



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de fin d'études

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Pathologie moléculaire de la fièvre méditerranéenne
familiale au CHU Hassan II à propos de 20 cas**

Présenté par : Hjiej Niama

Encadré par : Pr. El Farricha Omar

Dr. Sayel Hanane

Soutenu le : 5 juillet 2022

Devant le jury composé de :

- **Pr. El Farricha Omar**
- **Dr. Sayel Hanane**
- **Pr. Bencheikh Rachid**

**Stage effectué au : Laboratoire de Génétique Médicale et Oncogénétique Centre
Hospitalier Hassan II universitaire de FES**

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à présenter mes sincères remerciements à ceux qui m'ont beaucoup appris au cours de ce stage, et à ceux qui ont eu la gentillesse de m'aider par leurs présences et leurs conseils.

Je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce projet.

J'adresse mes vifs remerciements à mes deux encadrants, M. El Farricha Omar et Mmd. Sayel Hanane pour leur aide et encadrement durant toute la période de travail sur ce projet de fin d'étude, pour leurs écoutes et leurs disponibilités. Leurs suivis et leurs précieuses consignes m'ont été d'une grande utilité afin d'aboutir aux résultats escomptés.

Je veux également rendre hommage au corps professoral de la faculté des sciences et techniques de Fès.

Finalement, je remercie les membres du jury pour m'avoir honorée en acceptant d'évaluer et de juger ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, pour leurs sacrifices, amour, soutien et leurs prières.

A mes chères frères et sœurs, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

Qu'Allah vous protège

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Lieu de stage	
Objectif du stage	
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 :	2
A- Définition et historique	2
B- Epidémiologie de la fièvre méditerranéenne familiale	3
C- Diagnostic et symptômes cliniques	3
a- Symptômes abdominaux	4
b- Symptômes articulaires	4
c- Symptômes thoraciques	4
d- Symptômes cutanés	4
D- Complications	5
1- Amylose rénale	5
2- Insuffisance rénale	5
3- Autres complications	6
E- Caractères génétiques	6
o Mode de transmission	6
o Description du gène MEFV	7
o Description de la pyrine	8
o Types de mutations	8
o Diagnostic	9
F- Traitement	10
o Traitement préventif des crises	10
o Traitement curatif des crises	10
o Traitement d'amylose	10
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	11
A- Matériel utilisé	11
o Echantillonnage	11
o Stratégie du travail	11
B- Méthode	11
Extraction d'ADN	11
o Principe	11
o Protocole expérimental	12

C- Dosage de l'ADN extrait	13
D- Amplification de l'ADN extrait par PCR	14
o Principe	14
o Réactifs utilisés	14
o Protocole expérimental	15
E- Migration du produit de PCR sur gel d'agarose	16
o Préparation du gel d'agarose à 2	16
o Dépôt des échantillons	17
o La visualisation des bandes d'ADN	17
F- Séquençage des produits PCR du gène MEFV	17
1. Purification par ExoSAP	17
o Principe	17
o Protocole expérimental	18
2. Réaction de séquençage par BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing	18
o Principe	18
o Protocole expérimental	19
3. Purification de la réaction de séquence avec Kit BigDye Kterminator	20
o Principe	20
o Protocole expérimental	20
4. Détermination de la séquence	21
G- Les outils bioinformatiques	22
Chapitre 3 : Résultats et discussion	23
1- Données épidémiologiques	23
o Répartition selon le sexe	23
o Répartition selon l'âge au moment du diagnostic	24
2- Données cliniques et génétiques	24
o Signes cliniques	24
o Etude génétique	26
o Analyse des séquences et mutations détectées	27
Conclusion	30
Références bibliographiques	31

Liste des abréviations

ADN : désoxyribonucléotide

ARN : acide ribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : basic local alignment search tool

