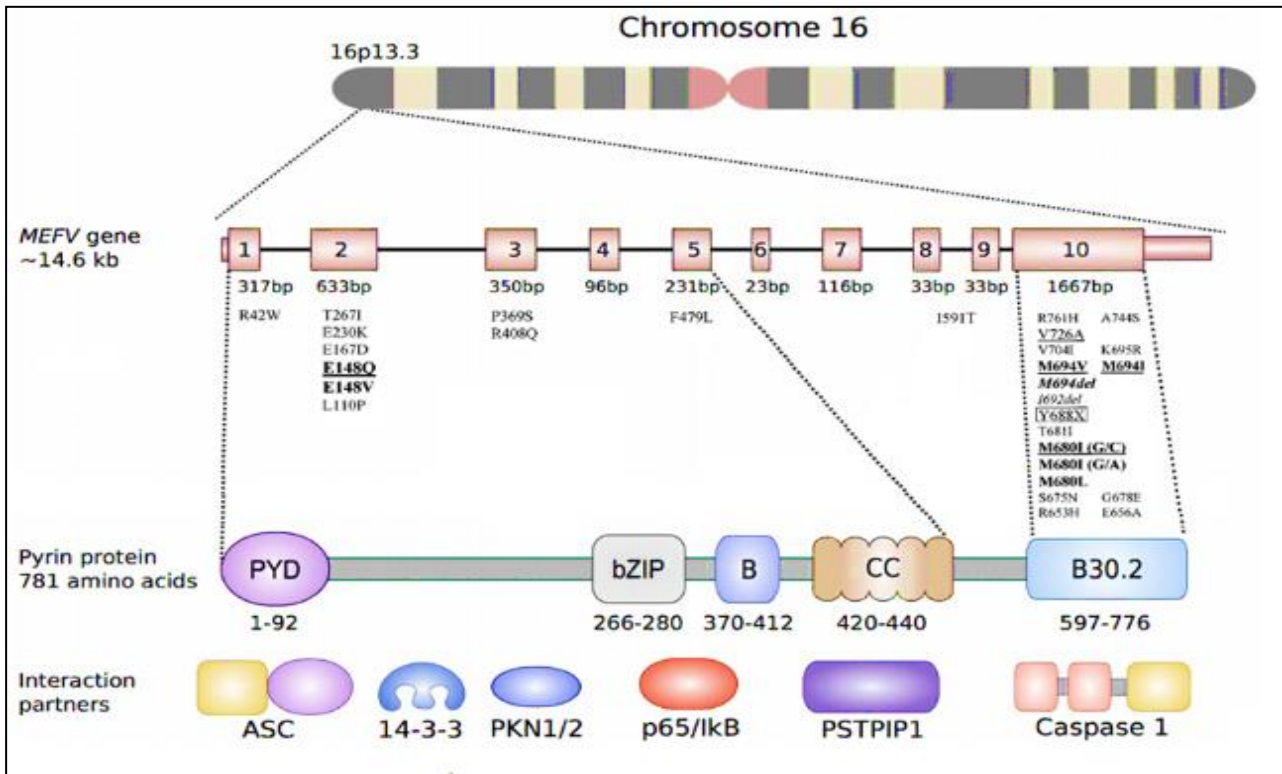
## 2) Génétique de la FMF

### 2.1) Le gène *MEFV* (*MEditerranean FeVer*)

Le gène responsable de la FMF est le *MEFV* (*MEditerranean FeVer*) et a été identifié par clonage positionnel en 1997. Localisé sur le bras court du chromosome 16 humain (16p13.3), il code une protéine de 781 acides aminés nommée pyrine/marenostrine. Il s'agit d'un gène de 14 kb composé de 10 exons dont le transcrit mature est un ARNm de 3.7kb. La séquence codante est d'environ 3500 pb (International FMF consortium, 1997 ; The French FMF Consortium, 1997) (Figure 1).

Le gène *MEFV* s'exprime principalement dans les cellules de la lignée myéloïde. Le transcrit du gène a été initialement retrouvé par northern blot uniquement dans les leucocytes du sang périphérique ainsi que les adénocarcinomes colorectaux (International FMF consortium, 1997). Dans le sang périphérique, l'expression de *MEFV* a été mise en évidence dans les neutrophiles et les éosinophiles, mais à un niveau moindre dans les monocytes mais pas dans les lymphocytes (Centola *et al.*, 2000). En dehors du tissu sanguin, l'expression du *MEFV* a également été rapportée au niveau articulaire dans les synoviocytes et les dendrocytes mais pas dans les chondrocytes (Diaz *et al.*, 2004).

Le produit du gène dénommée marénostrine par le Consortium français et pyrine par le Consortium international ; est constituée de cinq domaines : un domaine pyrine (PYD) (entre les résidus 1–92), un domaine bZIP (266–280), un domaine en doigt de zinc (bBox) (370–412), un domaine coiled-coil (McDermott *et al.*) (420–440), et un domaine B30.2/SPRY (597-776) (Schnappauf *et al.*, 2019)(Figure 1).



**Figure 1 :**Structure schématisée du gène *MEFV*, de la pyrine et ses partenaires d'interaction (Schnappauf *et al.*, 2019).

## 2.2) Variants nucléotidiques associés au *MEFV*

Actuellement, 378 variants ont été identifiés dans toutes les parties du gène *MEFV*, selon la base des données INFEVERS (<https://infervers.umai-montpellier.fr/web/>). Ces variants ont été répartis en différentes classes selon leur signification clinique (Van Gijn *et al.*, 2018):

- Les variants pathogènes : p.M680I (c.2040G>A, c.2040G>C), p.M694V (c.2080A>G), p.M694I (c.2082G>A) et p.V726A (c.2177T>C) localisés dans l'exon 10.
- Les variants probablement pathogènes (Likely pathogenic).
- Les variants de signification incertaine (VUS, Uncertain significance).
- Les variants probablement bénins (Likely benign).
- Les variants bénins.
- Les variants non classés.

Cinq mutations fondatrices, p.V726A, p.M694V, p.M694I, p.M680I (exon 10) et p.E148Q (exon2), représentent 74% des allèles FMF chez les groupes ethniques à risque (Arméniens, Arabes, Juifs et Turque)(Touitou, 2001).

Des études de corrélation phénotype-génotype ont permis de lier les génotypes à deux mutations situées dans les "points chauds" mutationnels (codons 680 ou 694)du gène à des

phénotypes sévères. Les phénotypes modérés ont été associés à d'autres variants comme p.E148Q (Touitou, 2001).

### **3) Mécanisme pathogénique de la FMF**

En se basant sur les mécanismes moléculaires, la FMF peut être définie comme étant une MAI monogénique appartenant au groupe des inflammasomopathies. Ces anomalies sont liées à une élévation de l'IL-1 $\beta$  due à une activation non contrôlée de l'inflammasome (Krainer *et al.*, 2020). La FMF peut être également classée dans le groupe des MAI associées à la pyrine ou pyrinopathies au cours desquelles les mutations qui touchent la pyrine provoquent une auto-inflammation médiée par l'IL-1 $\beta$  (Harapas *et al.*, 2018; Jamilloux *et al.*, 2018a). L'IL-1 $\beta$  est une cytokine majeure de l'immunité innée et de l'inflammation dont la production est étroitement régulée par la pyrine.

#### **3.1) Sécrétion de l'IL-1 $\beta$ : voie de l'inflammasome-pyrine**

Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques cytosoliques qui recrutent et activent la caspase - 1, qui à leur tour favorisent la sécrétion des cytokines pro- inflammatoires interleukine IL-1 $\beta$  et IL-18 et induisent un mode de mort cellulaire programmée (apoptose) qui limite la réplication des pathogènes (Van Gorp *et al.*, 2014). Ils sont classés en fonction du récepteur intracellulaire qui induit leur activation et la sécrétion subséquente de l'IL-1 $\beta$ . Récemment, la pyrine a été classée comme un récepteur intracellulaire capable de détecter l'inhibition de l'activité GTPase d'une petite protéine G, RhoA, par certains pathogènes et de former son propre inflammasome, désigné inflammasome-pyrine (Jamilloux *et al.*, 2018a; Jamilloux *et al.*, 2018b) (Figure 2).

L'IL-1  $\beta$  est synthétisée sous forme d'un précurseur pro-IL-1  $\beta$  de 269 acides aminés (31 KDa) par un grand nombre de cellules dont les cellules de l'immunité innée. Cependant, la pro-IL-1 $\beta$  ne peut pas se lier au récepteur de l'IL-1 avant de subir une conversion vers sa forme mature de 17 KDa. La maturation de la pro-IL-1 $\beta$  peut se faire selon deux voies différentes, l'une dépendante de la caspase-1 et l'autre indépendante de la caspase-1 (Afonina *et al.*, 2015).

La pyrine est activée en réponse aux nombreuses toxines comme TcdA et TcdB produites par *Clostridium difficile*, VopS produite par *Vibrio parahaemolyticus*, TecA produite par *Bacillus cenocepacia*, la toxine C3 de *Clostridium botulinum*, YopE et YopT des espèces de *Yersinia*. Ces toxines modifient RhoA par glycosylation, adénylation et ADP ribosylation. Bien qu'une interaction directe entre Rho et la pyrine n'a pas été détectée, les modifications de Rho

semblent très déterminantes dans l'activation de l'inflammasome-pyrine. Les travaux de Park et al., (2016) ont pu montrer que RhoA active les protéines sérine-thréonine kinases, PKN1 et PKN2, qui se lient et phosphorylent la pyrine sur les résidus Ser208 et Ser242. La pyrine phosphorylée se lie alors aux protéines régulatrices 14-3-3, ce qui bloque l'assemblage de l'inflammasome-pyrine(Figure 2).

A l'état inactif, la pyrine est auto-inhibée par 14-3-3 qui se lie à la pyrine phosphorylée. La phosphorylation est maintenue par les kinases PKN1/2 qui sont activées par RhoA GTPase. Suite à l'inactivation de RhoA par les toxines bactériennes, l'activité de PKN1/2 est diminuée. Par conséquent, la phosphorylation de la pyrine est réduite aboutissant à la dissociation de 14-3-3 et l'auto-inhibition de la pyrine est levée, ce qui va permettre alors l'assemblage de l'inflammasome-pyrine (Heilig and Broz, 2018; Jamilloux *et al.*, 2018b; Schnappauf *et al.*, 2019). L'assemblage des composants de l'inflammasome-pyrine dépend des interactions homotypiques PYD-PYD ou CARD-CARD entre la pyrine, la procaspase-1 et la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD).

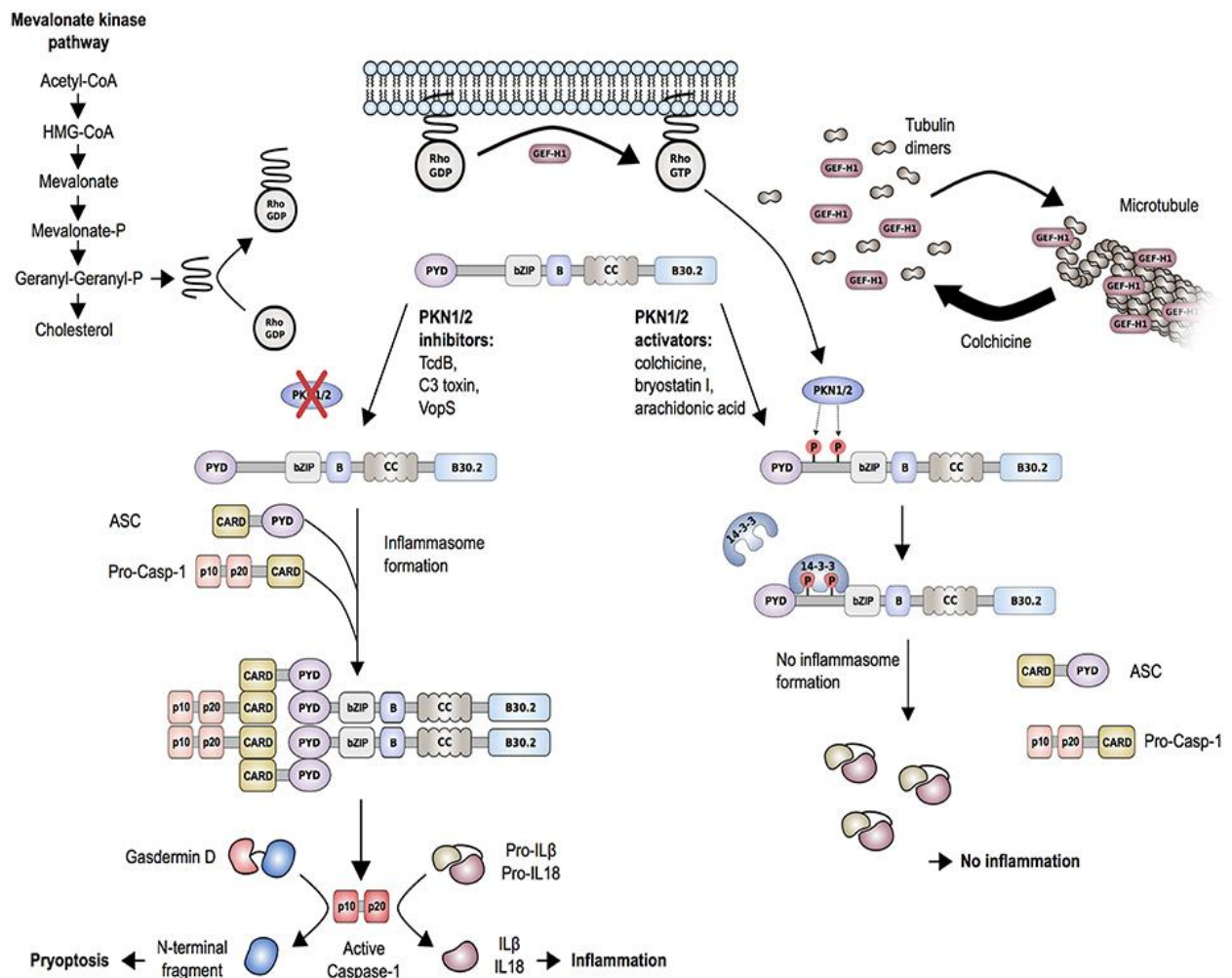
Après activation de la pyrine, ces domaines recrutent la protéine adaptatrice ASC et la procaspase-1(Dick *et al.*, 2016). La juxtaposition de deux pro-caspases-1 conduit à l'activation de ces dernières par auto-protéolyse et à la formation du tétramère actif caspase-1 p10/p20, qui transforme la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 en leurs formes matures (Schnappauf *et al.*, 2019).

Les caspases sont des endoprotéases qui existent dans le cytoplasme sous une forme inactive (zymogène). La maturation de la pro-caspase1 (45 KDa) nécessite deux clivages pour devenir active. Le premier clivage aboutit à la libération de la petite sous-unité (p10) et le deuxième clivage conduit à la libération de la grande sous-unité (p20). Ainsi, l'enzyme active est un tétramère composé de l'association des deux sous-unités p20 et de deux sous-unités p10.

### **3.2) Effet des mutations de la pyrine sur la sécrétion de l'IL-1 $\beta$**

La majorité des mutations *MEFV* sont localisées dans l'exon 10, notamment le variant p.M694V qui est associée à un phénotype sévère (Grossman *et al.*, 2019). Ces mutations entraînent une libération exagérée de l'IL1 $\beta$  conduisant à un état inflammatoire systémique. D'après les travaux de Park et al(2016), il a été suggéré que les mutations du domaine B30.2 de la pyrine sont susceptibles de contrôler la phosphorylation de la pyrine en inhibant la liaison des kinases (PKN1/2) à la pyrine. De plus, il a été montré que les mutations *MEFV* rendent l'activation de la pyrine indépendante des microtubules. Ces mutations peuvent forcer la pyrine déphosphorylée dans une conformation ouverte qui se lie facilement à l'adaptateur

d'inflammasome ASC, remplaçant efficacement les signaux relayés par les microtubules (Van Gorp *et al.*, 2016).



**Figure 2:**Modèle hypothétique illustrant l'activation de l'inflammasome dépendant de la pyrine (Schnappauf *et al.*, 2019).

### 3.3) Effets biologiques de l'IL1β

L'IL-1β est la principale cytokine pro-inflammatoire qui possède plusieurs actions sur de nombreux organes cibles tels que :

- Le système nerveux central pour induire la fièvre,
- Le foie pour stimuler la synthèse des protéines de la réaction inflammatoire ou les protéines de la phase aiguë comme la Serum Amyloid A, la protéine C-réactive (CRP)(Cecilian *et al.*, 2002), le fibrinogène et autres (Jensen et Whitehead, 1998),
- La moelle osseuse où elle induit la thrombopoïèse et la granulopoïèse,

- Les synoviocytes et les chondrocytes où elle induit respectivement la production de collagénases et de métalloprotéases,
- Les cellules endothéliales où elle induit la production de chémokines et de protéines d'adhésion (Jamilloux *et al.*, 2018a).

De plus, l'IL1 $\beta$  active l'expression d'un large panel de gènes codant des protéines clés de la réponse inflammatoire, en particulier les cytokines (TNF- $\alpha$  et IL-6)(Jéru and Amselem, 2011).

#### 4) Traitement de la FMF

La colchicine est un médicament anti-inflammatoire couramment utilisé qui prévient la mitose par l'inhibition de la polymérisation des microtubules et qui interfère également avec plusieurs étapes du processus inflammatoire (Vaidya *et al.*, 2018; Vaidya *et al.*, 2019). Son mécanisme d'action est de plus en plus élucidé.

La colchicine possède une action activatrice sur la petite protéine G, RhoA. Au sein du cytosol, la colchicine se lie à la tubuline et dépolymérise les microtubules, ce qui entraîne la libération d'un facteur d'échange GTP/GDP ou le GEF-H1 (Guanosine exchange factor) qui active RhoA. L'étude menée par Park *et al.* (2016) a démontré que la colchicine pouvait inverser l'inhibition de RhoA exercée par la toxine C3 de *Clostridium botulinum*, mais également, supprime l'activation spontanée de l'inflammasome-pyrine chez les souris FMF-knock-in et dans les cellules de patients FMF.

De plus, l'effet anti-inflammatoire de la colchicine peut résulter également de sa capacité à réduire les taux des cytokines pro-inflammatoires. Cette action est due à l'effet inhibiteur de la colchicine exercé sur le facteur de transcription, le NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B). Dans le cytosol, le NF- $\kappa$ B est maintenu inactif par la protéine inhibitrice appelée I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor- $\kappa$ B).

Des travaux ont démontré que la pyrine constitue également le substrat de la caspase-1 qui clive la pyrine au niveau du résidu Asp330, localisé entre le domaine basique bZIP et le domaine B-box. De plus, la pyrine mutée est plus sensible à l'action de l'endoprotéase. Le fragment N-terminal de 330 acides aminés généré interagit avec I $\kappa$ B $\alpha$  et induit la dégradation de la protéine inhibitrice par la calpaïne, une protéase à cystéine, ce qui permet la libération du NF- $\kappa$ B et sa translocation vers le noyau. La colchicine agit en atténuant la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  par la calpaïne (Chae *et al.*, 2008).

Cependant, le traitement à la colchicine n'est pas efficace sur tous les patients FMF dont certains présentent une résistance.

## **II) Amylose rénale AA secondaire à la FME**

### **1) Amylose AA : définition**

Les amyloses appartiennent au groupe des pathologies conformationnelles qui résultent d'un repliement défectueux des protéines extracellulaires (Merlin et Bellotti, 2003).

Le terme amylose a été créé par l'anatomopathologiste Allemand Rudolf Virchow (1845) pour désigner une substance, présente dans les tissus animaux, qui se colore de la même manière que la cellulose avec l'iode (Cuchard *et al.*, 2012). Les amyloses constituent un groupe hétérogène de maladies liées au dépôt extracellulaire de protéines fibrillaires insolubles dans les tissus. Les dépôts ou les agrégats fibrillaires détruisent l'architecture normale d'un tissu et interfèrent avec la fonction normale des tissus ou des organes (Düzgün, 2011).

Les amyloses peuvent être localisées (touchant un seul tissu ou organe) ou systémiques (touchant plusieurs tissus et organes).

Les formes systémiques englobent principalement (Düzgün, 2011 ; Cuchard *et al.*, 2012) :

- Les amyloses AL (chaines légères des immunoglobulines).
- Les amyloses secondaires ou réactives : amylose AA.
- Les formes héréditaires : amylose TTR (Transthyrétine)
- L'amylose liée à la dialyse (amylose bêta-2-microglobuline).

Les amyloses AA, AL et ATTR représentent plus de 90% des amyloses systémiques. L'amylose AA étant la plus fréquente après l'amylose AL (Düzgün, 2011).

### **2) Prévalence de l'amylose AA**

#### **2.1) Prévalence de l'amylose AA selon les ethnies**

Son incidence varie selon les groupes ethniques, il a été démontré que les patients juifs d'origine nord-africaine (séfarades) présentent un risque beaucoup plus élevé de développer une amylose que ceux originaires d'Irak ou d'Europe de l'Est (ashkénazes). L'incidence de l'amylose dans les différents groupes ethniques est présentée dans le tableau I (van der Hilst *et al.*, 2005).

**Tableau I :** Prévalence de l'amylose AA chez les patients atteints de FMF dans différents groupes ethniques(van der Hilst *et al.*, 2005)

Origine ethnique	Nombre de patients	Amylose, %	Année de publication
<b>Juifs sépharades</b>	470	26.5	1967
	95	12	1970
	516	34.3	1982
	121	8.2	2000
<b>Juifs non sépharades</b>	44	2.3	1982
	51	3.9	2000
<b>Turcs</b>	25	61.9	1969
	605	29.7	1997
	253	19.8	2004
	2436	12.9	2005
	401	5.5	1974
<b>Arméniens</b>	150	33.3	2000
<b>Arabes</b>	175	1.7	1986

## **2.2) Prévalence de l'amylose AA en fonction des maladies auto-inflammatoires**

L'amylose AA était autrefois la conséquence relativement fréquente d'une inflammation chronique d'origine infectieuse (tuberculose, suppurations bronchiques...). Plus rare actuellement, elle s'observe surtout suite à des maladies auto-inflammatoires comme la FMF et la polyarthrite rhumatoïde. L'atteinte rénale est au premier plan, se manifestant par un syndrome néphrotique qui peut conduire à l'insuffisance rénale (Lachmann *et al.*, 2007)(Tableau II).

**Tableau II :** Prévalence de l'amylose AA dans des maladies auto-inflammatoires spécifiques en l'absence de traitement (Obici et Merlini, 2012).

Maladies	Prévalence d'amylose AA
<b>FMF</b>	~50% (pré-colchicine)
<b>TRAPS</b>	10–20%
<b>HIDS</b>	<10%
<b>FCAS</b>	<10%
<b>MWS</b>	~25%
<b>PFAPA</b>	Aucune

L'amylose est la complication majeure de la fièvre méditerranéenne familiale, c'est elle qui en fait toute la gravité. Quand elle se manifeste, elle atteint essentiellement les sujets avant l'âge de 40 ans, évoluant en absence de traitement par la colchicine vers un syndrome néphrotique, puis une insuffisance rénale terminale 2 à 13 ans après l'apparition de la protéinurie (Lamoril *et al.*, 2001).

### 3) Facteurs génétiques liés au développement d'amylose AA

#### 3.1) Mutations dans le gène MEFV

La mutation p.M694V est couramment détectée chez les Turcs, les Arabes, les Arméniens et les Juifs. Ce variant pathogène a été lié au phénotype sévère de la FMF, en particulier au développement de l'amylose rénale de type AA (Touitou, 2001; Akpolat *et al.*, 2012). Des études ont rapporté chez les patients homozygotes et hétérozygotes composites pour p.M694V un début précoce des crises (moins de 8 ans) (Ozturk *et al.*, 2012 ; Ozdel *et al.*, 2016), une forte récurrence des crises, une atteinte articulaire et rénale importante (Yigit *et al.*, 2008 ; Atoyan *et al.*, 2016), ainsi qu'une dose plus élevée de colchicine pour le contrôle des crises (Soylemezoglu *et al.*, 2010 ; Lidar *et al.*, 2012).

En outre, malgré le fait qu'elle ait été observée que chez les patients atteints d'amylose, les études n'ont pas établi de lien entre le génotype M694V/M694V et la complication rénale en Algérie (Mukhinet *et al.*, 2015 ; Ait-Idiret *et al.*, 2017). Cependant, le génotype M694I/M694I, identifié chez 52 % des patients, a été associé de manière significative au développement d'amylose rénale chez les Algériens (Ait-Idiret *et al.*, 2017) (Tableau III ).

**Tableau III** : Association entre les génotypes du *MEFV* et l'amylose AA chez les différents groupes ethniques (Mimouni *et al.*, 2000).

	Mutation Group			
	M694V/M694V	M694V/Other*	Other*/Other*	E148Q/Other*
North African Jews ( <i>n</i> = 121)	9/96	1/20	0/0	0/5
Other Jews ( <i>n</i> = 51)	2/10	0/21	0/11	0/9
Turks ( <i>n</i> = 49)	9/21	2/24	0/3	0/1
Armenians in United States ( <i>n</i> = 29)	3/7	0/14	0/8	0/0
Armenians in Yerevan ( <i>n</i> = 121)	21/37	19/64	7/19	0/1
Total ( <i>n</i> = 371)	44/171	22/143	7/41	0/16

## **3.2) Polymorphismes dans les gènes SAA**

### **3.2.1) Famille des gènes SAA**

SAA est le nom générique d'une famille de protéines qui partagent des niveaux élevés d'homologie de séquence mais sont codées par des gènes différents (Sun and Ye, 2016). Chez l'homme, il y a 4 gènes *SAA* (*SAA1*, *SAA2*, *SAA3* et *SAA4*) qui forment un cluster dans une région de 150 kb du chromosome 11p15.1 (Sellar *et al.*, 1994).

Les gènes *A-SAA* qui incluent les gènes inductibles *SAA1* et *SAA2* sont espacés d'un intervalle d'environ 17 kb. Le gène *SAA3* est localisé 110 kb en aval du gène *SAA4* et 90 kb en amont de *SAA2* (Figure 3, A) :

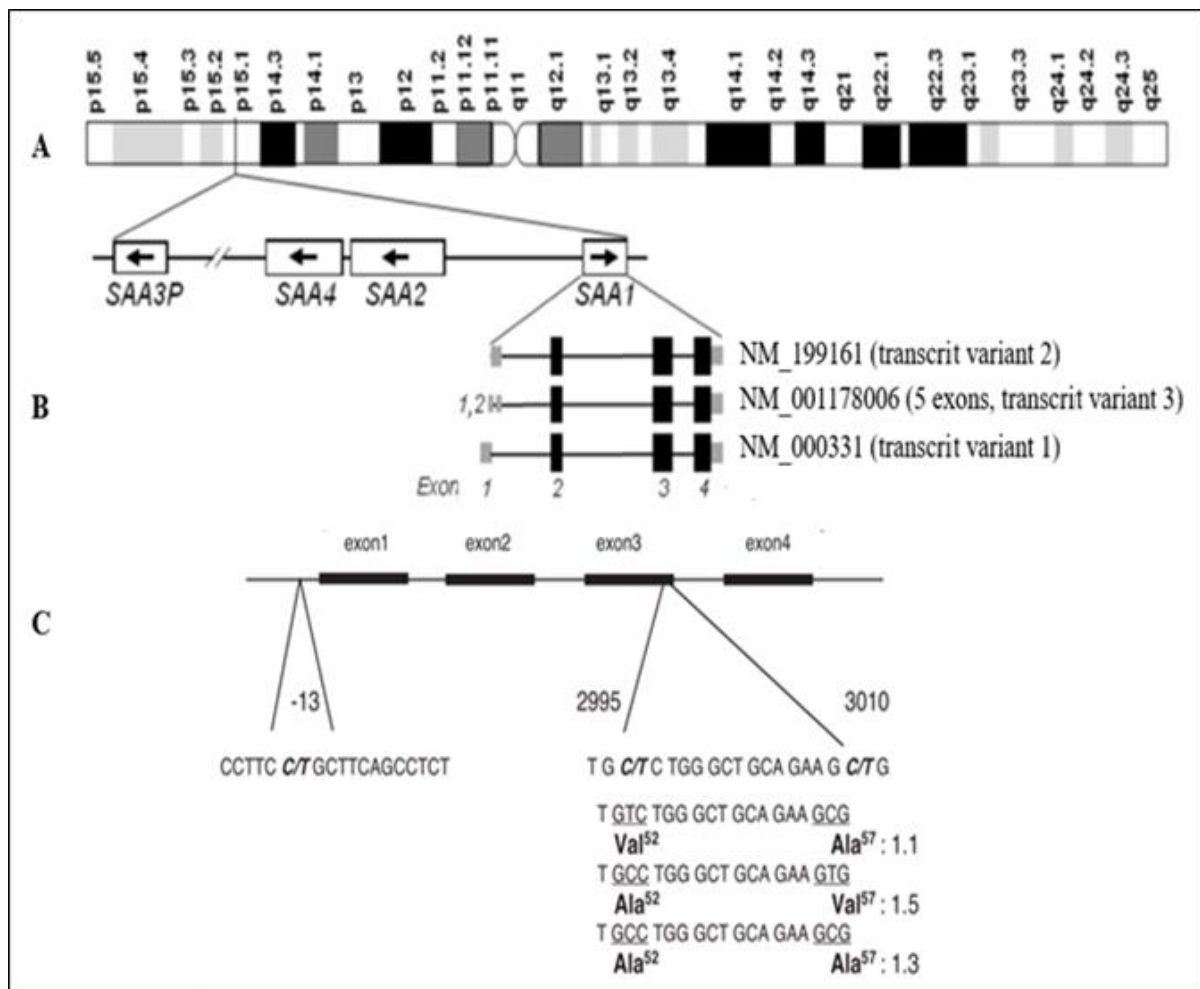
- Les gènes *SAA1* et *SAA2* codent pour les protéines SAA1 et SAA2 de la phase aiguë (A-SAA) (Gabay et Kushner, 1999; Uhlar et Whitehead, 1999). La SAA1 est l'isoforme retrouvée dans les dépôts amyloïdes.
- Le gène *SAA4* code pour la SAA4 exprimée de manière constitutive (C-SAA).
- Le gène *SAA3*, situé à 110 Kb en aval du gène *SAA4*, a été considéré comme un pseudogène par Kluge-Beckerman et coll (Kluge-Beckerman *et al.*, 1991). Par la suite, Larson *et al.*, 2003 ont rapporté une transcription locale du gène *SAA3* dans les cellules épithéliales des glandes mammaires.

Les séquences des *A-SAA* d'espèces de vertébrés partageant un ancêtre commun il y a des centaines de millions d'années sont remarquablement conservés (Jensen *et al.*, 1997). Les similitudes de séquence entre les gènes *A-SAA* au sein d'une même espèce sont importantes et s'étendent au-delà des régions codantes jusqu'aux régions non traduites de l'ARNm (UTRs), aux introns et aux éléments promoteurs en amont (Uhlar *et al.*, 1994).

### **3.2.2) Le gène SAA1 : structure et régulation**

#### ***a) Structure***

Les gènes *SAA1* et *SAA2* possèdent quatre exons et trois introns, mais ont des longueurs différentes, 3,7kb et 10,4kb, respectivement. Le gène *SAA1* humain s'étend sur une région de 3,8Kb. Les séquences codantes résident dans l'exon 2, l'exon 3 et une partie de l'exon 4, d'après les séquences publiées (NM\_199161, NM\_000331) (GenBank) (Figure 3, B). L'exon 1 et une partie de l'exon 4 contiennent des séquences non codantes, y compris le promoteur du gène. (Sun et Ye, 2016).



**Figure 3** : Organisation du groupe de gènes SAA humains sur le chromosome 11 (A), Organisation des exons dans le gène SAA1 d'après la base des données GenBank (B) et les polymorphismes dans l'exon 3 du gène SAA1 (C) (Sun et Ye, 2

### ***b) Régulation du gène SAA1***

L'analyse des promoteurs des gènes *A-SAA* chez plusieurs espèces de mammifères a permis d'identifier de nombreux facteurs de transcription impliqués différemment dans la réponse aux cytokines et du type cellulaire. Il s'agit du NF- $\kappa$ B, NF-IL6 (Nuclear Factor for Interleukin-6), connu également sous le nom de C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer Binding Proteins), YY1 (Yin and Yang 1), AP-2 (Activating protein 2), SAF (SAS-binding factor) et Sp1 (Specificity protein 1) (Uhlar et Whitehead, 1999; Thorn et Whitehead, 2002).

La partie proximale de 450pb de la région du promoteur du gène *SAA1* contient des séquences de fixation des facteurs de transcription à localisation cytoplasmique :

- Le NF- $\kappa$ B qui reconnaît la séquence : GGGACTTTCC.
- Le NF-IL6 qui reconnaît la séquence : AGGTTACACAACCTG.

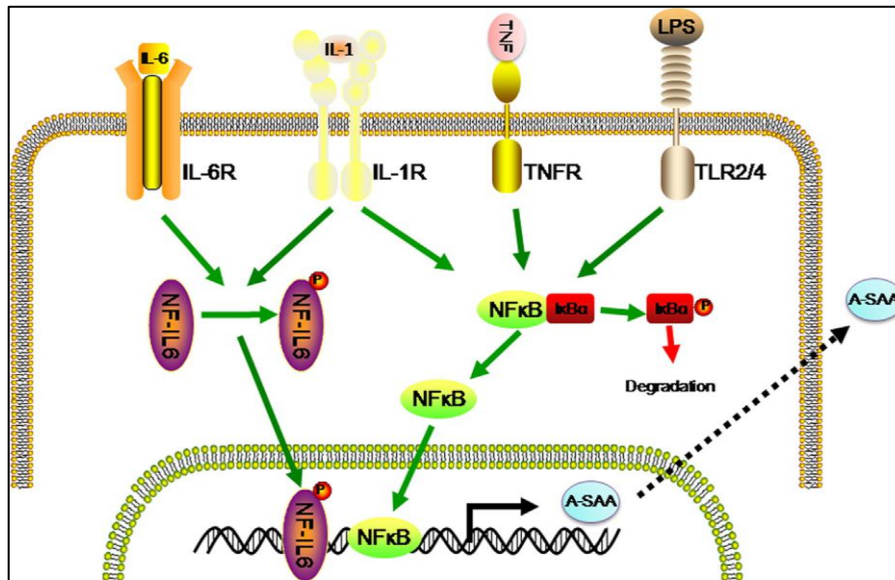
Ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans la synthèse hépatique des isoformes SAA1 et SAA2. La synthèse extra-hépatique des SAA1/2 fait impliquer un autre facteur de transcription, le SAF. La région promotrice contient une séquence appelée SAS (SAA-activating sequence) située entre les nucléotides -280 et -226 pour l'induction du gène *SAA1* par SAF, en réponse au LPS (lipopolysaccharide) dans les monocytes/macrophages (Ray et Ray, 1997 ; Uhlar et Whitehead, 1999).

La synthèse de la SAA1/2 a lieu principalement dans le foie en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, synthétisées principalement par les macrophages et autres leucocytes. La forme inductible de la SAA, A-SAA, fait partie des protéines de la phase aiguë de type I, c'est-à-dire induites par l'IL1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$ . De plus, chacune de ces cytokines peut agir en synergie avec IL-6 pour augmenter l'expression de SAA (Jensen et Whitehead, 1998). La liaison de ces cytokines à leurs récepteurs respectifs induit la transduction d'un signal aboutissant à l'induction de l'activité transcriptionnelle du gène *SAA1*.

Chez l'homme, la transcription des gènes A-SAA est sous la dépendance de quatre facteurs de transcription : NF- $\kappa$ B, NF-IL6 (C/EBP $\beta$ ), NF-IL6 $\beta$  (C/EBP $\delta$ ) et SAF (DeBuck *et al.*, 2015 ; Uhlar et Whitehead, 1999).

La transduction du signal par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  aboutit à l'activation du NF- $\kappa$ B. La voie de signalisation déclenchée par l'IL-1 $\beta$  aboutit également à l'activation du facteur de transcription NF-IL6 activé en plus par l'IL-6.

A son tour, le NF-IL6 activé sous forme phosphorylée va induire l'expression du gène d'un autre facteur de transcription, le NF-IL6 $\beta$  impliqué dans la synthèse des formes inductibles SAA1/2 (Uhlar et Whithead, 1999 ; DeBuck *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2019).



**Figure 4 :** Schéma des voies de transduction du signal impliquées dans l'induction des transcriptions du gène A-SAA lors de la réaction en phase aiguë (RPA) (Zhang *et al.*, 2019).

### 3.2.3) Polymorphismes du gène *SAA1* liés à l'amylose rénale AA

#### a) *Polymorphismes dans l'exon 3 du gène *SAA1**

Deux polymorphismes de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont été identifiés dans l'exon 3 du gène *SAA1*. Il s'agit de C3010T et C2995T qui déterminent 3 haplotypes : *SAA1* $\alpha$  ou *SAA1.1* (2995T-3010C ; Val52/Ala57), *SAA1* $\beta$  ou *SAA1.5* (2995C- 3010T ; Ala52/Val57) et *SAA1* $\gamma$  ou *SAA1.3* (2995C-3010C ; Ala52/Ala57) (Baba *et al.*, 1995 ; Nakamura *et al.*, 2000 ; Yamada *et al.*, 2004) (Figure 3C).

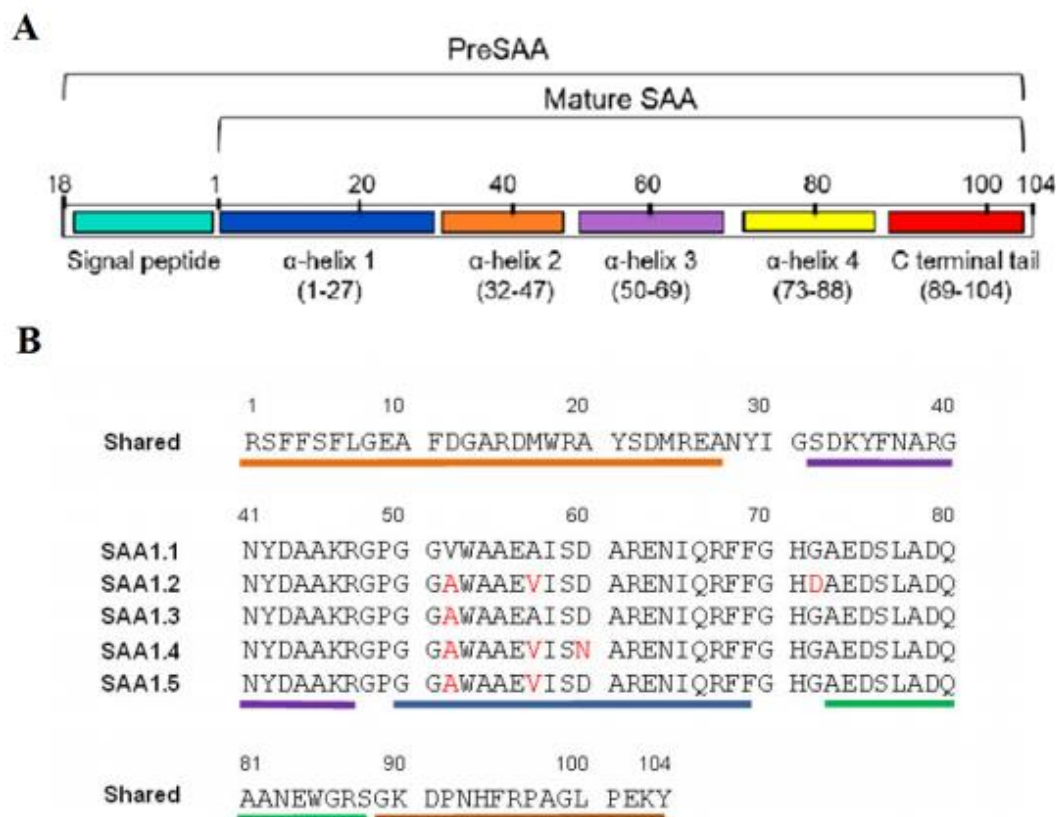
De plus en plus de preuves suggèrent que certains génotypes du locus *SAA1* sont associés à une susceptibilité accrue au développement d'amylose AA secondaire à la FMF (Akaret *et al.*, 2003 ; Medlej-Hashimet *et al.*, 2004). L'allèle *SAA1.1* à l'état homozygote a été particulièrement lié au développement de l'amylose rénale (Cazeneuve *et al.*, 2000), tandis qu'un effet protecteur des allèles *SAA1.5* sur le développement de l'amylose a été suggéré (Atoyan *et al.*, 2016).

### b) Polymorphismes dans la région régulatrice du gène *SAA1*

D'autres SNP ont été identifiés dans la région non codante du gène *SAA1* humain (Figure 3, C). Le polymorphisme à la position -13, -13 C/T, a été associé par étude fonctionnelle à une activité transcriptionnelle accrue du gène (Moriguchi *et al.*, 2005), en corrélation avec la susceptibilité à l'amylose de type AA dans la population japonaise atteinte de FMF et de polyarthrite rhumatoïde (Moriguchi *et al.*, 2005; Migita *et al.*, 2013).

### 4) Structure et isoformes de la protéine *SAA1*

La protéine SAA est synthétisée sous la forme d'une pré-SAA composé de 122 acides aminés, qui comprend un peptide signal de 18 acides aminés. Le peptide signal est clivé pendant la sécrétion, ce qui donne la forme mature de SAA1 avec 104 acides aminés. La structure monomérique du SAA1 humain est composée de quatre hélices  $\alpha$  antiparallèles ; hélices 1 (aa 1-27), 2 (aa 32- 47), 3 (aa50-69), 4 (aa 73-88) et une queue C-terminale (aa 89-104) (figure 5) (Vahdat, 2019).