DO : densité optique

F : forward

FMF : fièvre méditerranéenne familiale

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

R : reverse

RPM : rotation par minute

SAA : sérum amyloïde à protéine

Liste de figures

Figure 1 : Répartition géographique de FMF.....	8
Figure 2 : Gène MEFV sauvage	8
Figure 3 : Le spectre des mutations MEFV	9
Figure 4 : Photo du spectrophotomètre Nanovue utilisé dans le laboratoire de génétique CHU Fès... 14	
Figure 5 : Schéma des cycles de température de la PCR	15
Figure 6 : Réactifs du Kit « DreamTaq Green PCR Master Mix »	16
Figure 7 : Mécanisme de fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.20	
Figure 8 : Photo du séquenceur automatique (Genetic Analyzer 3500Dx).....	22
Figure 9 : Répartition des patients selon le sexe.....	24
Figure 10 : Répartition des patients selon l'âge.....	25
Figure 11 : Electrophorégramme de la séquence de l'exon 10 du gène non muté.....	28
Figure 12 : Electrophorégramme de la séquence de l'exon 10 mentionnant la mutation homozygote.....	29
Figure 13 : Electrophorégramme de la séquence de l'exon 2 du gène non muté.....	29
Figure 14 : Electrophorégramme de la séquence de l'exon 2 du gène mentionnant la mutation hétérozygote.....	29
Figure 15 : Alignement de la séquence obtenue à partir du séquençage de l'exon 2 du sujet malade.....	30

Liste de tableaux

Tableau I : Amorces utilisées pour la mise en évidence des mutations du gène <i>MEFV</i>	15
Tableau II : Programme du cycle de T° pour l'amplification des exons 2 et 10 du gène ... <i>MEFV</i> dans le thermocycleur.	16
Tableau III : Programme de cycle de T° de l'ExoSap.	18
Tableau IV : Les dichloroRhodamines avec leur spectre d'émission maximum.....	19
Tableau V : Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence.....	20
Tableau VI : Programme utilisé au niveau du thermocycleur pour la réaction de séquence.	20
Tableau VII : Symptômes et types de mutations des 20 patients.....	25

Lieu de stage

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J et conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

Anatomie pathologique ;

Bactériologie-Immunoanalyses ;

Parasitologie ;

Biochimie et pharmacotoxicologie ;

Hématologie ;

Génétique médicale et biologie moléculaire. Dans lequel mon stage a été effectué.

Composé de :

- Salle de réception ;

- Salle de prélèvements ;

- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie ;

- Laboratoire d'hématologie ;

- Laboratoire de bactériologie /Immunologie ;

- Laboratoire de parasitologie ;

- Laboratoire de génétique ;

- Laboratoire d'anatomie pathologique.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique UGMO, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, est subdivisée en trois disciplines qui assurent des activités variées :

Génétique clinique (activité clinique)

Consultation de génétique (au centre du diagnostic)

Conseil génétique (au centre du diagnostic)

Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic)

Avis du médecin généticien dans les services cliniques

Hôpital de jour (en coordination avec les services cliniques)

Génétique chromosomique (analyse des chromosomes)

Cytogénétique classique (caryotype) ;

Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence).

Génétique moléculaire (analyse des gènes)

Amplification de gène par PCR ; Séquençage.

Introduction générale

L'Homme possède deux axes de système immunitaire, l'immunité innée qui est présente dès la naissance et l'immunité acquise qui adapte son attaque à un antigène spécifique.

La réponse immunitaire innée est dotée d'une réaction rapide vis-à-vis les agents étrangers au corps. Comme ces réactions sont non adaptatives elles arrivent à réagir directement sans aucun temps de latence. Les polynucléaires, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques sont les cellules responsables de ce type de réaction. Elles ont la capacité de sécréter des protéines solubles ayant des propriétés différentes telles que recruter d'autres cellules, activer des cellules à produire des médiateurs de l'inflammation, ou encore ayant des propriétés pro inflammatoires comme IL-1, IL-6 et le TNF α . [1]

On parle de maladies auto-inflammatoires pour l'ensemble de pathologies liées à un déficit dans le système inné le conduisant à attaquer les constituants normaux de l'organisme et qui se manifestent soit par une réaction exagérée soit par une réaction non justifiée. Ce type de maladie est chronique et se présente sous différentes formes selon l'atteinte préférentielle d'un organe ou d'un autre, on parle dans ce cas de maladies auto-inflammatoires spécifiques d'organe ou non spécifique d'organe. On peut citer parmi ces maladies le diabète, l'anémie auto-immune et le syndrome de traps.

On parle aussi de la fièvre méditerranéenne familiale qui est l'expression de plusieurs mutations qu'a subi le gène *MEFV*. Ces mutations causent une réponse inflammatoire exagérée ce qui se reflète par des fièvres récurrentes qui ne dure qu'environ 48h et est accompagné par l'inflammation des séreuses ou de la membrane des cavités du corps et traduit donc des douleurs abdominales, thoracique et aussi des douleurs articulaires. [2]

MEFV est un gène exprimé dans les neutrophiles matures, et donc responsable dans la régulation de l'inflammation. Ce gène code, quand il n'est pas muté, pour la pyrine qui a un rôle immunitaire important qui en inhibant l'activation des neutrophiles réduit la réponse inflammatoire et contrôle la suppression des déclencheurs mineurs inconnus de l'inflammation.

Ce projet avait pour but l'étude des mutations du gène MEFV responsable de la fièvre méditerranéenne familiale en appliquant les différentes techniques de biologie moléculaire ; amplification par PCR et séquençage.

Durant cette période de stage j'ai pu enrichir mes connaissances dans le domaine médicale et ainsi de développer mes compétences acquises durant ma formation à la FST.

CHAPITRE 1 :

A-Définition et historique

La fièvre méditerranéenne familiale, maladie auto-inflammatoire, chronique, connue par ces fièvres récurrentes est une maladie qui date de très longtemps ce qui rend difficile de mettre en évidence son origine mais elle se trouve majoritairement dans les populations originaires du bassin méditerranéen. Vu que ces régions géographiques ont connu peu de développement jusqu'au vingtième siècle fait que la maladie n'a été reconnue que récemment. [3]

C'est d'abord Siegel S. en 1945 qui sous le terme de « péritonite périodique » décrit le cas d'une « péritonite paroxystique bénigne ». La dénomination indique l'étonnante rémission des importants symptômes accompagnant les crises aiguës. Il établit le diagnostic d'une sérosité aiguë récurrente. Presque dix ans plus tard, en 1954, Reimann et al. En étudiant 72 cas d'une population libanaise constate que la maladie touche majoritairement les familles d'origine Arménienne, et qu'elle s'exprime de façon très variée. Il introduit la notion de maladie héréditaire, et crée la notion de « péritonite périodique ».

Cette notion a ensuite été approfondie, en examinant la répartition de la maladie dans les populations (ce qui lui a valu le nom de Fièvre Familiale Méditerranéenne) et en incluant la possibilité d'apparition d'une amylose rénale. Cette survenue très fréquente de l'amylose, et son issue rapidement fatale, ont fait que de nombreuses études continuent à préciser le mode de transmission, la répartition de la maladie (clinique), et le traitement.

En 1975, le gène a été identifié et l'ont donc appelé MEFV. [4]

En 1992, le gène de la FMF a été localisé sur le bras court du chromosome 16 en position 16p13.3.