**Figure 5** : Représentation schématique linéaire de la protéine SAA1 et les différentes isoformes SAA1 humains (Vahdat, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

Le gène *SAA1* humain existe sous cinq formes alléliques à l'origine de cinq isoformes de la SAA1 : SAA1.1 (SAA1 $\alpha$ ), SAA1.2 (SAA1 $\beta$ ), SAA1.3 (SAA1 $\gamma$ ), SAA1.4 (SAA1 $\delta$ ) et SAA1.5 (SAA1 $\beta$ ) (Uhlir et Whitehead, 1999).

Les isoformes de la SAA1 diffèrent par quelques acides aminés :

- La SAA1.1 contient une Valine (V) en position 52 et une alanine (A) en position 57.
- La SAA1.5 contient une alanine (A) en position 52 et une valine (V) en position 57.
- La SAA1.3 contient une alanine (A) au niveau des deux positions, 52 et 57.

Un autre variant SAA1 $\beta$  (SAA1.2) a été rapporté, où l'aspartate (D) remplace une glycine (G) en position 72. Le second variant SAA1 $\delta$  (SAA1.4) contient une asparagine (N) en position 60 à la place de l'aspartate (D). Ces deux derniers variants sont très peu fréquents (Sun *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

Ainsi, les deux SNP dans l'exon 3 du gène SAA1 sont à l'origine d'au moins 3 isoformes de la SAA1 : SAA 1.1 (Val52–Ala57), SAA 1.3 (Ala52–Ala57) et SAA 1.5 (Ala52–Val57).

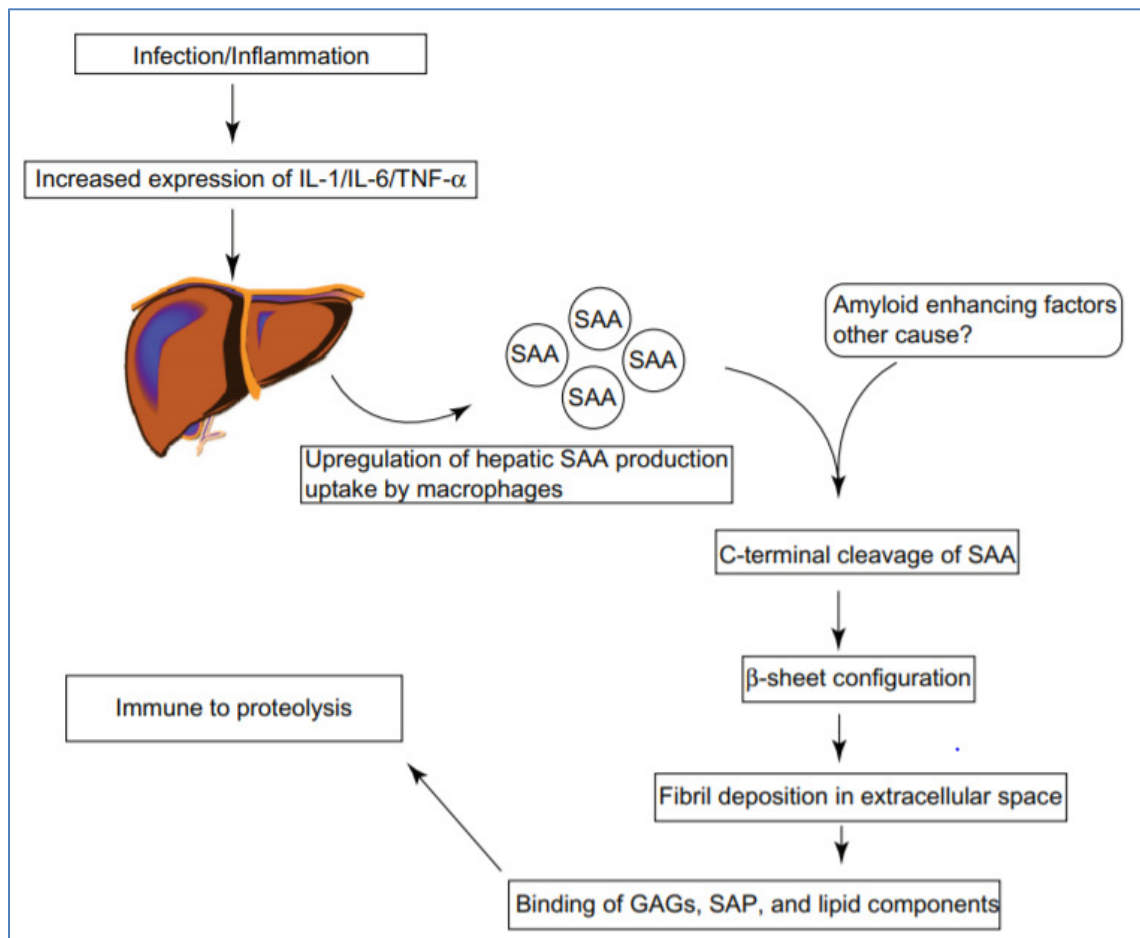
## **5) Physiopathologie de l'amylose AA**

Dans l'amylose AA (*Amyloid Associated*), la protéine amyloïde est la protéine AA issue de la SAA1 par clivage protéolytique. Comme la SAA est une protéine majeure de la réaction inflammatoire (protéine de la phase aigüe), il en résulte que presque toutes les maladies qui s'accompagnent d'une inflammation chronique, quelle qu'en soit la cause peuvent se compliquer d'amylose AA (Stankovich *et al.*, 2017).

Des taux élevés et persistants de SAA favorisent l'apparition de l'amylose AA, cependant, ils ne sont pas suffisants à eux seuls pour développer une amylose AA (Brunger *et al.*, 2020).

La SAA1 est une protéine de 104 acides aminés qui circule dans le sang sous la forme d'une apolipoprotéine pour son association aux lipoprotéines plasmatiques HDL (High Density Lipoprotein). Dans les conditions physiologiques, le catabolisme de la SAA1 dans les lysosomes de macrophages ne s'accompagne pas de la formation de fibrilles amyloïdes. Cependant, chez les patients atteints d'amylose, les produits intermédiaires de la SAA se combinent pour former des fibrilles qui acquièrent la conformation en feuillets  $\beta$  dans le milieu acide des lysosomes (Figure 6). Les dépôts amyloïdes ont pour constituant principal la protéine amyloïde AA de 76 acides aminés, issue du clivage en 76-77 (Sérine-Leucine) de la SAA. Les fibrilles constituent des agrégats insolubles de précurseurs protéiques ayant adopté une structure en feuillets plissés  $\beta$  antiparallèles. Dans l'espace extracellulaire, les fibrilles amyloïdes se lient aux protéoglycannes et aux protéines comme la serum-amyloid P (SAP),

leur conférant ainsi une résistance à la dégradation (van der Hilst, 2011; Rumjon *et al.*, 2012; Brunger *et al.*, 2020)



**Figure 6 :** Mécanisme de formation des dépôts amyloïdes conduisant à l'amylose de type AA (Rumjon *et al.*, 2012).

Les métalloprotéinases (MMP) sont des enzymes qui jouent un rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire et peuvent jouer un rôle important dans le mécanisme de développement de l'amylose AA. Des travaux ont montré que l'action de la MMP-1 était influencée par l'isoforme de la SAA1. Ainsi, la SAA1.1 est plus sensible à la protéolyse par MMP-1 que la SAA1.5. Cette différence est déterminée par la capacité de la MMP-1 à cliver au niveau des résidus 57 et 58 de la protéine, qui sont soit Val57- Ile58 (SAA1.5) soit Ala57- Ile58 (SAA1.1). La différence de capacité de la MMP-1 à dégrader les deux isoformes de SAA1 pourrait expliquer le risque différentiel de développer une amylose en particulier le risque présenté par SAA1.1 (Van der Hilst *et al.*, 2008 ; van der Hilst, 2011) (annexe 1).

## **Partie II**

# **Approche méthodologique appliquée à la thématique étudiée**

Depuis la découverte du gène *MEFV*, plusieurs techniques de biologie moléculaire ont été appliquées à des fins diagnostiques et pour l'identification de nouveaux variants, chez des patients cliniquement suspectés de FMF. Comme la FMF se complique d'une amylose rénale AA, la recherche des polymorphismes dans l'exon 3 du gène *SAA1* a lieu chez les patients ayant développé cette complication.

### 1) Recrutement des patients

L'exploration du gène *MEFV* est indiquée en présence d'un tableau clinique évocateur de la FMF. Ainsi, le recrutement des patients doit répondre à certains critères cliniques. Les critères de l'hôpital Tel-Hashomer ont été publiés à partir d'observations cliniques chez des patients adultes israéliens et sont les plus largement utilisés pour le diagnostic de la FMF (Sohar *et al.*, 1967 ; Pras, 1998). Le diagnostic de la FMF nécessite deux critères majeurs ou un et deux critères mineurs, selon le tableau IV.

**Tableau IV** : Critères diagnostiques de Tel-Hashomer (Pras, 1998).

Critères majeurs	Critères mineurs
1) Épisodes fébriles récurrents accompagnés de péritonite, synovite, pleurésie.	1) Épisodes fébriles récurrents.
2) Amylose de type AA sans maladie prédisposante.	2) Érythème de type érysipèle.
3) Réponse favorable au traitement régulier à la colchicine.	3) FMF diagnostiquée chez un parent au premier degré

Plus récemment, Yalcinkaya *et al.*, 2009 a établi de nouveaux critères diagnostiques pour les patients Turcs en âge pédiatriques. Le diagnostic nécessite la présence de 2 critères sur 5 (Tableau V).

**Tableau V** : Critères pédiatriques selon Yalcinkaya (Yalcinkaya *et al.*, 2009).

Critères	
<b>Fièvre</b>	>38°C, durée de 6 - 72 heures, le nombre d'épisodes fébriles $\geq 3$
<b>Douleurs abdominales</b>	Durée de 6 - 72 heures, le nombre d'attaques $\geq 3$
<b>Douleurs thoraciques</b>	Durée de 6 - 72 heures, le nombre d'attaques $\geq 3$
<b>Arthrites</b>	Durée de 6 - 72 heures, le nombre d'attaques $\geq 3$ , oligoarthritis
<b>Histoire familiale de FMF</b>	

D'autres informations sont également recueillies, comme l'âge d'apparition des crises de fièvre, la durée des crises, les intervalles entre les crises, les antécédents familiaux de FMF et le traitement à la colchicine.

Chez les patients présentant une complication rénale, la présence de l'amylose rénale AA est confirmée par biopsie rénale.

## **2) Analyse génétique**

L'application des différentes techniques de biologie moléculaire nécessite au préalable une extraction de l'ADN génomique, suivie dans la plupart des cas d'une réaction d'amplification par PCR.

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

L'ADN génomique des patients cliniquement suspectés de FMF est extrait à partir du sang total recueilli sur un anti-coagulant. Des méthodes manuelles ainsi que des kits disponibles dans le commerce sont utilisés pour l'extraction d'ADN génomique (Gupta, 2019).

#### **2.1.1) Technique au "salting-out"**

Dans ce cas, l'extraction d'ADN génomique est basée sur le protocole de Miller *et al.*, 1988, basé sur l'utilisation d'une solution à forte concentration saline (NaCl, 6M), d'où le nom de *salting-out* ou relargage par les sels. Le principe consiste à traiter uniquement le lysat cellulaire par une solution saline, dont l'objectif est d'éliminer par précipitation sélective les protéines.

Les leucocytes sont d'abord isolés à partir du sang total par utilisation de solutions hypotoniques qui permettent la lyse des globules rouges. Les solutions de lyse des globules rouges sont nombreuses et variées.

Les leucocytes ainsi isolés sont ensuite resuspendus dans le tampon de lyse des noyaux (Tris-HCl à 10mM, NaCl à 400mM, Na<sub>2</sub>EDTA à 2mM, pH 8,2). Au lysat cellulaire, sont ajoutées ensuite des solutions de SDS et de protéinase K, à des concentrations finales de 1% et de 100µg/ml, respectivement. La digestion s'effectue pendant une nuit à 37°C. La durée d'incubation et la température peuvent varier (2 h à 56 °C ou 30 min à 1 h à 65°C) (Bienvenu *et al.*, 1999).

Une fois la digestion terminée, le lysat cellulaire est traité par une solution saturée de NaCl (6M), puis vigoureusement agité et centrifugé à 2500 tours/minute pendant 15 minutes.

Le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un autre tube de 15 ml en polypropylène. La précipitation de l'ADN se fait par addition de 2 volumes d'éthanol absolu au surnageant. Il se forme alors un précipité d'ADN sous forme d'une pelote appelée méduse d'ADN. Celle-ci est ensuite mise en suspension dans une solution de Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5), jusqu'à parfaite dissolution.

### 2.1.2) Méthode au phénol-chloroforme

Dans cette méthode dite "de référence", le principe consiste à traiter le lysat cellulaire dans un premier temps avec un même volume de Phénol-Chloroforme (1:1). Le phénol est un puissant agent dénaturant des protéines et permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques qui ont la propriété d'être insolubles dans le phénol. La centrifugation du mélange conduit à la formation de 3 phases : une phase organique inférieure, une phase intermédiaire contenant les protéines dénaturées et une phase aqueuse supérieure qui contient les acides nucléiques. Après transfert dans un autre tube, la phase aqueuse est traitée par addition d'un mélange de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) - alcool isoamylique (24:1) qui a notamment pour objectif d'éliminer les traces éventuelles de phénol qui auraient pu être emportées avec la phase aqueuse et qui sont inhibitrices des réactions enzymatiques et en particulier de la *Taq* polymérase. Après centrifugation, le surnageant est transféré dans un autre tube à partir duquel l'ADN est précipité par addition de deux volumes d'alcool absolu. Le précipité d'ADN est ensuite resuspendu dans une solution de Tris-EDTA.

### 2.1.3) Dosage spectrophotométrique et pureté de l'ADN extrait

La détermination de la concentration de l'ADN total extrait se fait par la lecture de la densité optique à 260nm. Le pic d'absorption de l'ADN se situe à 260nm.

La concentration de l'ADN est calculée par application de la formule suivante :

$$[\text{ADN } \mu\text{g/ml}] = \text{DO}_{260} \times \text{Facteur de dilution} \times 50.$$

Une valeur de DO égale à 1, correspond à une concentration de 50 $\mu$ g/ml d'ADN pour une solution d'ADN double brin.

La lecture des DO permet également d'estimer la pureté de l'ADN extrait en mesurant le rapport DO 260 nm/DO 280 nm.

- 1,7 < Rapport < 2,0 : ADN pure c-à-d non contaminé par les protéines.
- Rapport <1,7 indique une contamination de l'ADN par les protéines.
- Rapport >2, indique que l'ADN est contaminé par l'ARN.

#### 2.1.4) Contrôle qualitatif des acides nucléiques extrait par électrophorèse sur gel d'agarose

Avant toute utilisation, il est indispensable de vérifier que l'ADN n'a pas été dégradé au cours des différentes étapes de l'extraction. Pour cela, l'ADN extrait est mis à migrer sur un gel d'agarose à 0.8%.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est le moyen le plus efficace pour séparer des fragments d'ADN de différentes tailles allant de 100 pb à 25 kb. L'agarose est extraite des algues des genres *Gelidium* et *Gracilaria*, et se compose de sous-unités répétées d'agarobiose (L- et D-galactose). Pendant la gélification, les polymères d'agarose s'associent de manière non covalente et forment une matrice dont la taille des pores détermine les propriétés de tamisage moléculaire d'un gel.

Pour séparer l'ADN en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN est chargé dans des puits préfabriqués dans le gel et un courant est appliqué. Le squelette phosphate de la molécule d'ADN est chargé négativement, par conséquent, lorsqu'ils sont placés dans un champ électrique, les fragments d'ADN migrent vers l'anode chargée positivement. La charge relative étant constante, la séparation des molécules d'ADN sera en fonction du poids moléculaire sur une distance inversement proportionnelle au log du poids moléculaire.

Après séparation, les molécules d'ADN peuvent être visualisées sous lumière UV sous l'effet d'un agent fluorescent, le bromure d'éthidium (Shinar *et al.*, 2012).

### **2.2) Recherche des mutations dans le gène *MEFV***

Plusieurs techniques de biologie moléculaire ont été utilisées pour le diagnostic génétique de la FMF : polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et électrophorèse sur gel à gradient de dénaturation (DGGE). Cependant, ces techniques tendent à être supplantées par le séquençage. En effet, la plupart des laboratoires de recherche ainsi que les laboratoires fournissant un diagnostic génétique de la FMF utilisent le séquençage Sanger.

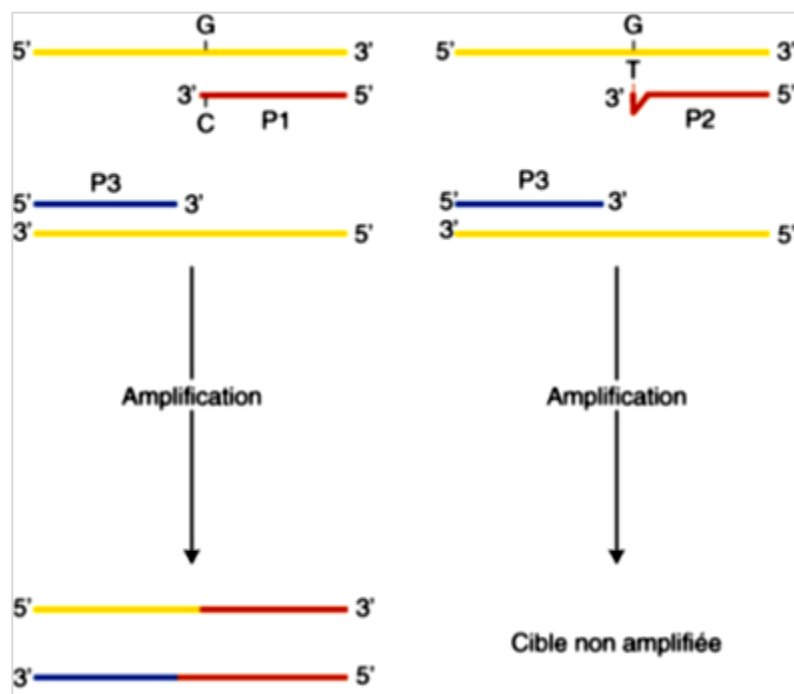
#### 2.2.1) Technique PCR-ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*)

Dans le cas de la FMF, la PCR-ARMS est appliquée surtout pour mettre en évidence les quatre mutations fondatrices dans l'exon 10 : p.M680I, p.M694V, p.M694I et p.M726A. Pour chaque mutation, un set d'amorces spécifique est utilisé (French FMF consortium, 1997 ; Eisenberg *et al.*, 1998). La PCR-ARMS, connue également sous le nom de PCR spécifique d'allèles, est un variant de la PCR qui permet de détecter tout changement nucléotidique

impliquant une seule base. Elle est basée sur le principe de mésappariement d'une amorce en 3' qui empêche l'amplification du fragment. Deux amplifications sont réalisées en parallèle, en présence d'une amorce commune aux deux réactions :

- i. Une amplification en présence de l'amorce spécifique de la séquence normale,
- ii. Une amplification en présence de l'amorce spécifique de la séquence mutée.

Les amorces P1 et P2 diffèrent en 3' par une seule 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 (Figure 7). La présence ou l'absence d'un produit PCR permet de diagnostiquer la présence ou l'absence de l'allèle cible après migration par électrophorèse sur gel d'agarose

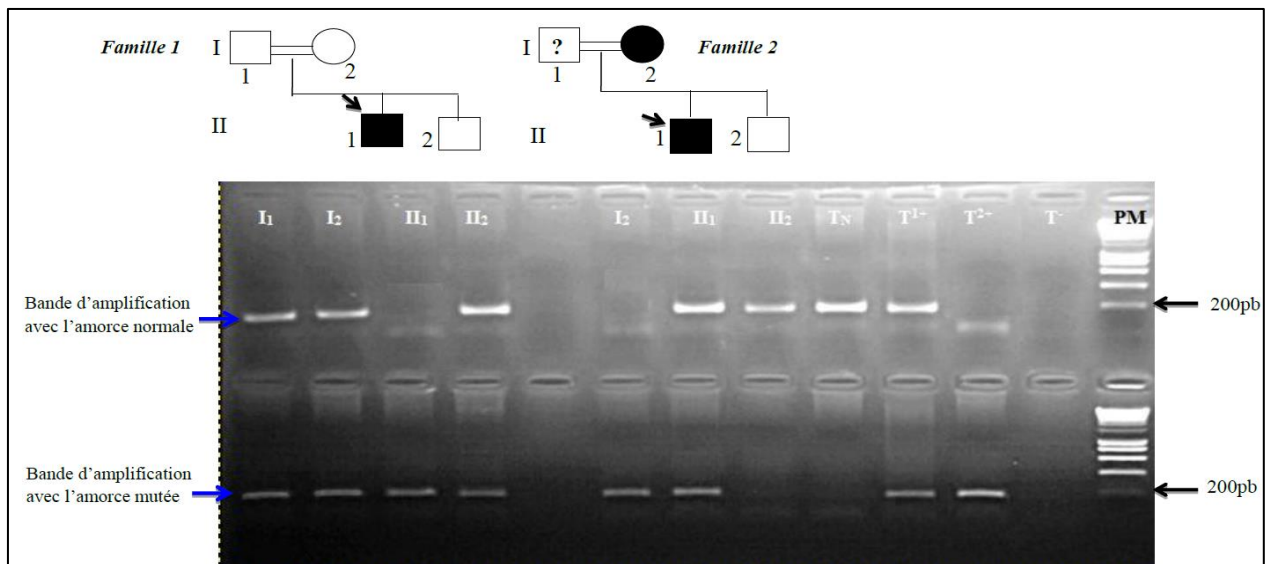


(Vassias, 2012).