B- Epidémiologie de la Fièvre méditerranéenne familiale

Cette pathologie, contrairement aux pathologies connues sur l'échelle universelle, a une prévalence de 1 à 5 sur 10000 personnes d'origines méditerranéennes d'où le nom de fièvre méditerranéenne dont la majorité est les arméniens, les turcs, les juifs sépharades, et les arabes, d'une transmission héréditaire autosomique récessif et donc porté par les deux parents. Elle peut apparaître à l'enfance, adolescence, ou à l'âge adulte mais disparaît généralement avant 40 ans. [7]

On l'observe également chez des patients d'origine européenne mais avec une prévalence rare. [3]

C-Symptômes cliniques

La fièvre méditerranéenne familiale est caractérisée par une fièvre récurrente spontanée qui peut atteindre 40°C et qui s'atténue après une moyenne de 48H accompagné de frissons, les crises durent généralement entre 1 à 4 jours avec une période asymptomatique entre les crises mais ces accès fébriles sont associés à d'autres symptômes qui font référence à l'activation du système immunitaire inné qui commence à produire de fortes concentrations de fibrinogène, sérum amyloïde à protéine (SAA) qui sont des protéines de la phase aiguë de l'inflammation.

Les crises peuvent être suivies d'une fatigue générale qui peut être déclenché par le changement de température, stress psychique, ou par un épuisement physique.

a- Symptômes abdominaux

Signe primordiale de la FMF en plus de la fièvre, présent chez 85% des patients, se présente au début par des douleurs locaux puis se propage dans tous l'abdomen. A l'examen clinique, le patient présente une posture contractée et ne peut changer pas sa position ce qui, en absence de diagnostic de FMF peut le pousser à effectuer une intervention chirurgicale par faute d'erreur de diagnostic.

Cette complication peut être associée à une constipation, anorexie ou plus, des vomissements. Par ailleurs une radio d'abdomen peut montrer une distension abdominale qui indique une

affection abdominale soulignant une péritonite [5] chose qui peut être traitée sans nécessiter une intervention chirurgicale mais dans le cas où les crises de péritonite se répètent il y a risque d'une occlusion intestinale qui, dans ce cas-là, doit être opéré pour éviter une éventuelle nécrose intestinale. [6]

b- Symptômes articulaires

Causés par l'inflammation des membranes synoviales qui tapissent l'intérieure des articulations, peut mener à une arthrite ou même à un rhumatisme articulaire aigu. Les grosses articulations sont les plus influencées surtout les genoux et les chevilles.

Ces crises n'entraînent généralement pas d'érosion osseuse ou de destruction articulaire sauf quelques rares formes qui ont été observés. [8]

On note aussi la présence d'atteintes polyarticulaires visant les articulations plus serrées comme les poignets, et les doigts.

Les attaques articulaires débutent brutalement avec une douleur atteignant son plus haut degré en moins de 12 heures et régressant en moins de 24 heures. Les articulations peuvent être douloureuses et très enflées ce qui peut empêcher le patient de marcher

c- Symptômes thoraciques

Dûs à une inflammation de la plèvre soit du péricarde qui touche à peu près 50%.

Les douleurs apparaissent brusquement et atteignent rapidement leur intensité maximale et régressent totalement en 24 à 48 heures, La douleur est généralement localisée d'un seul côté et peut être intense au point d'empêcher le patient de respirer profondément.

d- Symptômes cutanés

Touche surtout les chevilles [20], se manifeste par des épisodes inflammatoires appelés pseudo-érysipèles qui est similaire à l'érysipèle par les mêmes symptômes mais contrairement à la première, l'érysipèle est dû à une infection causée par une bactérie.

Ces symptômes se présente par une plaque rouge ou rose trop douloureuse appelée plaque érythémateuse.

C-Complications

1-Amylose rénale

La FMF a plusieurs conséquences graves mais rare sur l'organisme du patient, on peut citer la splénomégalie qui survient entre les crises et se manifeste chez les enfants dans la majorité des cas, une péricardite et des manifestations oculaires sont aussi observés chez ce type de patients.