**Figure 7 :** Principe schématisé de la PCR-ARMS (Vassias, 2012)

La figure ci-dessous est un exemple de PCR-ARMS appliquée pour la recherche du variant pathogène p.M694I chez les membres de deux familles Algériennes suspectées de FMF. D'après le profil électrophorétique obtenu :

- II, I2, III1 et II2 sont hétérozygotes (famille 1)
- III1 : homozygote (famille 1)



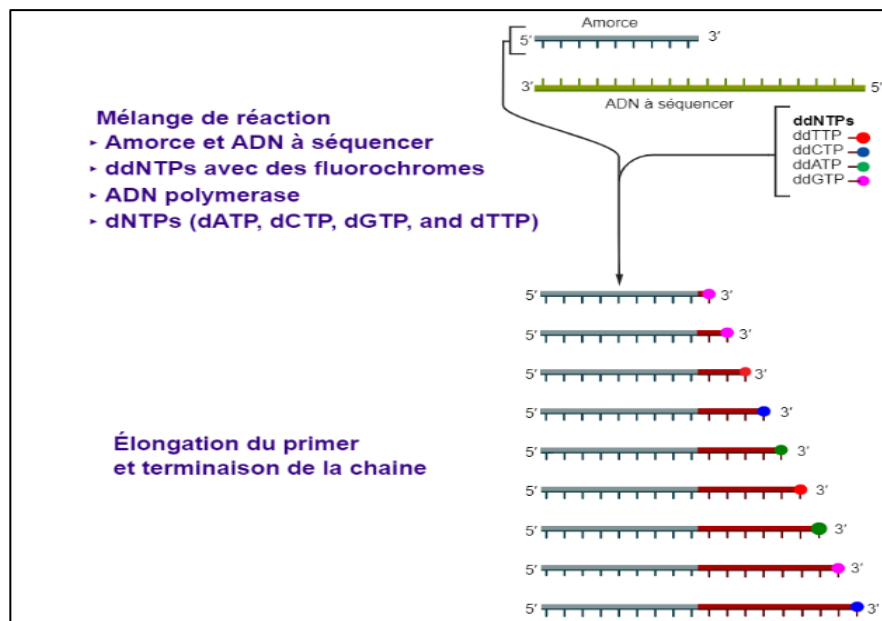
**Figure 8** : Exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose (2%) pour la mise en évidence de p.M694I chez deux familles Algériennes (T<sub>N</sub>: témoin normal; T<sup>+1</sup>: témoin positif hétérozygote; T<sup>+2</sup>: témoin positif homozygote; T<sup>-</sup>: témoin négatif).

### 2.2.2) Séquençage par la méthode de Sanger

Le séquençage par la méthode de Sanger est recommandé pour les patients présentant un phénotype clinique non-ambigu, pour rechercher des mutations dans les gènes connus pour contenir des points chauds mutationnels. Chez les patients suspectés de FMF, l'exon 10 du *MEFV* est largement exploré par séquençage (Touitou et Aksentijevich, 2019). En effet, l'exon 10 contient deux points chauds, au niveau du codon 680 et 694 (Touitou, 2001).

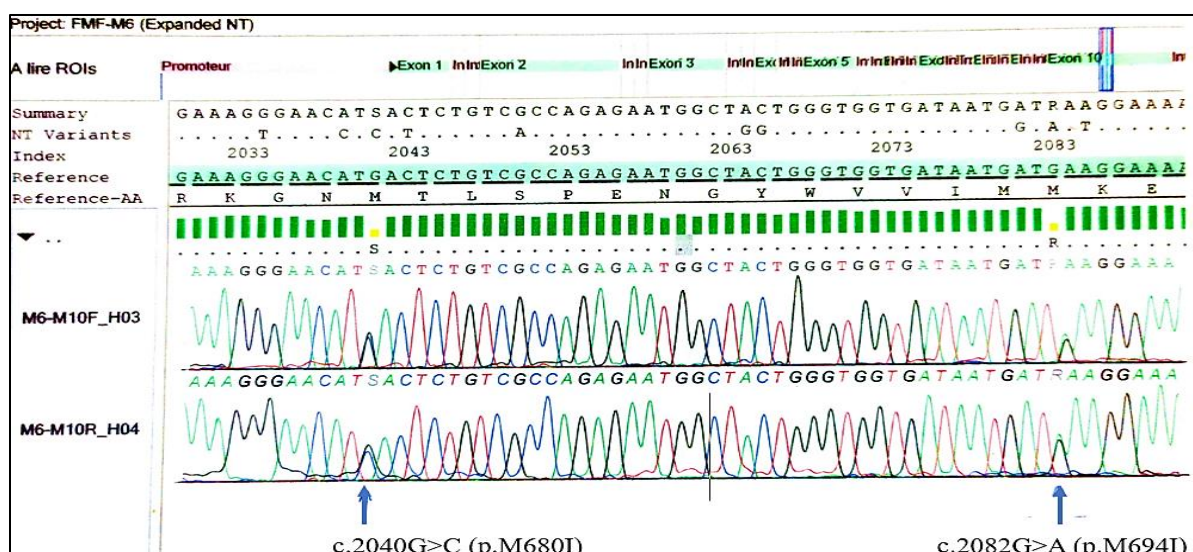
Dans le séquençage de Sanger, une amorce d'ADN complémentaire de l'ADN matrice (l'ADN à séquencer) est utilisée comme point de départ de la synthèse de l'ADN. En présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs : A, G, C et T), la polymérase étend l'amorce en ajoutant le dNTP complémentaire au brin d'ADN matrice de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', et de manière aléatoire et inconstante des didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP), par exemple un ddGTP sera parfois ajouté à la place d'un dGTP. Pour déterminer quel nucléotide est incorporé dans la chaîne de nucléotides, les quatre didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTPs : ddATP, ddGTP, ddCTP, et ddTTP) sont marqués avec un fluorophore différent pour chaque ddNTP. Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation. La réaction d'extension s'arrête. Durant la réaction, pour chaque base de l'ADN au moins une fois, un ddNTP complémentaire sera intégré à la place d'un dNTP. Par conséquent, à la fin de la réaction, nous obtiendrons des fragments de taille différente (Gauthier, 2007).

L'analyse des différents fragments se fait par une électrophorèse capillaire. Lors de la migration, chaque fragment (contenant un ddNTP marqué par un fluorophore) sera excité par un laser et un signal lumineux spécifique sera généré, le signal obtenu sera analysé par un logiciel spécifique. Le résultat apparaît sous forme d'un électrophorégramme. L'analyse d'un fragment d'ADN après PCR se fait toujours à l'aide d'une amorce sens et antisens afin de confirmer la séquence (et une éventuelle anomalie de séquence) (Lamoril *et al.*, 2008).



**Figure 9:** Synthèse de l'ADN complémentaire à partir de dNTPs et ddNTPs (Sanger *et al.*, 1977).

La figure ci-dessous est un exemple de résultats obtenus par séquençage de l'exon 10 chez un patient Algérien où deux mutations ont été identifiées : p.M680I et p.M694I.



**Figure 10:** Exemple d'un électrophérogramme chez un patient FMF hétérozygote composite

### 2.2.3) Next Generation Sequencing (NGS)

Le NGS ou le séquençage à haut débit est un outil de diagnostic qui permet l'analyse simultanée de plusieurs gènes et la détection efficace du mosaïcisme génétique. Il est ainsi basé sur le séquençage parallèle de multiples petits fragments d'ADN cible (Shendure e Ji, 2008).

Cette méthode comporte trois étapes principales : (1) la création d'une librairie de courtes séquences d'ADN comprenant l'ensemble de l'ADN cible, qui sont ensuite ligaturés avec des adaptateurs universels, (2) amplification clonale des librairies et (3) le séquençage de chaque fragment de la librairie selon l'une des différentes approches possibles (Audebert *et al.*, 2014).

Permettant le séquençage de plusieurs gènes simultanément, le NGS peut faciliter le diagnostic chez les patients atteints de troubles auto-inflammatoires, génétiquement différents mais avec un chevauchement phénotypique, rendant ainsi le diagnostic clinique très incertain. Alors qu'il s'agissait au départ d'une technologie relativement coûteuse, cette approche est devenue de plus en plus efficace en termes de temps et de coût et est actuellement pratiquée dans de nombreux pays (Hashkeset *al.*, 2019). Trois approches différentes de cette méthode sont applicables :

#### **a) *Panels de gènes ciblés***

Le séquençage NGS ciblé est aujourd'hui couramment utilisé pour les tests génétiques des maladies auto-inflammatoires (Rusmini *et al.*, 2015). Il implique l'analyse simultanée de la séquence codante complète d'un panel de gènes sélectionnés et peut étudier jusqu'à une centaine de gènes candidats. Le contenu des panels varie selon les laboratoires, mais comprend généralement les gènes associés aux syndromes classiques de fièvre héréditaire récurrente (*MEFV*, *TNFRSF1A*, *MVK*, *NLRP3*), au syndrome de Blau et au déficit en antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1 (DIRA). La performance des panels est actuellement évaluée et se situe probablement autour de 20% sur la base des rapports et études actuels (Nakayama *et al.*, 2017) (c'est-à-dire que 20% des échantillons provenant de patients suspectés de troubles auto-inflammatoires donnent un résultat clair avec un panel de gènes ciblés).

#### **b) *Séquençage de l'exome entier (WES)***

Le WES implique le séquençage complet de presque toute la région codante (80-90%) des gènes exprimés et il a révolutionné la découverte des gènes causaux des maladies auto-

inflammatoires. En effet, tous les gènes récemment identifiés chez les patients atteints de maladies auto-inflammatoires ont été découverts grâce à cette technologie complète. Le WES n'est pas encore utilisée dans les diagnostics de routine, mais avec la diminution des coûts et l'amélioration de l'efficacité de l'aspect bioinformatique, certains laboratoires envisagent de l'utiliser pour les tests génétiques, car le rendement diagnostique du séquençage de panel ciblé reste assez faible. Actuellement, la plupart des laboratoires de diagnostic général rapportent un rendement de 25 à 30 % des analyses WES, ce qui représente une légère augmentation par rapport à l'analyse de panel ciblée (Rusmini *et al.*, 2015 ; Omoyinmi *et al.*, 2017).

### c) *Séquençage du génome entier (WGS)*

Cette approche examine la séquence humaine complète, principalement utilisée dans la recherche (Bogaert *et al.*, 2017). Le WGS est recommandé pour les patients fortement suspectés d'avoir un trouble monogénique et qui restent non diagnostiqués après l'analyse WES. Le WGS identifierait les mutations dans les régions régulatrices des gènes responsables de la maladie connus ou les mutations pathogènes putatives dans les ARN non codants ou les variations du nombre de copies (c'est-à-dire délétion/duplication) (Elsaid *et al.*, 2016 ; Nakayama *et al.*, 2017).

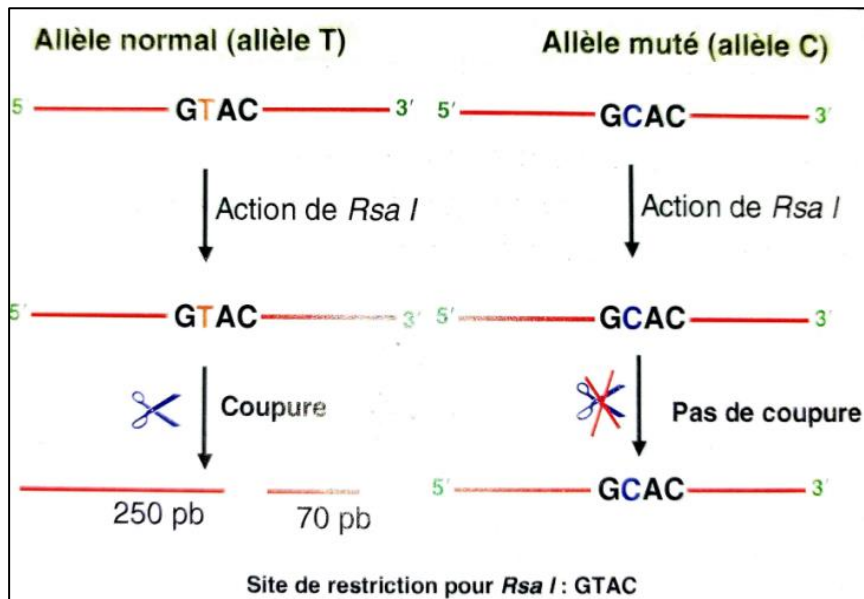
## **2.3) Recherche des polymorphismes dans le gène *SAA1***

Les deux polymorphismes bi-alléliques (SNP), 2995C/T et 3010C/T, situés dans l'exon 3 du gène *SAA1* sont recherchés par application de la technique de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism*) suivie d'une séparation par électrophorèse sur un gel d'agarose afin de déterminer les différents haplotypes du gène (Gershoni-Baruch *et al.*, 2003b).

### 2.3.1) Principe de la PCR-RFLP

Les polymorphismes de type RFLP sont identifiés à l'aide d'enzymes de restriction qui ne coupent l'ADN qu'à des sites de restriction spécifiques.

Dans la PCR-RFLP, pour détecter deux allèles différents d'une même séquence d'ADN, le fragment d'intérêt est d'abord amplifié par PCR, puis soumis à l'action d'une enzyme de restriction spécifique qui ne coupe qu'une des formes alléliques (Figure 11). Les produits de restriction sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide (Karim, 2019).



**Figure 11:** Principe schématisé de la PCR-RFLP(Ameziane, 2006).

La séquence du gène *SAA1* a été obtenue à partir du site <https://genome.ucsc.edu/index.html>. L'amplification de la région de l'exon 3 contenant les deux SNP a été réalisée en utilisant les amorces suivantes (Moriguchi *et al.*, 2001):

- 5'-GCCAATTACATCGGCTCAG-3' (sens)
- 5'-TGGCCAAAGAATCTCTGGAT-3' (antisens).

### 2.3.2) Action des enzymes de restriction sur le fragment amplifié

La région amplifiée de 517pb (Figure 12) est ensuite soumise à l'action des deux enzymes de restriction. Les sites de restriction et la taille des fragments générés ont été obtenus à partir du site : [www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org) (annexe 2,3,4,5).

Les différents produits de restriction générés sont récapitulés sur la figure 13.

- i. Avec l'enzyme *Ban I* qui reconnaît la séquence : 5'-GGYRCC-3' (Y: C ou T ; R: A ou G)
  - L'allèle *SAA1α* est digéré en 3 fragments : 316, 176 et 25 pb, en présence de T en position 2995 (pas de coupure).
  - Les allèles *SAA1β* et *SAA1γ* sont digérés en 4 fragments : 243, 176, 73 et 25 pb, en présence d'une C en position 2995.
- ii. Avec l'enzyme *Bcl I* qui reconnaît la séquence : 5'-TGATCA-3'
  - Les allèles *SAA1α* et *SAA1γ* ne sont pas digérés, le fragment est ainsi de 517pb : 3010C.
  - L'allèle *β* est digéré en 2 fragments de 425pb et 92 pb : 3010T.

GCCAATTACATCGGCTCAGACAAATACTTCCATGCTCGGGGGAAC TATGATGCTGC  
 CAAAAGGGGACCTGGGGGTG **C/T(2995)**CTGGGCTGCAGAAG **C/T(3010)**GATCAGGT  
 AACTGGAGCTCCTGGGACGTTAGGGCTGGGTGAGCAGAGCTTGCCTGCC TTGGAC  
 AGTCAGGAGGGAGACGAGCTCCTTGTGGAGAAGTTAGAGGCTGCGGCCCTCCTC  
 CTCTTGCCCTCTCTGCCTCTGTGCTCAGTGTGAGGTCTGAGTGGATGGTAGGAG  
 TGAGTGATTCCTCATCCTCCCTCTCTGGGTGCTGTTCATCCAGCCTAGGGGTGCC  
 AGCCTGGCTGAATGGGGTGGTGCCAGTGTTTTCATCCCTCCTTCCTTGGCCTTCT  
 GGGCTCCTCTCTGAGCCCTCCCTTGAACAGGGAGAATGGGAGGGTGGGCTATTG  
 CTCACTGGCCTGATTATTAATCTCCTTCTTGCCTGCCTTGATTACAGCGATGCCAGA  
 GAGAATATCCAGAGATTCTTTGGCCA

Figure 12 : séquence amplifiée (<http://genome.ucsc.edu/>) contenant les deux SNP d'intérêt

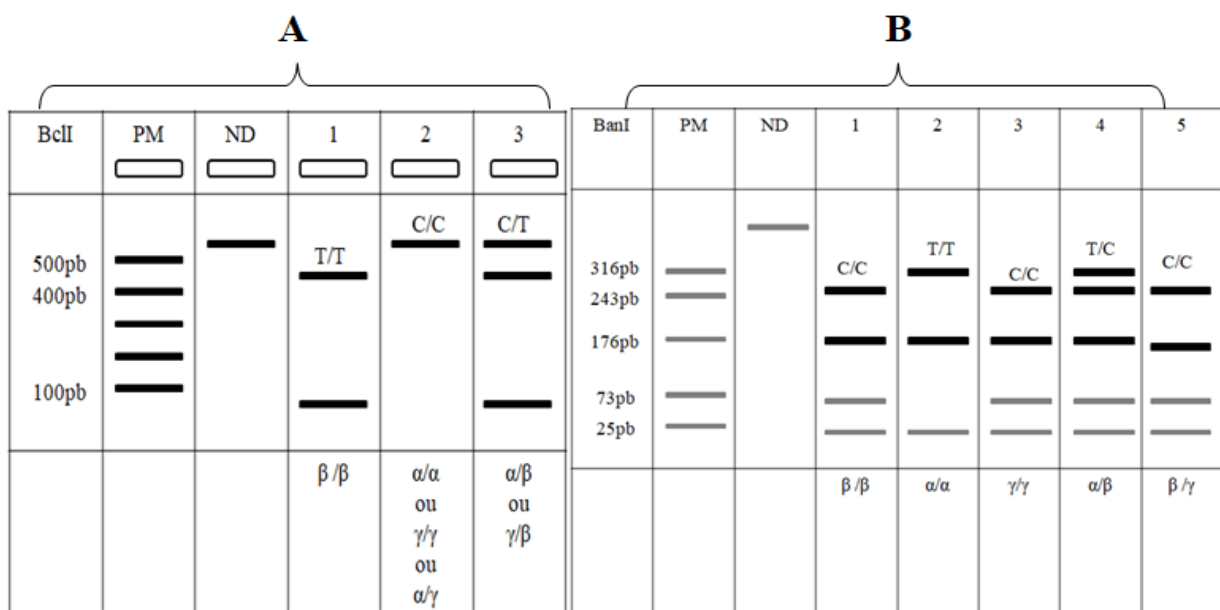


Figure 13 : Les différents profils de restriction en fonction du génotype au locus *SAAl*

### 3) Analyse statistique

Les données ont été décrites statistiquement en termes d'effectifs et de pourcentages.  $P < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif. En biologie, par convention, le résultat est significatif lorsque  $p < 0,05$ . La valeur  $p$  est le seuil minimal au-delà duquel on rejette  $H_0$ . On peut ainsi résumer la situation comme suit (Fisher, 1922) :

- Une différence significative (entre les données et l'hypothèse nulle) est une différence que le hasard de l'échantillonnage ne pourrait que rarement produire :

→ Les données sont incompatibles avec  $H_0$

→ On a une preuve statistique contre  $H_0$  (on rejette  $H_0$ )

- Une différence non significative (entre les données et l'hypothèse nulle) est une différence que le hasard de l'échantillonnage pourrait produire

- Les données sont compatibles avec  $H_0$ .

- On n'a pas de preuve statistique contre  $H_0$  (on ne rejette pas  $H_0$ ).

### **3.1) Comparaison de deux proportions**

Les fréquences relatives d'un certain caractère qualitatif dans deux échantillons d'effectifs  $n_1$  et  $n_2$  ont respectivement pour valeur  $q_1=a_1/n_1$  et  $q_2=a_2/n_2$ , c'est-à-dire qu'on y a dénombré respectivement  $a_1$  et  $a_2$  individus présentant tel caractère.

Le programme XLSTAT permet de calculer la valeur  $p$ , dans le cas de la comparaison de deux proportions. Dans le cas des petits échantillons, la correction de continuité doit être appliquée. Cette correction a pour effet de réduire la différence observée entre les deux proportions.