L'amylose est l'une des formes les plus sévères et la plus grave de la FMF et qui est une accumulation de dépôts amyloïdes dans différents tissus et organes ce qui mène à une perturbation du fonctionnement normale de l'organe. L'amylose dans le cas de FMF est principalement rénale et peut évoluer en une insuffisance rénale et puis au décès. Elle survient, dans la plupart des cas, après des années d'évolution et d'un diagnostic retardé de FMF mais 37% des patients présente une amylose rénale en même temps que la FMF, dans ce cas on parle de FMF de type II. [7]

2-Insuffisance rénale

L'insuffisance rénale se manifeste par une réduction de la structure rénale ce qui entraîne une dégradation irréversible des néphrons et donc la capacité des reins à filtrer le sang et synthétiser de l'urine.

Vu que les reins ont un rôle primitif qui consiste à équilibrer le volume d'eau et du taux de sels minéraux nécessaires à un bon fonctionnement de l'organisme, l'insuffisance rénale peut causer un changement du volume urinaire, la présence de gouttes de sang dans l'urine.

Les reins sont aussi responsables sur la production d'hormone, d'enzymes et de vitamines indispensables pour la synthèse de globules rouges et de la régulation de la pression artérielle d'où l'immense importance de traiter cette pathologie afin d'augmenter la chance de survie.

Malheureusement la maladie ne se manifeste que lorsqu'elle atteint un stade très avancé, elle se manifeste rarement avant 45 ans, et sa prévalence augmente avec l'âge, notamment après 65 ans. [10]

3- Autres complications

Une augmentation de la température d'une manière excessive et pendant une période prolongée peut perturber la fonction des organes et donc sur l'activité ovarienne et spermatogénique,

d'ailleurs la FMF résulte sur une infertilité féminine mais aussi masculine, cette infertilité peut être causé par une amylose testiculaire associé à une amylose rénale. [13]

La colchicine peut être toxique à des doses 3000 fois supérieur à la dose thérapeutique mais en revanche, une prise de colchicine cliniquement et biologiquement contrôlée peut ainsi de rétablir un taux de fertilité identique à la population générale. [14]

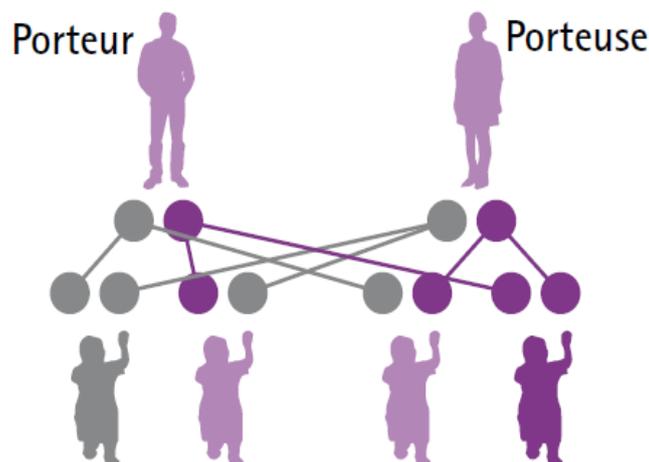
Les grossesses chez une patiente atteinte de FMF peuvent n'avoir aucun effet sur la fréquence des symptômes mais dans d'autres cas les crises peuvent devenir plus intenses à un certain degré qu'elles favorisent les contraction utérines et fausses couches, qui ont diminué d'un taux de 4% après l'utilisation de la colchicine.

E- Caractères génétiques

○ Mode de transmission

La fièvre méditerranéenne familiale est une maladie à transmission autosomique récessif et donc selon la répartition génotypique, pour qu'un enfant soit malade soit les deux parents doivent être porteurs sains, soit un des parents doit être malade.

La fréquence des mutations peut être élevée selon l'importance de la consanguinité observé entre les parents.[18]



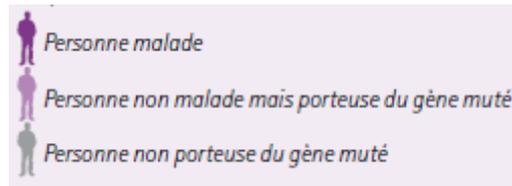


Figure 1 : Des parents porteurs non malades ont un risque sur quatre d'avoir un enfant malade.