### **3.2) Régression logistique : variable indépendante dichotomique**

La situation dans laquelle la régression logistique est applicable est celle dans laquelle les variables dépendantes et indépendantes sont dichotomiques. Les valeurs de la variable dépendante indiquent généralement si un sujet a contracté une maladie ou non. Les valeurs de la variable indépendante indiquent le statut du sujet par rapport à la présence ou à l'absence d'un facteur de risque (Daniel and Cross, 2012).

Les paramètres d'un modèle de régression logistique s'interprètent en terme d'odds-ratio. Les résultats sont donnés sous forme de rapport de cotes ou odds-ratio (OR) avec un intervalle de confiance de 95% (IC 95).

Dans ce cas, l'analyse de régression logistique est utilisée pour étudier la contribution des variables indépendantes au développement de l'amylose.

#### ***a) Rapport de cotes (odds-ratio)***

Un rapport de cotes (ou Odds-ratio en anglais) est une mesure de l'association entre une exposition et un résultat. L'Odds-ratio représente les chances qu'un résultat se produise étant donné une exposition particulière, par rapport aux chances que le résultat se produise en l'absence de cette exposition.

Les rapports de cotes sont le plus souvent utilisés dans les études cas-témoins. La cote qu'un événement A se produise se définit comme la probabilité que A se produise divisé par la probabilité qu'il ne se produise pas (Szumilas, 2010) :

$$cote(A) = \frac{\text{prob}(\text{A se réalise})}{\text{prob}(\text{A ne se réalise pas})} = \frac{\text{prob}(\text{A se réalise})}{1 - \text{prob}(\text{A se réalise})}$$

Alors que l'on compare les proportions via leurs différences, les cotes (odds) de deux événements A et B se comparent via leur quotient. Il s'agit du rapport de cotes entre deux événements définis par :

$$Odds - ratio = \frac{cote(A)}{cote(B)} = \frac{\frac{\text{prob}(A)}{1 - \text{prob}(A)}}{\frac{\text{prob}(B)}{1 - \text{prob}(B)}} = \frac{\text{prob}(A) \cdot (1 - \text{prob}(B))}{\text{prob}(B) \cdot (1 - \text{prob}(A))}$$

OR=1 L'exposition n'affecte pas les chances de résultat.

OR>1 Exposition associée à de plus grandes chances de résultats.

OR<1 Exposition associée à des chances de résultats plus faibles.

#### ***b) Intervalle de confiance de l'odds ratio***

On calcule l'erreur type :  $\sqrt{\frac{1}{a}} + \sqrt{\frac{1}{b}} + \sqrt{\frac{1}{c}} + \sqrt{\frac{1}{d}}$

$$IC = e^{Ln(OR) \pm Z\alpha \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}}$$

(a, b, c, d : effectifs dans les cases du tableau de contingence).

L'odds-ratio n'est significatif que si l'intervalle de confiance n'inclut pas la valeur de 1.

## **Partie III**

### **Etude Cas-Témoins**

## **I) Résultats**

Dans sa forme grave, la FMF se complique par une amylose rénale de type AA. Chez les patients FMF, des études ont permis d'associer les mutations du gène *MEFV* au développement de l'amylose rénale AA. De plus, le gène qui code pour la SAA1 a été identifié comme un gène modificateur qui peut influencer le risque de survenue de cette complication.

Dans notre cas, il s'agit d'une étude rétrospective (cas-témoins) qui vise à analyser des résultats déjà obtenus afin de faire ressortir les facteurs de risque génétiques pouvant influencer la survenue de l'amylose AA au cours de la FMF, en identifiant :

- Les mutations dans l'exon 10 du gène *MEFV*.
- Les polymorphismes dans l'exon 3 du gène *SAA1*.

### **1) Patients et Témoins**

Cette étude a impliqué 62 patients atteints de FMF (masculin=28, féminin=34) et un groupe de 13 individus sains. Les patients ont été recrutés des services de Néphrologie et de Médecine interne des hôpitaux d'Alger et de Tlemcen, entre la période 2009- 2017.

Les témoins ont été recrutés au hasard dans la population générale (centres de transfusion sanguine des hôpitaux de Ain-Taya et de Rouiba). Chez ces derniers, aucune mutation n'a été identifiée après le séquençage des exons 2, 3, 5 et 10 du *MEFV*.

Le consentement éclairé de chaque patient, ou de son tuteur légal s'il était mineur, a été obtenu afin de pouvoir réaliser le prélèvement ainsi que l'étude moléculaire.

#### - Données démographiques des patients étudiés

Les patients ont été subdivisés en deux groupes, selon la présence ou l'absence de l'amylose rénale. L'amylose AA a été confirmée par biopsie rénale.

#### - Le sex- ratio

Parmi les patients ayant développé l'amylose rénale (n= 41), 19 sont de sexe masculin et 22 de sexe féminin, avec un sex-ratio de 0, 86. Parmi les patients sans amylose (n= 21), 9 sont de sexe masculin et 12 de sexe féminin, avec un sex-ratio de 0,75.

#### - Age des patients

L'âge des patients au recrutement était de 36,26±14,43 ans chez les patients avec amylose et de 33,80±14,71ans chez les patients FMF sans amylose. La différence d'âge n'est pas significativement différente entre les deux groupes (p= 0,530).

De plus, d'autres critères ont été pris en considération pour la sélection des patients sans amylose :

- Age du début des crises, comparable à celui des patients avec amylose,
- La durée moyenne de la maladie, comparable avec les patients sans amylose.

## 2) Etude génétique

### 2.1) Mutations du gène MEFV

Le premier facteur de risque génétique analysé est le gène *MEFV*, en impliquant tous les patients FMF.

#### a) *Fréquences alléliques*

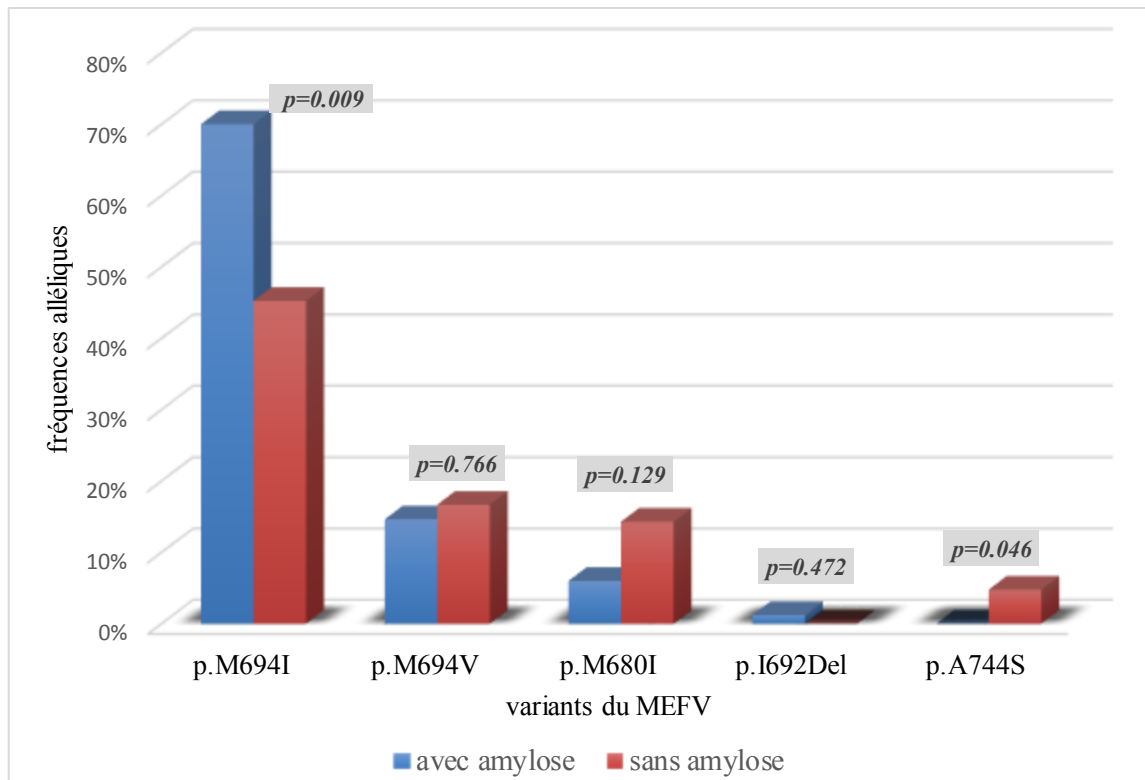
Le screening de l'exon 10 du *MEFV* chez l'ensemble des patients FMF (n= 62) a permis d'identifier 5 allèles différents : p.M694I, p.M694V, p.M680I, p.I692del et p.A744S, avec une distribution différentielle entre les deux groupes de patients analysés (Tableau VI).

L'analyse des profils mutationnels a montré la prédominance de l'allèle p.M694I chez les deux groupes de patients. Cependant, la fréquence de ce variant pathogène est significativement plus élevée chez les patients avec amylose où il représente 70% (57/82) des allèles totaux, par rapport aux patients sans amylose (19/42 ; 45,23%) (p=0,009).

**Tableau VI** : Nombres et fréquences alléliques des variants du *MEFV* chez les deux groupes de patients.

<b>Mutations identifiés</b>	<b>Patients avec amylose (n=41)</b>	<b>Patients sans amylose (n=21)</b>	<b>Valeur de p</b>
	Nombre d'allèles, n= 82 Fréquence allélique (%)	Nombre d'allèles, n= 42 Fréquence allélique (%)	
<b>p.M694I</b>	57 (70)	19 (45,24)	0,009
<b>p.M694V</b>	12 (14,63)	7 (16,67)	0,766
<b>p.M680I</b>	5 (6)	6 (14,29)	0,129
<b>p.I692Del</b>	1 (1,2)	0	0,472
<b>p.A744S</b>	0	2 (4,76)	0,046

Les autres variants ont été identifiés avec des fréquences comparables entre les deux groupes de patients FMF. Cependant, la délétion p.I692del a été identifiée uniquement chez les patients avec amylose AA, et p.A744S a été identifiée uniquement chez les patients sans amylose.



**Figure 14:** Distribution des fréquences alléliques des variants du *MEFV* chez les patients FMF avec et sans amylose AA.

### ***b) Fréquences génotypiques***

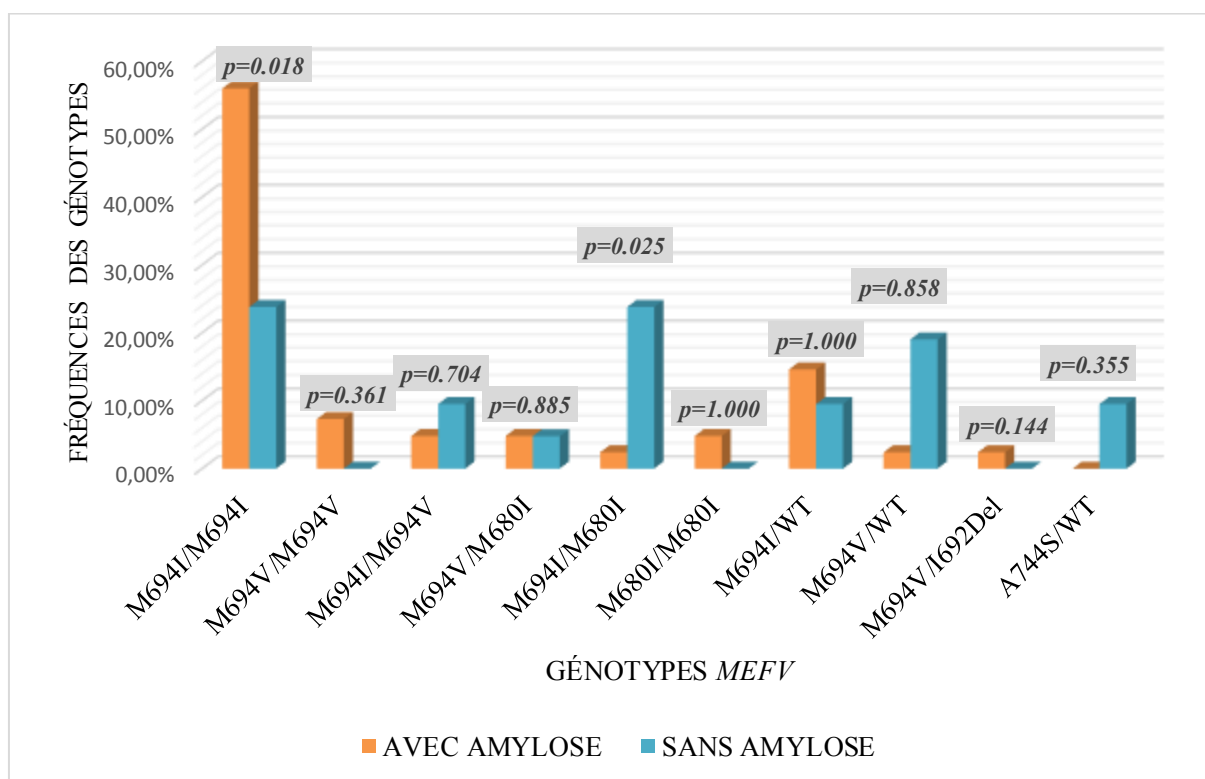
Les allèles identifiés dans la cohorte de 62 patients ont été retrouvés soit à l'état homozygote, hétérozygote composite ou hétérozygote. Seuls les allèles p.M694I, p.M694V et p.M680I ont été retrouvés à l'état homozygote (Tableau VII).

Dans le groupe des patients avec amylose, 9 génotypes différents ont été identifiés :

- Le génotype M694I/M694I était prédominant, rencontré chez 24/41 patients (58,53%), ce qui est significativement plus élevé comparé aux patients sans amylose (5/21; 23,8%) ( $p=0,018$ ).
- Le génotype M694V/M694V a été identifié uniquement chez les patients avec amylose (3/41 ; 7,3%), cependant avec une fréquence non significative comparé aux patients sans amylose (0/21 ; 0%) ( $p=0,361$ ).
- La proportion des autres génotypes identifiés était équivalente entre les 2 groupes de patients, à l'exception du génotype M694I/M680I qui est significativement plus élevé chez les patients sans amylose (Tableau VII, Figure 15).

**Tableau VII** : Répartition des génotypes identifiés chez les deux groupes de patients

Etat des variants identifiés	Génotypes	Patients avec amylose (n= 41)	Patients sans amylose (n= 21)	p-value
		Nombre (%)	Nombre (%)	
Homozygote	<b>M694I/M694I</b>	24 (58.53)	5 (23,8)	0.018
	<b>M694V/M694V</b>	3 (7,3)	0	0.361
	<b>M680I/M680I</b>	1 (2.4)	0	0.704
Hétérozygote composite	<b>M694I/M694V</b>	2 (4.8)	2 (9,5)	0.885
	<b>M694I/M680I</b>	1 (2,4)	5 (23,8)	0,025
	<b>M694V/M680I</b>	2 (4,8)	1 (4,7)	1.000
	<b>M694V/I692Del</b>	1 (2,4)	0	1.000
Hétérozygote	<b>M694I</b>	6 (14,6)	2 (9,5)	0.858
	<b>M694V</b>	1 (2,4)	4 (19)	0.144
	<b>A744S</b>	0	2 (9,5)	0,355



**Figure 15** : Distribution des génotypes du gène *MEFV* chez des patients atteints de FMF avec et sans amylose rénale AA.

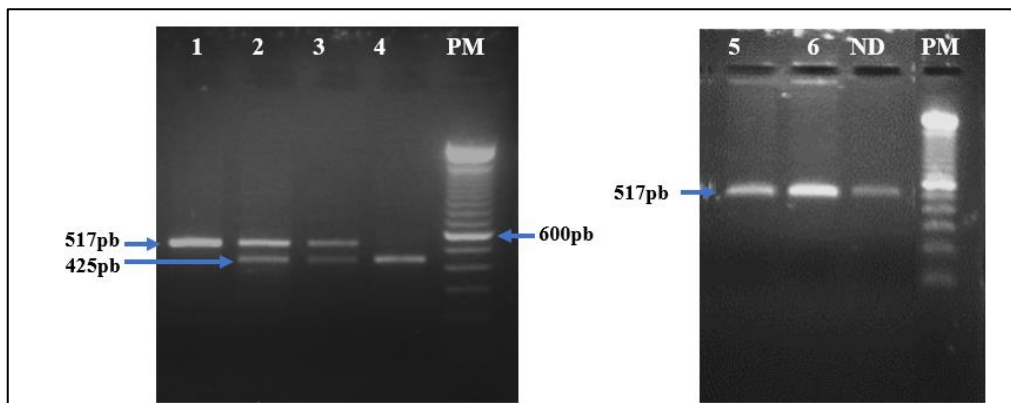
## 2.2) Polymorphismes du gène SAA1

La recherche des polymorphismes dans l'exon 3 du gène de la SAA1 a impliqué les mêmes patients analysés précédemment ainsi qu'un groupe d'individus sains :

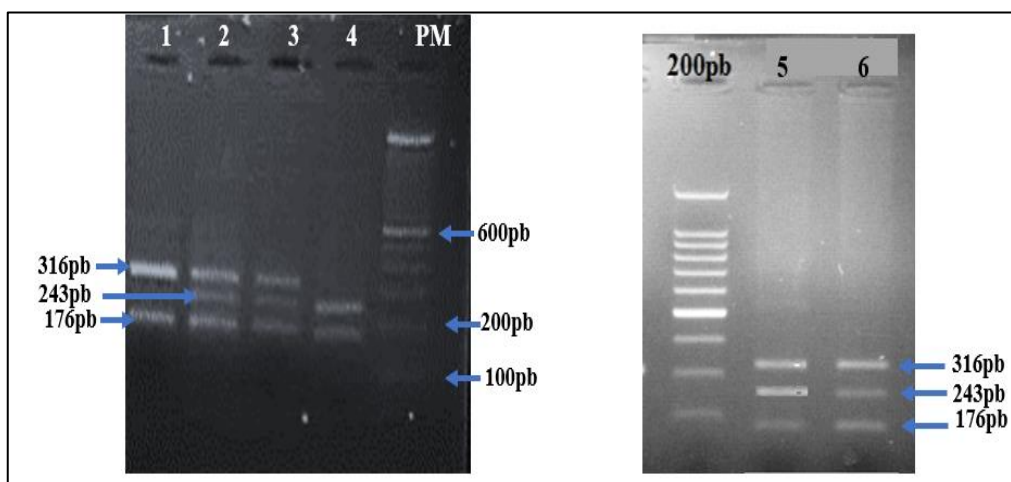
- 29 patients FMF avec amylose AA,
- 20 patients FMF sans amylose AA,
- 13 individus sains.

Les deux SNP, 3010C/T et 2995C/T, sont identifiés, respectivement, par les enzymes *Bcl* I et *Ban*I. Cinq génotypes ont été identifiés chez les individus analysés (Figure 16, A, B):

- SAA1.1/SAA1.1 (SAA1 $\alpha$ / $\alpha$ ): patient 1.
- SAA1.5/SAA1.5 (SAA1 $\beta$ / $\beta$ ): patient 4
- SAA1.1/SAA1.5 (SAA1 $\alpha$ / $\beta$ ): patients 2, 3.
- SAA1.1/SAA1.3 (SAA1 $\alpha$ / $\gamma$ ): patients 5, 6.
- SAA1.3/SAA1.5 (SAA1 $\gamma$ / $\beta$ ) (non observé sur la figure 16).



**Figure 16, A :** Profil de restriction obtenu avec *Bcl*I chez quelques patients FMF



**Figure 16, B :** Profil de restriction obtenu avec *Ban*I chez quelques patients FMF

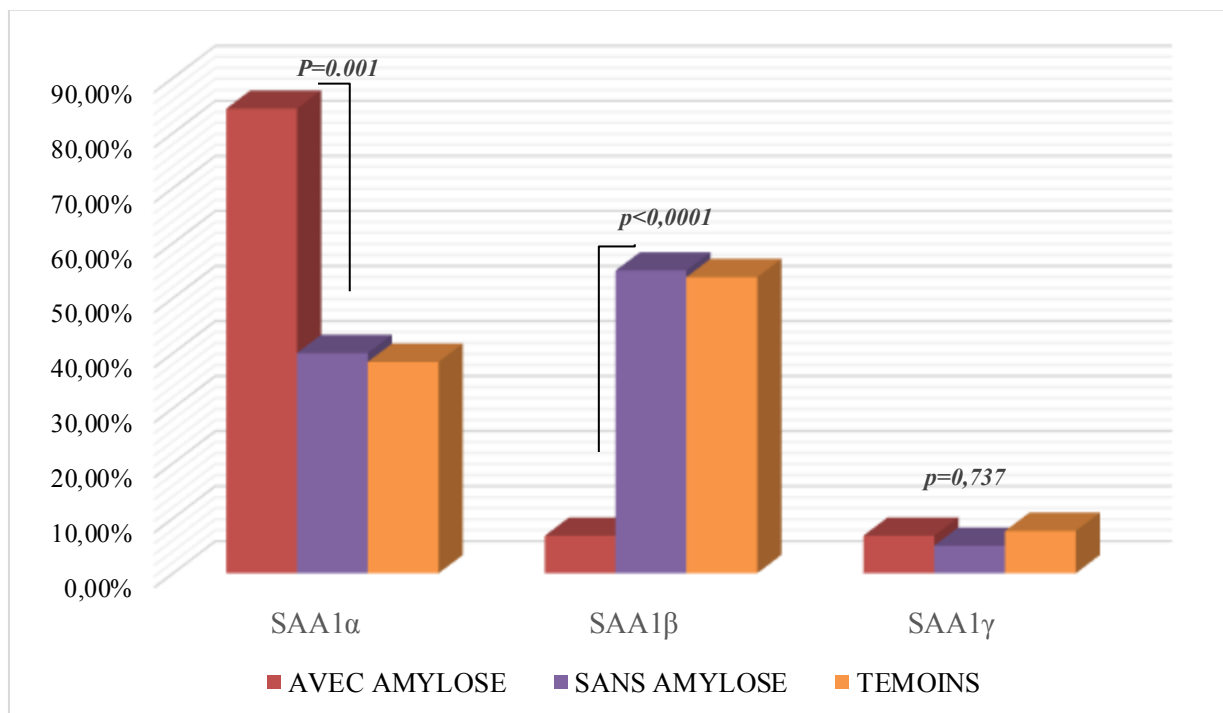
**a) Fréquence des allèles du gène SAA1**

La répartition des trois allèles SAA1 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  chez les trois groupes d'individus analysés est résumé dans le tableau VIII.

**Tableau VIII** : Comparaison des nombres et des fréquences alléliques au locus SAA1 chez des patients atteints de FMF avec ou sans amylose et chez des témoins sains.

Allèles SAA1	Nombre d'allèles (%)		
	Patients avec amylose (n=58)	Patients sans amylose (n=40)	Témoins (n=26)
$\alpha$	49 (84,4%)	16 (40%)	10 (38,4%)
$\beta$	4 (6,8%)	22 (55%)	14 (53,8%)
$\gamma$	5 (6,8%)	2 (5%)	2 (7,69%)

La comparaison entre les trois groupes d'individus (Figure 17) a montré que l'allèle SAA1 $\alpha$  était significativement plus élevé chez les patients amylose AA comparé aux patients sans amylose ( $p=0.001$ ) et aux témoins ( $p<0,0001$ ). Cependant la proportion allélique n'est pas statistiquement différente entre les patients sans amylose AA et les témoins ( $p=1.000$ ).



**Figure 17** : Histogramme montrant les fréquences alléliques chez les trois groupes étudiés

La fréquence de l'allèle SAA1 $\beta$  est significativement plus élevée chez les patients sans amylose par rapport aux patients avec amylose ( $p < 0,0001$ ). En même temps cet allèle a été identifié dans le groupe des témoins avec une fréquence supérieure à celle des patients avec amylose ( $p < 0,0001$ ) (Figure 17). La proportion de cet allèle est la même entre les patients sans amylose et les témoins ( $p=1,000$ ). Il est à remarquer que cet allèle n'a pas été identifié à l'état homozygote chez les patients avec FMF avec amylose AA.

Pour l'allèle  $\gamma$ , la comparaison a montré que la différence n'est pas significative entre les groupes d'individus analysés ( $p=0,737$ ).

### **b) Fréquence des génotypes dans le locus SAA1**

Dans le groupe des patients FMF ayant développé l'amylose AA, 3 génotypes ont été identifiés : SAA1  $\alpha/\alpha$  ; SAA1 $\alpha/\beta$  et SAA1 $\alpha/\gamma$  (Tableau IX).

**Tableau IX** : Proportions des génotypes dans le locus SAA1 chez les trois groupes analysés

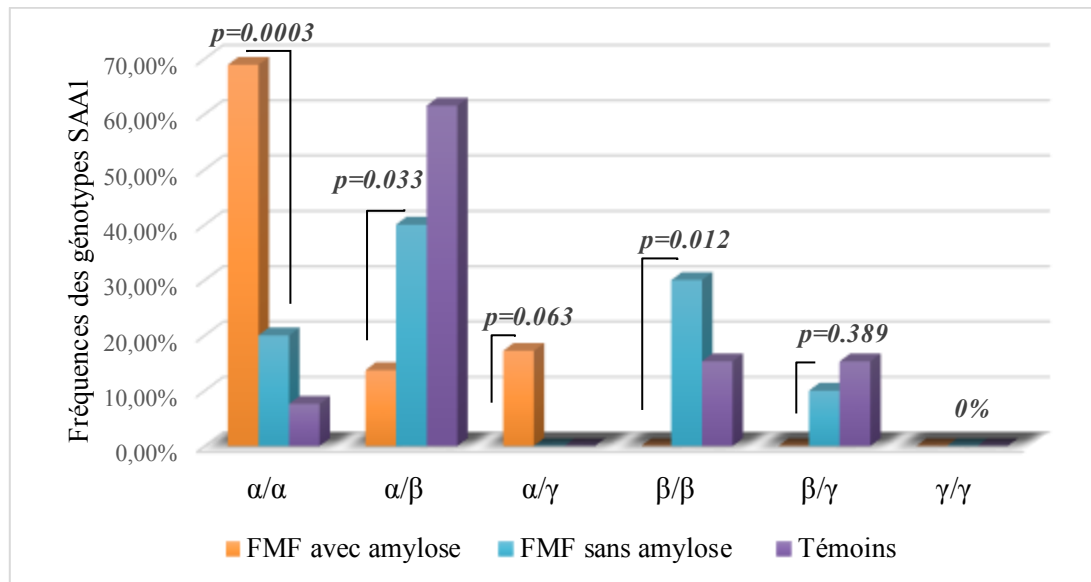
	SAA1 $\alpha/\alpha$ (SAA1.1/1.1)	SAA1 $\alpha/\beta$ (SAA1.1/1.5)	SAA1 $\beta/\beta$ (SAA1.5/1.5)	SAA1 $\alpha/\gamma$ (SAA1.1/1.3)	SAA1 $\beta/\gamma$ (SAA1.5/1.3)
<b>Patients avec amylose</b>	20 (68, 96%)	4 (13, 79%)	0	5 (17, 24%)	0
<b>Patients sans amylose</b>	4 (25%)	8 (40%)	6 (30%)	0	2 (10%)
<b>Témoins</b>	1 (7, 69%)	8 (61, 54%)	2 (15, 38%)	0	2 (15, 38%)

Le génotype SAA1  $\alpha/\alpha$  a été identifié chez la majorité des patients de ce groupe, soit 20/29 (68,96%) (Tableau IX). Cette proportion est significativement plus élevée par rapport aux patients sans amylose (4/20 ; 25%) ( $p=0,0003$ ) et aux sujets témoins (1/13 ; 7,69%) ( $p < 0,0001$ ) Cependant, la fréquence d'apparition de ce génotype est équivalente entre les patients sans amylose et les témoins ( $p=0,607$ ) (Figure 18).

Dans le groupe des patients sans amylose AA, quatre génotypes ont été identifiés : SAA1 $\alpha/\alpha$ , SAA1 $\alpha/\beta$ , SAA1 $\beta/\beta$  et SAA1 $\gamma/\beta$  (Tableau IX).

Le génotype SAA1 $\beta/\beta$  a été identifié chez 6 patients (30%), alors qu'aucun patient avec amylose AA n'était porteur de ce génotype ( $p=0,012$ ) (Figure 18). Ce même génotype a été identifié chez les individus témoins avec des proportions équivalentes avec les patients sans

amylose (Figure 18). La proportion du génotype SAA1 $\alpha/\beta$  est équivalente entre les patients sans amylose et les témoins (Figure 18). Cependant, cette proportion est significativement plus élevée chez les patients sans amylose par rapport aux patients avec amylose ( $p=0,033$ ). Le génotype SAA1 $\alpha/\gamma$  a été détecté uniquement chez les patients atteints d'amylose, alors qu'aucun génotype SAA1 $\beta/\gamma$  n'a été détecté dans ce groupe de patients (Tableau IX).



**Figure 18 :** Fréquences des génotypes du *SAA1* chez des patients atteints de FMF (avec et sans amylose) et chez des témoins sains.

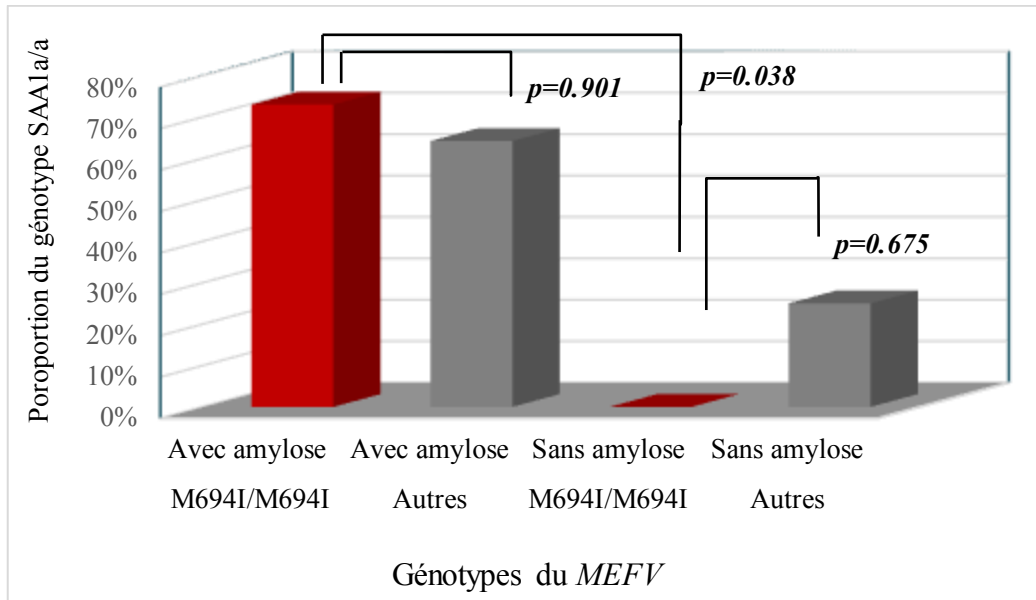
### **2.3) Distribution des génotypes au locus *SAA1* en fonction des génotypes du *MEFV***

La répartition des génotypes dans le locus *SAA1* en fonction du génotype dans le gène *MEFV* a été analysée chez les patients étudiés.

Chez les patients ayant développé une amylose AA, le génotype SAA1 $\alpha/\alpha$  est retrouvé parmi les patients ayant différents génotypes du *MEFV*, mais avec des proportions différentes. Les résultats montrent que la majorité des patients dans le groupe des patients avec amylose sont à la fois homozygotes pour p.M694I et SAA1 $\alpha/\alpha$  (11/15 ; 73,33%). Le génotype SAA1 $\alpha/\alpha$  a été retrouvé chez 9/14 (64%) des patients porteurs d'un autre génotype autre que M694I/M694I, cependant la différence n'est pas significative ( $p= 0,901$ ) (Figure 19) (annexe 6).

Dans le groupe des patients sans amylose, aucun patient n'était porteur des deux génotypes M694I/M694I et SAA1 $\alpha/\alpha$  en même temps (0/4) (Figure 19). En présence des autres génotypes du *MEFV*, quatre patients étaient homozygotes pour SAA1 $\alpha/\alpha$  (4/16 ; 25%) ( $p= 0,675$ ).

Cependant, la proportion des patients homozygotes pour p.M694I et SAA1 $\alpha$  est significativement plus élevée dans le groupe des patients avec amylose par rapport aux patients sans amylose ( $p=0,038$ ).



**Figure 19** : Répartition du génotype SAA $\alpha$ / $\alpha$  en fonction des génotypes du MEFV

Les autres génotypes du gène SAA1 étaient soit faibles, soit absents chez les patients atteints d'amylose par rapport à tous les génotypes du gène MEFV.

### 3) Estimation du risque par régression logistique

L'analyse des résultats permet d'associer les génotypes M694I/M694I et SAA1 $\alpha$ / $\alpha$  au développement de l'amylose rénale de type AA chez les patients analysés. Ce résultat nous a conduit à estimer le risque ou la contribution de chacun de ces deux facteurs génétiques au développement de cette complication. Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport ou odds-ratio (OR) avec son intervalle de confiance (IC, 95%).

#### a) *Génotype M694I/M694I*

Les calculs ont été effectués à partir du tableau de contingence où l'homozygotie pour p.M694I a été fixée comme le facteur de risque (Tableau X).

**Tableau X :** Tableau de contingence 2×2 montrant la distribution du génotype M694I/M694I et de l'amylose AA

<b>Facteur de risque</b>	<b>Patients avec amylose AA</b>	<b>Patients sans amylose AA</b>	<b>Total</b>
<b>M694I/M694I</b>	24	5	29
<b>MEFV (autres génotypes)</b>	17	16	33
<b>Total</b>	41	21	62

**b) Génotype SAA1 $\alpha$ / $\alpha$**

Les calculs ont été effectués à partir du tableau de contingence où le génotype SAA1 $\alpha$ / $\alpha$  a été fixé comme le facteur de risque (Tableau XI).

**Tableau XI :** Tableau de contingence 2×2 montrant la distribution du génotype SAA1 $\alpha$ / $\alpha$  et de l'amylose AA

<b>Facteur de risque</b>	<b>Patients avec amylose</b>	<b>Patients sans amylose</b>	<b>Total</b>
<b>SAA1<math>\alpha</math>/<math>\alpha</math></b>	20	4	24
<b>SAA1 (autres génotypes)</b>	9	16	25
<b>Total</b>	29	20	49

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau XII. Ainsi, une augmentation du risque de développer la maladie de 4,375 fois pour les patients porteurs du génotype M694I/M694I et une augmentation de 8,6 fois pour les patients présentant le génotype SAA1 $\alpha$ / $\alpha$ . De plus, les deux intervalles de confiances ne comprennent pas la valeur 1. En conséquence, les deux génotypes peuvent être considérés comme significativement associés au développement de l'amylose rénale de type AA au cours de la FMF.

**Tableau XII :** Résultats de la régression logistique

<b>Facteurs génétiques testés</b>	<b>OR</b>	<b>IC (95%)</b>
<b>M694I/M694I</b>	4,375	[1,35 – 14,08]
<b>SAA1<math>\alpha</math>/<math>\alpha</math></b>	8,679	[2,25 – 33,1]

## II) Discussion

La fièvre méditerranéenne familiale (FMF) est une maladie autosomique récessive associée à des mutations du gène *MEFV*. Les formes graves de la FMF peuvent se compliquer par une amylose rénale de type AA (Grateau *et al.*, 2005).

L'incidence de l'amylose AA au cours de la FMF varie selon les groupes ethniques. Les juifs sépharades, les arméniens et les turcs représentent les populations qui ont le plus de risque de développer cette complication par rapport aux autres populations (Grateau, 2000). En Algérie, la méconnaissance et l'absence du diagnostic génétique de la FMF est à l'origine de l'apparition de cette complication rénale chez les patients FMF. En effet, l'intervalle de temps séparant l'apparition des premiers symptômes de la FMF et le diagnostic génétique est souvent suffisamment long pour permettre l'installation de l'amylose AA et son évolution vers l'insuffisance rénale terminale et le décès de certains d'entre eux (Ait-Idir *et al.*, 2017).

Plusieurs études portant sur la corrélation mutations dans le *MEFV* et développement d'amylose AA ont été réalisées chez les populations à risque. Le variant pathogène p.M694V à l'état homozygote a été lié au phénotype sévère de la FMF et au développement de l'amylose rénale (Akpolat *et al.*, 2012; Atoyán *et al.*, 2016). Chez les populations juives, 38,3% des patients ayant développé une amylose rénale étaient homozygotes pour p.M694V (Gershoni-Baruch *et al.*, 2003). L'homozygotie pour p.M694V a été également corrélée à la survenue d'amylose AA chez les patients FMF Arméniens (Cazeneuve *et al.*, 2000; Atoyán *et al.*, 2016). D'autre part, une étude sur plus de 3500 patients turcs a montré que 400 patients étaient atteints d'amylose et le p.M694V homozygote a été détecté chez 189 (47%) d'entre eux, ce qui était significativement plus élevé que chez les patients FMF ne développant pas d'amylose (Akpolat *et al.*, 2012). Les études de corrélation phénotype/génotype ont montré que chez les Juifs, le variant p.M694V conférait un risque augmenté d'un facteur de 4,27 (Gershoni-Baruch *et al.*, 2003), de 6,8 chez les patients Arméniens (Cazeneuve *et al.*, 2000) et de 1,44 chez les Turques (Delibaş *et al.*, 2005). Dans la cohorte analysée, trois patients uniquement étaient homozygotes pour le variant pathogène p.M694V et ont tous développé une amylose AA. Ainsi, notre étude n'a pas permis d'associer p.M694V de manière significative au développement de l'amylose AA secondaire à la FMF chez les patients Algériens.

Dans notre étude, nous avons comparé la répartition des génotypes du *MEFV* chez 62 patients atteints de FMF, dont 41 avaient une amylose AA, dans le but de caractériser les

facteurs de risque génétiques liés au développement de cette complication. Sur les 41 patients, 24 (57%) étaient homozygotes M694I/M694I, contre seulement 5/21 dans le groupe des patients sans amylose ( $p=0,013$ ). Notre étude est la seule à rapporter une large prédominance de p.M694I chez les patients FMF avec amylose AA, comparé aux autres populations Méditerranéennes (Ait-Idir *et al.*, 2017). Nos résultats permettent ainsi d'associer de manière significative le génotype M694I/M694I au développement de l'amylose rénale AA chez les patients FMF Algériens.

D'autres facteurs génétiques sont impliqués dans le développement de l'amylose rénale AA, dont le plus important est le polymorphisme du gène *SAA1* (Baba *et al.*, 1995). Chez les patients Caucasiens atteints de la PR, le risque d'amylose rénale était plus élevé pour les porteurs du génotype SAA1 $\alpha/\alpha$  (Booth *et al.*, 1998). Cependant, chez les patients Japonais atteints de PR, l'amylose rénale AA est rencontrée chez les porteurs du génotype SAA1 $\gamma/\gamma$  (Morigushi *et al.*, 1999 ; Baba S *et al.*, 2000 ; Morigushi *et al.*, 2001).

Dans ce travail, les résultats obtenus ont démontré la prédominance du génotype homozygote SAA1 $\alpha/\alpha$  dans le groupe des patients avec amylose AA, ce qui est compatible avec ce qui a été rapporté à partir des populations Caucasiennes. En Turquie et en Allemagne, des études ont montré en plus, que le risque de développer l'amylose rénale est augmenté de 2,4 à 4,86 lorsque les patients FMF sont porteurs du génotype SAA1 $\alpha/\alpha$  (Blank *et al.*, 2015; Delibas *et al.*, 2005; Yilmaz *et al.*, 2003). Dans notre étude, ce risque a été estimé à 8,67 chez les patients homozygotes pour l'allèle SAA1 $\alpha$ . Ainsi, nos résultats montrent que ces deux génotypes contribuent significativement et indépendamment au développement de l'amylose AA.

Au contraire, chez les patients FMF Egyptiens, l'implication du génotype SAA1 $\alpha/\alpha$  dans le développement de la complication rénale n'a pas été trouvée (Wilson *et al.*, 2016).

Dans une large étude menée sur de 1017 patients FMF Arméniens, il a été montré que le génotype  $\beta/\beta$  confèrait une protection contre le développement de l'amylose AA (Atoyan *et al.*, 2016). En effet, dans notre étude, le génotype SAA1 $\beta/\beta$  a été identifié uniquement chez les patients sans amylose et chez les individus témoins.

L'hétérozygotie  $\alpha/\beta$  était moins fréquente chez les patients atteints d'amylose AA. Nous confirmons toutefois les résultats obtenus par Cazeneuve *et al.*, 2000, dans lesquels la présence d'un seul allèle *SAA1* $\alpha$  ne confèrait pas une forte susceptibilité au développement

d'amylose rénale, indiquant ainsi que, chez les patients atteints de FMF, la prédisposition à cette complication particulière liée à l'allèle *SAA1α* peut être considérée comme un trait récessif.

Par ailleurs, la distribution du génotype *SAA1α/α* semble être homogène entre les différents génotypes du *MEFV*, bien que la majorité des patients homozygotes pour p.M694I sont en même temps homozygotes pour *SAA1α* (73%). Cependant, aucun patient sans amylose n'était porteur de ces deux génotypes en même temps. Ceci pourrait être dû à l'effectif faible des patients sans amylose et en particulier aux homozygotes pour p.M694I. Ainsi, il n'est pas possible d'estimer le risque de développer l'amylose AA pour les patients à la fois homozygotes pour ces deux allèles. Chez les autres groupes ethniques, la présence du génotype *SAA1α/α* est surtout observée avec le génotype M694V/M694V. Chez les patients Juifs avec amylose AA, la proportion des homozygotes à la fois pour p.M694V et *SAA1α* (30,6%) est plus élevée par rapport à la proportion des patients homozygotes pour *SAA1α* et porteurs d'un génotype autre que le M694V/M694V (53,8%), mais cette différence n'était pas statistiquement significative ( $p= 0,219$ ) (Gershoni-Baruch *et al.*, 2003a). Cependant, chez les patients Arméniens (11 patients), tous les porteurs du génotype M694V/M694V étaient en même temps homozygotes pour *SAA1α* (Cazeneuve *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que le risque de développer la complication rénale était augmenté chez les patients Turques porteurs en même temps de M694V/M694V et de *SAA1α/α* (2,5 fois), par rapport à ces deux facteurs pris séparément (Delibaş *et al.*, 2005).