○ Description du gène MEFV

Le gène *MEFV*, identifié en 1975 est localisé sur le bras court du chromosome 16 en position 16p13.3, il comprend 10 exons et 781 codons. Plusieurs mutations sont responsables de la FMF, elles touchent majoritairement les exons 2 et 10 du gène *MEFV* qui code pour la pyrine.

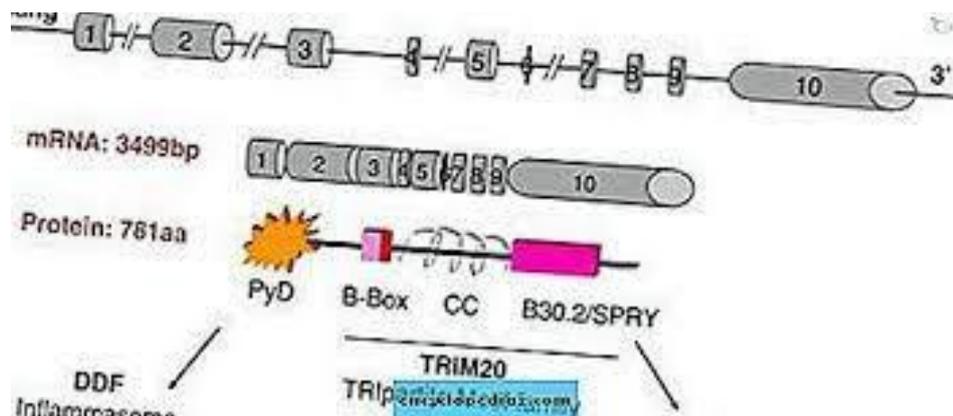


Figure 2 : Gène MEFV sauvage

○ Description de la pyrine

Le gène *MEFV* contient 4 unités parmi lesquelles une code pour malenostrine ou autrement dit la pyrine. La pyrine, protéine synthétisée à partir de la transcription du gène *MEFV* en un ARN de taille ne dépassant pas 3,7 kb.

MEFV est exprimé lors de la différenciation des cellules souches vers les lignées granulocytaires et monocytaires [11], d'ailleurs la zone infectée montre un grand influx de polymorphismes mononucléotidiques [12]

Plusieurs recherches ont montré la présence de la pyrine dans les neutrophiles, éosinophiles, et dans les granulocytes ce qui sous-entend que la pyrine à un certain rôle dans la régulation de l'inflammation.

Jusqu'à présent la fonction de cette protéine et son mode d'action restent indéfinies

- Types de mutations

Pour identifier les différentes mutations, il faut soumettre le gène MEFV à une étude moléculaire qui devra permettre le diagnostic de la FMF et aussi de prévenir le début de la maladie chez les personnes asymptomatique à haut risque.

Cinq mutations fondatrices, V726A, M694V, M694I, M680I et E148Q représentent 74 % des chromosomes FMF des cas typiques (Arméniens, Arabes, Juifs et Turcs). Les mutations rares se trouvent préférentiellement dans les populations qui ne sont généralement pas affectées par la FMF. [4]

Le grand nombre de mutations touchant ce gène explique la grande diversité des symptômes entre les personnes atteintes de cette maladie.