Les mécanismes par lesquels le génotype *SAA1α /α* prédispose à l'amylose rénale n'est pas clair. De nombreuses hypothèses ont été proposées : 1) le taux plasmatique de SAA pourrait être plus élevé chez les patients porteurs du génotype *SAA1α/α* que chez ceux qui sont porteurs d'un autre génotype *SAA1*. 2) la forte susceptibilité du génotype *SAA1α/α* à l'amylose secondaire pourrait résulter d'une plus grande absorption par les macrophages de l'isoforme *SAA1α*, par rapport à celle des isoformes  $\beta$  et  $\gamma$ . 3) l'isoforme *SAA1α* pourrait également avoir un potentiel intrinsèque élevé favorisant la fibrillogénèse, comparé à celui des isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  (Cazeneuve *et al.*, 2000). Enfin, il a été suggéré qu'il s'agit de l'alanine en position 57, partagée par les allèles  $\alpha$  : 2995T-3010C (Val52-Ala57) et  $\gamma$  : 2995C-3010C (Ala52-Ala57), qui contribuent à l'amylose chez les individus porteurs du génotype *SAA1α/α* ou  $\gamma/\gamma$  (van der Hilst, 2011).

**Tableau XIII :** Liste des études incluses étudiant les génotypes du gène *MEFV* et les haplotypes du gène *SAA1* associés au risque de développement d'amylose secondaire à la FMF.

	Gène <i>MEFV</i>		Gène <i>SAA1</i>		Risque associé à l'interaction entre ces deux génotypes	Références
	Mutation	Risque de développement d'amylose AA	Mutation	Risque de développement d'amylose AA		
Algérie	M694I	4,375	SAA1 ( $\alpha/\alpha$ )	8,67	/	/
Arménie	M694V	6,8	SAA1 ( $\alpha/\alpha$ )	/	/	(Cazeneuve <i>et al.</i> , 2000)
Turquie	M694V	1,44	SAA1 ( $\alpha/\alpha$ )	2,4 à 4,86	x2, 5	(Delibaş <i>et al.</i> , 2005)
Chez les juifs	M694V	4,27	SAA1 ( $\alpha/\alpha$ )	2,43	/	(Gershoni-Baruch <i>et al.</i> , 2003)

# **Conclusion**

La variabilité de l'expression clinique du phénotype de la FMF est une caractéristique commune à de nombreux troubles génétiques. En théorie, ce phénomène peut résulter d'une hétérogénéité allélique et/ou de l'influence d'autres facteurs génétiques ou environnementaux.

Au terme de ce travail, nous pouvons affirmer que l'incidence de l'homozygotie pour la mutation p.M694I et de l'haplotype SAA1 ( $\alpha/\alpha$ ) sur la survenue d'amylose rénale AA secondaire à la FMF n'est plus négligeable chez les patients Algériens atteints de FMF.

Bien que les groupes étudiés soient relativement peu nombreux, les observations obtenues sont valables et conformes aux conclusions d'autres publications récentes. Sur la base des données disponibles, en vue la prévention de l'amylose, le diagnostic précoce et le traitement à la colchicine doivent être la règle d'or pour tout patient atteint de FMF, en particulier les patients porteurs de la mutation p.M694I à l'état homozygote.

Il est à signaler que l'influence de la mutation p.M694I sur le développement et la sévérité des autres symptômes liés à la FMF a été peu étudiée à ce jour. Au vu de la prévalence de ce variant dans la population Algérienne, une telle étude semble s'imposer comme suite logique au présent travail.

Enfin, d'autres études sont nécessaires afin d'élucider le lien entre les mutations du gène *MEFV*; les haplotypes du gène *SAA1* et le développement d'amylose AA. Le polymorphisme -13C/T en région promotrice du gène *SAA1* a notamment été associé à l'amylose rénale chez des patients Japonais atteints de FMF et de polyarthrite rhumatoïde. L'exploration de ce variant dans la population FMF Algérienne n'a à ce jour pas été conduite et mériterait également de faire l'objet d'une étude ultérieure.

## **Références bibliographiques**

Afonina, I.S., Müller, C., Martin, S.J., Beyaert, R., 2015. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity* 42, 991-1004.

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. *European Journal of Medical Genetics* 60, 149-153.

Akar, N., Hasipek, M., Akar, E., Ekim, M., Yatçinkaya, F., Clakar, N., 2003. Serum amyloid A1 and tumor necrosis factor-alpha alleles in Turkish Familial Mediterranean Fever patients with and without amyloidosis. *Amyloid* 10, 12-16.

Akar, S., Yuksel, F., Tunca, M., Soysal, O., Solmaz, D., Gerdan, V., Celik, A., Sen, G., Onen, F., Akkoc, N., 2012. Familial Mediterranean fever: risk factors, causes of death, and prognosis in the colchicine era. *Medicine (Baltimore)* 91, 131-136.

Akpolat, T., Özkaya, O., Özen, S., 2012. Homozygous M694V as a risk factor for amyloidosis in Turkish FMF patients. *Gene* 492, 285-289.

Ameziane, N., 2006. *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*.

Atoyan, S., Hayrapetyan, H., Sarkisian, T., Ben-Chetrit, E., 2016. MEFV and SAA1 genotype associations with clinical features of familial Mediterranean fever and amyloidosis in Armenia. *Clin Exp Rheumatol* 34, 72-76.

Audebert, C., Hot, D., Lemoine, Y., Caboche, S., 2014. [High-throughput sequencing: towards a genome-based diagnosis in infectious diseases]. *Med Sci (Paris)* 30, 1144-1151.

Baba, S., Masago, S.A., Takahashi, T., Kasama, T., Sugimura, H., Tsugane, S., Tsutsui, Y., Shirasawa, H., 1995. A novel allelic variant of serum amyloid A, SAA1 gamma: genomic evidence, evolution, frequency, and implication as a risk factor for reactive systemic AA-amyloidosis. *Hum Mol Genet* 4, 1083-1087.

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

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

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

Bernot, A., da Silva, C., Petit, J.L., Cruaud, C., Caloustian, C., Castet, V., Ahmed-Arab, M., Dross, C., Dupont, M., Cattan, D., Smaoui, N., Dodé, C., Pêcheux, C., Nédelec, B., Medaxian, J., Rozenbaum, M., Rosner, I., Delpech, M., Grateau, G., Demaille, J., Weissenbach, J., Touitou, I., 1998. Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 7, 1317-1325.

Bienvenu, T., Meunier, C., Bousquet, S., Chiron, S., Richard, L., Gautheret-Dejean, A., Rouselle, J.F., Feldmann, D., 1999. Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annales de Biologie Clinique* 57, 77-84.

Blank, N., Hegenbart, U., Lohse, P., Beimler, J., Rocken, C., Ho, A.D., Lorenz, H.M., Schonland, S.O., 2015. Risk factors for AA amyloidosis in Germany. *Amyloid* 22, 1-7.

Bogaert, D., Dullaers, M., Kuehn, H., Leroy, B., Niemela, J., Wilde, H., Schryver, S., De Bruyne, M., Coppieters, F., Lambrecht, B., De Baets, F., Rosenzweig, S., De Baere, E., Haerynck, F., 2017. Early-onset primary antibody deficiency resembling common variable immunodeficiency challenges the diagnosis of Wiedeman-Steiner and Roifman syndromes. *Scientific Reports* 7.

Booth, D.R., Booth, S.E., Gillmore, J.D., Hawkins, P.N., Pepys, M.B., 1998. SAA1 alleles as risk factors in reactive systemic AA amyloidosis. *Amyloid* 5, 262-265.

Brunger, A.F., Nienhuis, H.L.A., Bijzet, J., Hazenberg, B.P.C., 2020. Causes of AA amyloidosis: a systematic review. *Amyloid* 27, 1-12.

Cazeneuve, C., Ajrapetyan, H., Papin, S., Roudot-Thoraval, F., Geneviève, D., Mndjoyan, E., Papazian, M., Sarkisian, A., Babloyan, A., Boissier, B., Duquesnoy, P., Kouyoumdjian, J.-C., Girodon-Boulandet, E., Grateau, G., Sarkisian, T., Amselem, S., 2000. Identification of MEFV-Independent Modifying Genetic Factors for Familial Mediterranean Fever. *The American Journal of Human Genetics* 67, 1136-1143.

Cazeneuve, C., Sarkisian, T., Pecheux, C., Dervichian, M., Nedelec, B., Reinert, P., Ayvazyan, A., Kouyoumdjian, J.C., Ajrapetyan, H., Delpech, M., Goossens, M., Dode, C., Grateau, G., Amselem, S., 1999. MEFV-Gene analysis in armenian patients with Familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 65, 88-97.

Ceciliani, F., Giordano, A., Spagnolo, V., 2002. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett* 9, 211-223.

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.

Chae, J.J., Wood, G., Richard, K., Jaffe, H., Colburn, N.T., Masters, S.L., Gumucio, D.L., Shoham, N.G., Kastner, D.L., 2008. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is

cleaved by caspase-1 and activates NF-kappaB through its N-terminal fragment. *Blood* 112, 1794-1803.

Cuchard, P., Cuchard, R., Rotman, S., Burnier, M., Gauthier, T., 2012. [Renal amyloidosis]. *Rev Med Suisse* 8, 446-451.

Daniel, W.W., Cross, C.L., 2018. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. Wiley.

De Buck, M., Gouwy, M., Wang, J.M., Van Snick, J., Opdenakker, G., Struyf, S., Van Damme, J., 2016. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *Curr Med Chem* 23, 1725-1755.

Delibas, A., Öner, A., Balci, B., Demircin, G., Bülbül, M., Bek, K., Erdoğan, Ö., Baysun, S., Yilmaz, E., 2005. Genetic Risk Factors of Amyloidogenesis in Familial Mediterranean Fever. *Am J Nephrol* 25, 434-440.

Diaz, A., Hu, C., Kastner, D.L., Schaner, P., Reginato, A.M., Richards, N., Gumucio, D.L., 2004. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 50, 3679-3689.

Dick, M.S., Sborgi, L., Rühl, S., Hiller, S., Broz, P., 2016. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nature Communications* 7, 11929.

Düzgün, N.e., 2011. *Clinical Presentation of Amyloid A Amyloidosis, Amyloidosis-An Insight to Disease of Systems and Novel Therapies*. IntechOpen.

Eisenberg, S., Aksentijevich, I., Deng, Z., Kastner, D.L., Matzner, Y., 1998. Diagnosis of Familial Mediterranean Fever by a Molecular Genetics Method. *Annals of Internal Medicine* 129, 539-542.

El-Shanti, H., Majeed, H.A., El-Khateeb, M., 2006. Familial mediterranean fever in Arabs. *Lancet* 367, 1016-1024.

Elsaid, M., Chalhoub, N., Ben-Omran, T., Kumar, P., Kamel, H., Ibrahim, K., Mohamoud, Y., Al-Dous, E., Al-Azwani, I., Malek, J., Suhre, K., Ross, M., Abdelaleem, A., 2016. Mutation in non-coding RNA, RNU12 causes early-onset cerebellar ataxia. *Annals of neurology* 81.

Fisher, R.A., 1922. On the Interpretation of  $\chi^2$  from Contingency Tables, and the Calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 85, 87-94.

French, F.M.F.C., 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet* 17, 25-31.

Gabay, C., Kushner, I., 1999. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine* 340, 448-454.

Gauthier, M., 2007. Simulation of polymer translocation through small channels: A molecular dynamics study and a new Monte Carlo approach.

Gershoni-Baruch, R., Brik, R., Zacks, N., Shinawi, M., Lidar, M., Livneh, A., 2003. The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis & Rheumatism* 48, 1149-1155.

Grateau, G., 2000. The relation between familial Mediterranean fever and amyloidosis. *Current Opinion in Rheumatology* 12.

Grateau, G., Jéru, I., Rouaghe, S., Cazeneuve, C., Ravet, N., Duquesnoy, P., Cuisset, L., Dodé, C., Delpech, M., Amselem, S., 2005. Amyloidosis and auto-inflammatory syndromes. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 57-65.

Grossman, C., Kassel, Y., Livneh, A., Ben-Zvi, I., 2019. Familial Mediterranean fever (FMF) phenotype in patients homozygous to the MEFV M694V mutation. *European Journal of Medical Genetics* 62, 103532.

Gupta, N., 2019. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol* 36, 116-117.

Harapas, C.R., Steiner, A., Davidson, S., Masters, S.L., 2018. An Update on Autoinflammatory Diseases: Inflammasomopathies. *Curr Rheumatol Rep* 20, 40.

Hashkes, P., Laxer, R., Simon, A., 2019. *Textbook of Autoinflammation*.

Heilig, R., Broz, P., 2018. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur J Immunol* 48, 230-238.

Jamilloux, Y., Bourdonnay, E., Gerfaud-Valentin, M., Py, B.F., Lefeuvre, L., Barba, T., Broussolle, C., Henry, T., Sève, P., 2018a. [Interleukin-1, inflammasome and autoinflammatory diseases]. *Rev Med Interne* 39, 233-239.

Jamilloux, Y., Magnotti, F., Belot, A., Henry, T., 2018b. The pyrin inflammasome: from sensing RhoA GTPases-inhibiting toxins to triggering autoinflammatory syndromes. *Pathog Dis* 76.

Jensen, L.E., Hiney, M.P., Shields, D.C., Uhlar, C.M., Lindsay, A.J., Whitehead, A.S., 1997. Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *The Journal of Immunology* 158, 384.

Jensen, L.E., Whitehead, A.S., 1998. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochemical Journal* 334, 489-503.

Jéru, I., Amselem, S., 2011. Inflammasome et interleukine 1. *La Revue de Médecine Interne* 32, 218-224.

- Karim, K., 2019. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications.
- Kluve-Beckerman, B., Drumm, M.L., Benson, M.D., 1991. Nonexpression of the human serum amyloid A three (SAA3) gene. *DNA Cell Biol* 10, 651-661.
- Krainer, J., Siebenhandl, S., Weinhäusel, A., 2020. Systemic autoinflammatory diseases. *J Autoimmun* 109, 102421.
- Lachmann, H.J., Goodman, H.J.B., Gilbertson, J.A., Gallimore, J.R., Sabin, C.A., Gillmore, J.D., Hawkins, P.N., 2007. Natural History and Outcome in Systemic AA Amyloidosis. *New England Journal of Medicine* 356, 2361-2371.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarène, P., Bogard, M., 2008. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 23, 260-279.
- Lamoril, J., Bogard, C., Pouchot, J., 2001. La maladie périodique ou fièvre méditerranéenne familiale (FMF). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 16, 7-14.
- Larson, M.A., Wei, S.H., Weber, A., Weber, A.T., McDonald, T.L., 2003. Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 1030-1037.
- Lidar, M., Yonath, H., Shechter, N., Sikron, F., Sadetzki, S., Langevitz, P., Livneh, A., Pras, E., 2012. Incomplete response to colchicine in M694V homozygote FMF patients. *Autoimmun Rev* 12, 72-76.
- Livneh, A., Langevitz, P., Zemer, D., Zaks, N., Kees, S., Lidar, T., Migdal, A., Padeh, S., Pras, M., 1997. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 40, 1879-1885.
- Martorana, D., Bonatti, F., Mozzoni, P., Vaglio, A., Percesepe, A., 2017. Monogenic Autoinflammatory Diseases with Mendelian Inheritance: Genes, Mutations, and Genotype/Phenotype Correlations. *Front Immunol* 8, 344.
- McDermott, M.F., Aksentijevich, I., 2002. The autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2, 511-516.
- 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., Mégarbané, A., 2004. Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAA1 and MICA polymorphisms effects. *BMC Med Genet* 5, 4-4.

Merlini, G., Bellotti, V., 2003. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *New England Journal of Medicine* 349, 583-596.

Migita, K., Agematsu, K., Masumoto, J., Ida, H., Honda, S., Jiuchi, Y., Izumi, Y., Maeda, Y., Uehara, R., Nakamura, Y., Koga, T., Kawakami, A., Nakashima, M., Fujieda, Y., Nonaka, F., Eguchi, K., Furukawa, H., Nakamura, T., Nakamura, M., Yasunami, M., 2013. The contribution of SAA1 polymorphisms to Familial Mediterranean fever susceptibility in the Japanese population. *PloS one* 8, e55227-e55227.

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, 1215-1215.

Mimouni, A., Magal, N., Stoffman, N., Shohat, T., Minasian, A., Krasnov, M., Halpern, G.J., Rotter, J.I., Fischel-Ghodsian, N., Danon, Y.L., Shohat, M., 2000. Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. *Pediatrics* 105, E70.

Moriguchi, M., Kaneko, H., Terai, C., Koseki, Y., Kajiyama, H., Inada, S., Kitamura, Y., Kamatani, N., 2005. Relative transcriptional activities of SAA1 promoters polymorphic at position -13(T/C): Potential association between increased transcription and amyloidosis. *Amyloid* 12, 26-32.

Moriguchi, M., Terai, C., Kaneko, H., Koseki, Y., Kajiyama, H., Uesato, M., Inada, S., Kamatani, N., 2001a. A novel single-nucleotide polymorphism at the 5'-flanking region of SAA1 associated with risk of type AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 44, 1266-1272.

Moriguchi, M., Terai, C., Koseki, Y., Kaneko, H., Uesato, M., Nishikawa, T., Kamatani, N., 2001b. Genotypes at SAA1 locus correlate with the clinical severity of AA-amyloidosis. *Amyloid* 8, 115-120.

Moriguchi, M., Terai, C., Koseki, Y., Uesato, M., Nakajima, A., Inada, S., Nishinarita, M., Uchida, S., Nakajima, A., Kim, S.Y., Chen, C.L., Kamatani, N., 1999. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 105, 360-366.

- Mukhin, N.A., Kozlovskaya, L.V., Bogdanova, M.V., Rameev, V.V., Moiseev, S.V., Simonyan, A., 2015. Predictors of AA amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 35, 1257-1261.
- Nakamura, T., Baba, S., Yamamura, Y., Tsuruta, T., Matsubara, S., Tomoda, K., Tsukano, M., 2000. Combined treatment with cyclophosphamide and prednisolone is effective for secondary amyloidosis with SAA1 $\gamma/\gamma$  genotype in a patient with rheumatoid arthritis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 10, 160-164.
- Nakayama, M., Oda, H., Nakagawa, K., Yasumi, T., Kawai, T., Izawa, K., Nishikomori, R., Heike, T., Ohara, O., 2016. Accurate clinical genetic testing for autoinflammatory diseases using the next-generation sequencing platform MiSeq. *Biochemistry and Biophysics Reports* 9.
- Obici, L., Merlini, G., 2012. Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. *Autoimmunity Reviews* 12, 14-17.
- Omoyinmi, E., Standing, A., Keylock, A., Price-Kuehne, F., Gomes, S., Rowczenio, D., Nanthapaisal, S., Cullup, T., Nyanhete, R., Ashton, E., Murphy, C., Clarke, M., Ahlfors, H., Jenkins, L., Gilmour, K., Eleftheriou, D., Lachmann, H., Hawkins, P., Klein, N., Brogan, P., 2017. Clinical impact of a targeted next-generation sequencing gene panel for autoinflammation and vasculitis. *PLoS ONE* 12.
- Onen, F., 2006. Familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 26, 489-496.
- Özdel, S., Özçakar, Z.B., Kunt, S., Elhan, A.H., Yalçınkaya, F., 2016. Late-onset disease is associated with a mild phenotype in children with familial Mediterranean fever. *Clin Rheumatol* 35, 1837-1840.
- Ozturk, C., Halicioğlu, O., Coker, I., Gulez, N., Sutçuoğlu, S., Karaca, N., Aksu, G., Kutukçuler, N., 2012. Association of clinical and genetical features in FMF with focus on MEFV strip assay sensitivity in 452 children from western Anatolia, Turkey. *Clin Rheumatol* 31, 493-501.
- 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.
- Pras, M., 1998. Familial Mediterranean Fever: From the Clinical Syndrome to the Cloning of the Pyrin Gene: EDITORIAL REVIEW. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 27, 92-97.

Ray, B., Ray, A., 1997. Induction of serum amyloid A (SAA) gene by SAA-activating sequence-binding factor (SAF) in monocyte/macrophage cells - Evidence for a functional synergy between SAF and Sp1. *The Journal of biological chemistry* 272, 28948-28953.

Rumjon, A., Coats, T., Javaid, M.M., 2012. Review of eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 37-43.

Rusmini, M., Federici, S., Caroli, F., Grossi, A., Baldi, M., Obici, L., Insalaco, A., Tommasini, A., Caorsi, R., Gallo, E., Olivieri, A., Marzano, A., Coviello, D., Ravazzolo, R., Martini, A., Gattorno, M., Ceccherini, I., 2015. Next-generation sequencing and its initial applications for molecular diagnosis of systemic auto-inflammatory diseases. *Annals of the rheumatic diseases* 75.

Samuels, J., Ozen, S., 2006. Familial Mediterranean fever and the other autoinflammatory syndromes: evaluation of the patient with recurrent fever. *Curr Opin Rheumatol* 18, 108-117.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Sarı, İ., Birlik, M., Kasifoğlu, T., 2014. Familial Mediterranean fever: An updated review. *Eur J Rheumatol* 1, 21-33.

Schnappauf, O., Chae, J.J., Kastner, D.L., Aksentijevich, I., 2019. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Front Immunol* 10, 1745.

Sellar, G.C., Jordan, S.A., Bickmore, W.A., Fantes, J.A., van Heyningen, V., Whitehead, A.S., 1994. The Human Serum Amyloid A Protein (SAA) Superfamily Gene Cluster: Mapping to Chromosome 11p15.1 by Physical and Genetic Linkage Analysis. *Genomics* 19, 221-227.

Shendure, J., Ji, H., 2008. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26: 1135-1145. *Nature biotechnology* 26, 1135-1145.

Shinar, Y., Obici, L., Aksentijevich, I., Bennetts, B., Austrup, F., Ceccherini, I., Costa, J.M., De Leener, A., Gattorno, M., Kania, U., Kone-Paut, I., Lezer, S., Livneh, A., Moix, I., Nishikomori, R., Ozen, S., Phylactou, L., Risom, L., Rowczenio, D., Sarkisian, T., van Gijn, M.E., Witsch-Baumgartner, M., Morris, M., Hoffman, H.M., Touitou, I., 2012. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Ann Rheum Dis* 71, 1599-1605.

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.

Soylemezoglu, O., Arga, M., Fidan, K., Gonen, S., Emeksiz, H.C., Hasanoglu, E., Buyan, N., 2010. Unresponsiveness to colchicine therapy in patients with familial Mediterranean fever homozygous for the M694V mutation. *J Rheumatol* 37, 182-189.

Stojanovic, K.S., Georjin-Lavialle, S., Grateau, G., 2017. [AA amyloidosis]. *Nephrol Ther* 13, 258-264.

Sun, L., Ye, R.D., 2016. Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism. *Gene* 583, 48-57.

Szumilas, M., 2010. Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 19, 227-229.

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.

Thorn, C.F., Whitehead, A.S., 2002. Differential Glucocorticoid Enhancement of the Cytokine-Driven Transcriptional Activation of the Human Acute Phase Serum Amyloid A Genes, &SAA1& and &SAA2&. *The Journal of Immunology* 169, 399.

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

Touitou, I., Aksentijevich, I., 2019. Genetic Approach to the Diagnosis of Autoinflammatory Diseases, pp. 225-237.

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.

Uhlir, C.M., Burgess, C.J., Sharp, P.M., Whitehead, A.S., 1994. Evolution of the Serum Amyloid A (SAA) Protein Superfamily. *Genomics* 19, 228-235.

Uhlir, C.M., Whitehead, A.S., 1999. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 265, 501-523.

Vahdat, A., 2019. The Importance of Macrophages, Lipid Membranes and Seeding in Experimental AA Amyloidosis.

Vaidya, K., Arnott, C., Martínez, G.J., Ng, B., McCormack, S., Sullivan, D.R., Celermajer, D.S., Patel, S., 2018. Colchicine Therapy and Plaque Stabilization in Patients With Acute Coronary Syndrome: A CT Coronary Angiography Study. *JACC: Cardiovascular Imaging* 11, 305-316.

Vaidya, K., Martínez, G., Patel, S., 2019. The Role of Colchicine in Acute Coronary Syndromes. *Clin Ther* 41, 11-20.

van der Hilst, J.C., 2011. Recent insights into the pathogenesis of type AA amyloidosis. *ScientificWorldJournal* 11, 641-650.

van der Hilst, J.C., Simon, A., Drenth, J.P., 2005. Hereditary periodic fever and reactive amyloidosis. *Clin Exp Med* 5, 87-98.

van der Hilst, J.C.H., Yamada, T., Op den Camp, H.J.M., van der Meer, J.W.M., Drenth, J.P.H., Simon, A., 2008. Increased susceptibility of serum amyloid A 1.1 to degradation by MMP-1: potential explanation for higher risk of type AA amyloidosis. *Rheumatology* 47, 1651-1654.

Van Gijn, M.E., Ceccherini, I., Shinar, Y., Carbo, E.C., Slofstra, M., Arostegui, J.I., Sarrabay, G., Rowczenio, D., Omoyimi, E., Balci-Peynircioglu, B., Hoffman, H.M., Milhavet, F., Swertz, M.A., Touitou, I., 2018. New workflow for classification of genetic variants' pathogenicity applied to hereditary recurrent fevers by the International Study Group for Systemic Autoinflammatory Diseases (INSAID). *J Med Genet* 55, 530-537.

Van Gorp, H., Kuchmiy, A., Van Hauwermeiren, F., Lamkanfi, M., 2014. NOD-like receptors interfacing the immune and reproductive systems. *The FEBS Journal* 281, 4568-4582.

Van Gorp, H., Saavedra, P.H.V., de Vasconcelos, N.M., Van Opdenbosch, N., Vande Walle, L., Matusiak, M., Prencipe, G., Insalaco, A., Van Hauwermeiren, F., Demon, D., Bogaert, D.J., Dullaers, M., De Baere, E., Hochepped, T., Dehoorne, J., Vermaelen, K.Y., Haerynck, F., De Benedetti, F., Lamkanfi, M., 2016. Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 14384-14389.

Vassias, I., 2012. Principe de l'amplification en chaîne par polymérase.

Wilson, M., Abou-Elalla, A.A., Zakaria, M.T., Marzouk, H., Fayed, H.L., Hanna, M.O., 2016. Serum Amyloid A Type 1 Gene Polymorphism in Egyptian Children with Familial Mediterranean Fever. *Pathobiology* 83, 295-300.

Yalçınkaya, F., Özen, S., Özçakar, Z.B., Aktay, N., Çakar, N., Düzova, A., Kasapçopur, Ö., Elhan, A.H., Doğanay, B., Ekim, M., Kara, N., Uncu, N., Bakkaloğlu, A., 2009. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology* 48, 395-398.

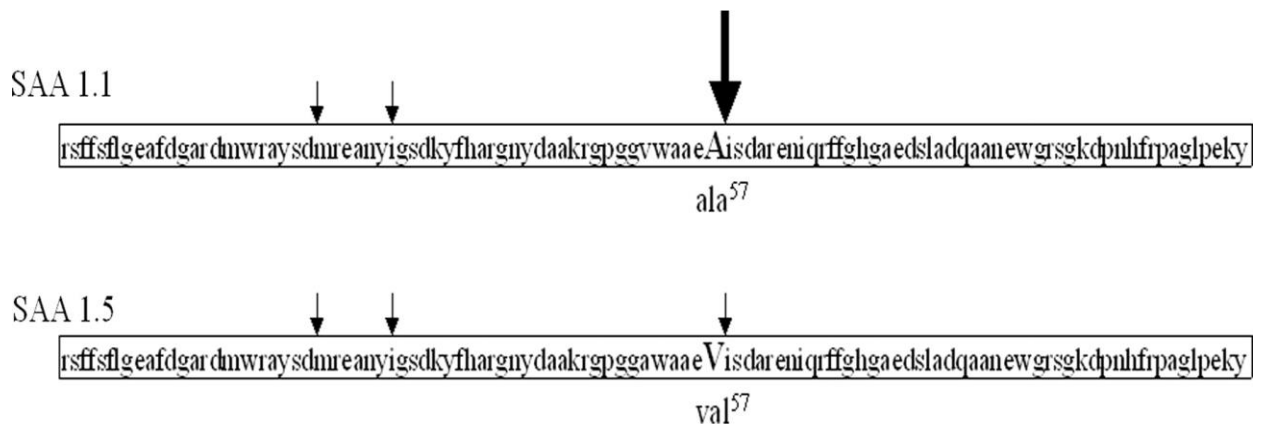
Yamada, T., 2004. Genetic Effects on Serum Concentrations of Serum Amyloid A Protein. *Clinical Chemistry* 50, 978-979.

Yigit, S., Bağcı, H., Ozkaya, O., Ozdamar, K., Cengiz, K., Akpolat, T., 2008. MEFV mutations in patients with familial Mediterranean fever in the Black Sea region of Turkey: Samsun experience [corrected]. *J Rheumatol* 35, 106-113.

Yilmaz, E., Balci, B., Kutlay, S., Ozen, S., Ertürk, S., Oner, A., Beşbaş, N., Bakkaloğlu, A., 2003. Analysis of the modifying effects of SAA1, SAA2 and TNF-alpha gene polymorphisms on development of amyloidosis in FMF patients. *Turk J Pediatr* 45, 198-202.

Zhang, Y., Zhang, J., Sheng, H., Li, H., Wang, R., 2019. Chapter Two - Acute phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases, in: Makowski, G.S. (Ed.), *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 25-80.

# **Annexes**



**Annexe 1 :** Représentation schématique de la dégradation des SAA1.1 et SAA1.5 par le MMP-1. (van der Hilst et al., 2008)

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
316	none	1	BanI	316	GCCAATTACA TCGGCTCAGA CAAATACTTC CATGCTCGGG GGAACATGA TGCTGCCAAA AGGGGACCTG GGGGTGTCTG GGCTGCAGAA GCGATCACGT AACTGGAGCT CCTGGGACGT TAGGGCTGGG TGAGCAGAGC TTGCCTGCCT TGGACAGTCA GGAGGGAGAC GAGCTCCTTG TGGAGAAGTT AGAGGCTGCG GCCCCTCCTC CTCTTGCCCT CTCTCTGCCT CTGTGCTCAG TGTGAGGTCT GAGTGGATGG TAGGAGTGAG TGATTCCTCA TCCTCCCTCT CTGGGTGCTG TTCATCCAGC CTAGGG
176	BanI	342	none	517	GTGCCCAGTG TTTTCATCCC TCCTTCCTTG GCCTTCTGG GCTCCTCTCT GAGCCCTCCC TTGGAACAGG GAGAATGGGA GGGTGGGCTA TTGCTCACTG GCCTGATTAT TAAICTCCTT CTGCTGCTGCC TTGATTACAG CGATGCCAGA GAGAATATCC AGAGATTCTT TGGCCA
25	BanI	317	BanI	341	GTGCCCAGCC TGGCTGAATG GGGTG

**Annexe 2:** Séquences des fragments obtenus après digestion enzymatique du gène SAA1 ( $\alpha$  / $\alpha$ ) par BanI.

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
243	BanI	74	BanI	316	GTGCCTGGGC TGCAGAAGTG ATCACGTAAC TGGAGCTCCT GGGACGTTAG GGCTGGGTGA GCAGAGCTTG CCTGCCTTGG ACAGTCAGGA GGGAGACGAG CTCCTTGTGG AGAAGTTAGA GGCTGCGGCC CCTCCTCCTC TTGCCCTCTC TCTGCCTCTG TGCTCAGTGT GAGGTCTGAG TGGATGGTAG GAGTGAGTGA TTCCTCATCC TCCCTCTCTG GGTGCTGTTC ATCCAGCCTA GGG
176	BanI	342	none	517	GTGCCCAGTG TTTTCATCCC TCCTTCCTTG GCCTTCTGG GCTCCTCTCT GAGCCCTCCC TTGGAACAGG GAGAATGGGA GGGTGGGCTA TTGCTCACTG GCCTGATTAT TAATCTCCTT CTTGCCTGCC TTGATTACAG CGATGCCAGA GAGAATATCC AGAGATTCTT TGGCCA
73	none	1	BanI	73	GCCAATTACA TCGGCTCAGA CAAATACTTC CATGCTCGGG GGA ACTATGA TGCTGCCAAAAGGGGACCTG GGG
25	BanI	317	BanI	341	GTGCCCAGCC TGGCTGAATG GGGTG

**Annexe 3 :** Séquences des fragments obtenus après digestion enzymatique du gène SAA1 ( $\beta/\beta$ ) par BanI.

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
425	BclI	93	none	517	GATCACGTAA CTGGAGCTCC TGGGACGTTA GGGCTGGGTG AGCAGAGCTT GCCTGCCTTG GACAGTCAGG AGGGAGACGA GCTCCTTGTG GAGAAGTTAG AGGCTGCGGC CCTCCTCCT CTTGCCCTCT CTCTGCCTCT GTGCTCAGTG TGAGGTCTGA GTGGATGGTA GGAGTGAGTG ATTCTCATC CTCCTCTCT GGGTGCTGTT CATCCAGCCT AGGGGTGCCC AGCCTGGCTG AATGGGGTGG TGCCCAGTGT TTTTCATCCCT CCTTCCTTGG CCTTCTGGG CTCCTCTCTG AGCCCTCCCT TGGAACAGGG AGAATGGGAG GGTGGGCTAT TGCTCACTGG CCTGATTATT AATCTCCTTC TTGCCTGCCT TGATTACAGC GATGCCAGAG AGAATATCCA GAGATTCTTT GGCCA
92	none	1	BclI	92	GCCAATTACA TCGGCTCAGA CAAATACTTC CATGCTCGGG GGA ACTATGA TGCTGCCAAAAGGGGACCTG GGGGTGCCTG GGCTGCAGAA GT

**Annexe 4 :** Séquences des fragments obtenus après digestion enzymatique du gène SAA1 ( $\beta/\beta$ ) par BclI.

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
243	BanI	74	BanI	316	GTGCCTGGGC TGCAGAAGCG ATCACGTAAC TGGAGCTCCT GGGACGTTAG GGCTGGGTGA GCAGAGCTTG CCTGCCTTGG ACAGTCAGGA GGGAGACGAG CTCCTTGTGG AGAAGTTAGA GGCTGCGGCC CCTCCTCCTC TTGCCCTCTC TCTGCCTCTG TGCTCAGTGT GAGGTCTGAG TGGATGGTAG GAGTGAGTGA TTCCTCATCC TCCCTCTCTG GGTGCTGTTC ATCCAGCCTA GGG
176	BanI	342	none	517	GTGCCCAGTG TTTTCATCCC TCCTTCCTTG GCCTTCTGG GCTCCTCTCT GAGCCCTCCC TTGGAACAGG GAGAATGGGA GGGTGGGCTA TTGCTCACTG GCCTGATTAT TAATCTCCTT CTTGCCTGCC TTGATTACAG CGATGCCAGA GAGAATATCC AGAGATTCTT TGGCCA
73	none	1	BanI	73	GCCAATTACA TCGGCTCAGA CAAATACTTC CATGCTCGGG GGA ACTATGA TGCTGCCAAAAGGGGACCTG GGG
25	BanI	317	BanI	341	GTGCCCAGCC TGGCTGAATG GGGTG

**Annexe 5 :** Séquences des fragments obtenus après digestion enzymatique du gène SAA1 ( $\gamma$ ) par BanI

**Annexe 6** : Répartition des génotypes au locus *SAA1* en fonction des génotypes du *MEFV*

	Génotype- <i>MEFV</i>	Génotypes au locus <i>SAA1</i>				
		$\alpha/\alpha$	$\alpha/\beta$	$\beta/\beta$	$\alpha/\gamma$	$\gamma/\beta$
Patients FMF avec amylose AA (n= 29)	<b>M694I/M694I</b>	11/15 (73, 33%)	2/15 (13, 33%)	0	2/15 (13, 33%)	0
	<b>M694V/M694V</b>	1/3 (33, 33%)	1/3 (33, 33%)	0	1 (33, 33%)	0
	<b>M694I/M694V</b>	2/2 (100%)	0	0	0	0
	<b>M694V/M680I</b>	0/2	0	0	2/2 (100%)	0
	<b>M694I/M680I</b>	1/1 (100%)	0	0	0	0
	<b>M680I/M680I</b>	1/1 (100%)	0	0	0	0
	<b>M694I/WT</b>	4/5 (80%)	1/5 (20%)	0	0	0
<b>Total (29)</b>	<b>20</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	
Patients FMF sans amylose AA (n= 20)	<b>M694I/M694I</b>	0/4	3/4 (75%)	1/4 (25%)	0	0
	<b>M694I/M694V</b>	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0	0	0
	<b>M694I/M680I</b>	2/5 (40%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	0	1/5 (20%)
	<b>M694V/M680I</b>	0	1/1 (100%)	0	0	0
	<b>M694I/WT</b>	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0	0	0
	<b>M694V/WT</b>	0	1/4 (25%)	2/4 (50%)	0	1/4 (25%)
	<b>A744S</b>	0	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0	0
<b>Total (20)</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	

## ملخص

حمى البحر الأبيض المتوسط العائلية هي مرض وراثي يتميز بنوبات متكررة من الحمى. يعتبر الداء النشواني من النوع AA أكثر مضاعفات حمى البحر المتوسط شدةً، و يصيب الكلى بشكل رئيسي.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم العوامل الوراثية المرتبطة بتطور داء النشواني الكلوي AA الثانوي الى FMF في مجموعة من المرضى الجزائريين. قمنا بتحليل الانماط الجينية لجينات *MEFV* و *SAA1* في 62 مريضاً يعانون من حمى المتوسط الفطرية و 13 شاهد سليم.

اعتمد التشخيص السريري على معايير تل هشومير. كشف تحليل النتائج التي تم الحصول عليها من دراسة الحالة و الشواهد هذه عن وجود ارتباط بين الانماط الجينية *I694 M / I694 M* و  $\alpha/\alpha1SAA$ . مع تطور الداء النشواني الكلوي ( $P < 0.05$ ).

اظهر تحليل انحدار اللوجستي لخطر الاصابة بداء النشواني زيادة قدرها 4,375 ضعفاً للمرضى الذين يعانون من النمط الجيني *I694 M / I694 M* وزيادة قدرها 8,67 ضعفاً للمرضى الذين يعانون من الانماط الجينية  $\alpha/\alpha1SAA$  وبالتالي يرتبط الداء النشواني AA ارتباطاً وثيقاً بالانماط الجينية لجينات *MEFV* و *SAA1*.

**الكلمات المفتاحية:** داء النشواني AA، حمى البحر الأبيض المتوسط العائلية، جين *MEFV*، تعدد الأشكال الجيني *SAA1*.

## Résumé :

La fièvre méditerranéenne familiale (FMF) est une maladie héréditaire caractérisée par des poussées récurrentes de fièvre. La complication la plus sévère de la FMF est l'amylose de type AA touchant principalement les reins. L'objectif de l'étude est d'évaluer les facteurs génétiques liés au développement de l'amylose rénale AA secondaire à la FMF dans une cohorte de patients algériens. Nous avons analysé les génotypes des gènes *MEFV* et *SAA1* chez 62 patients atteints de FMF et 13 témoins sains. Le diagnostic clinique a été basé sur les critères de Tel-Hashomer. L'analyse des résultats obtenus à partir de cette étude cas-témoins a révélé une association des génotypes M694I/M694I et *SAA1* $\alpha/\alpha$  avec le développement de l'amylose rénale AA ( $p < 0.05$ ). L'analyse de régression logistique pour le risque de développer l'amylose a révélé une augmentation de 4,375 fois pour les patients porteurs du génotype M694I/M694I et une augmentation de 8,67 fois pour les patients présentant le génotype *SAA1* $\alpha/\alpha$ . Ainsi, l'amylose AA est fortement associée aux génotypes dans les loci *MEFV* et *SAA1*.

**Mots clés :** Amylose AA, Fièvre Méditerranéenne Familiale, Gène *MEFV*, Polymorphismes du gène *SAA1*.

## Abstract:

Familial Mediterranean Fever (FMF) is a periodic hereditary disease characterized by recurrent bouts of fever. The most severe complication of FMF is amyloidosis affecting mainly kidneys. The objective of this study is to evaluate the genetic factors related to the development of AA renal amyloidosis secondary to FMF in a group of Algerian patients. We studied the genotypes of the *MEFV* and *SAA1* genes in 62 FMF patients and 13 healthy controls. Clinical diagnosis was based on Tel-Hashomer criteria. Analysis of the results obtained from a retrospective study showed an association between the M694I/M694I and *SAA1* $\alpha/\alpha$  genotypes and the development of renal AA amyloidosis ( $p < 0.05$ ). Logistic regression analysis for the risk of developing amyloidosis revealed a 4,375-fold increase for patients with the M694I/M694I genotype and an 8,67-fold increase for patients with the *SAA1* $\alpha/\alpha$  genotype. Therefore, AA amyloidosis seems strongly associated with the *MEFV* and *SAA1* genotypes.

**Key words:** AA amyloidosis, Familial Mediterranean Fever, *MEFV* gene, *SAA1* polymorphisms.