Le spectre de mutation du gène MEFV

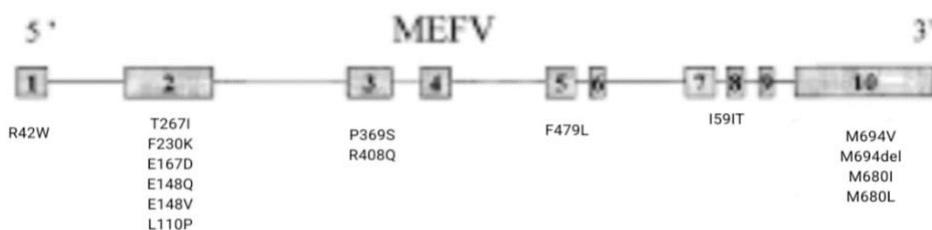


Figure 3 : Le spectre des mutations MEFV

- Diagnostic

Pour éviter tout type de complication ultérieure il faut évoquer le diagnostic à un état avancé. L'identification de la FMF reste un vrai challenge puisque le tableau des symptômes peut être différent d'un patient à un autre et ce dû à la répartition ethnique des populations affectées.

Le diagnostic repose sur des critères biologiques mais aussi cliniques, selon la classification de Tel Hashomer proposé par les israéliens en 1997 le diagnostic peut être évoqué avec la réunion de 2 critères majeurs ou d'un critère majeur et de deux mineurs. [15] Tandis que de nouveaux critères plus simplifiés surnommés critères de Livneh ont été proposés après une étude clinique et qui est aussi basé sur un modèle majeur et mineur. [16]

❖ **Critères majeurs :**

- Attaques typiques :
 - Péritonite (généralisée).
 - Pleurésie (unilatérale) ou péricardite.
 - Mono arthrite (hanche, genou, cheville).
 - Fièvre seule.
- Crises abdominales incomplètes.

❖ **Critères mineurs :**

- Crises incomplètes touchant un ou plusieurs sites parmi les suivants :
 - ✓ Thorax
 - ✓ Articulations
- Douleur de type mécanique au niveau des membres inférieurs
- Réponse favorable à la colchicine

Quand les symptômes cliniques sont confirmés il faut effectuer une étude génétique afin de rechercher les différentes mutations au sein du gène MEFV.

F-Traitements

○ **Traitement préventif des crises :**

La colchicine, introduite par Goldfinger en 1972, nota son effet prophylactique chez les patients atteints de FMF. Elle est au début introduite à de faibles doses et augmentent jusqu'à obtention d'une réponse clinique favorable. Les doses sont comprises entre 0,5 et 2 mg/jour indépendamment du poids du patient. Cependant, quand elle est prise régulièrement, la colchicine permet de réduire la fréquence et l'intensité des crises. Les effets secondaires de la colchicine sont généralement mineurs, et ne sont observés que chez quelques patients. Ils se manifestent le plus souvent par une diarrhée qui peut être arrêtée par la réduction du dosage du

médicament. Dans les rares cas où la colchicine orale n'a pas d'effet, l'administration de colchicine intraveineuse en parallèle pourrait être efficace.

- **Traitement curatif des crises :**

Le traitement de la crise de FMF repose sur un traitement symptomatique exclusivement. Les accès inflammatoires nécessitent le repos et justifient un arrêt de travail ou des activités scolaires pendant la durée des symptômes. Les principales molécules pour soulager les crises sont les antipyrétiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens et les antalgiques à débiter dès les premiers symptômes de la crise.

En première intention, associer antalgiques-antipyrétiques comme paracétamol avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens, si la douleur n'est pas calmée par les médicaments précédents, utiliser des antalgiques comme codéine sirop pour les enfants. [15]

- **Traitement de l'amylose :**

La colchicine administrée quotidiennement est le seul traitement préventif efficace de l'amylose (16). Son action sur l'amylose déclarée est partielle et permet parfois de limiter l'évolution de la maladie vers l'insuffisance rénale terminale [17]. Des posologies supérieures à 1,5 mg/j de colchicine ont permis la régression totale de la protéinurie voire une régression histologique des lésions chez quelques patients. La poursuite du traitement par colchicine à une dose plus faible, adaptée à la situation d'insuffisance rénale, est indispensable dans ces deux situations car elle permet d'éviter la récurrence de l'amylose sur le rein transplanté.

CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes

A-Matériel utilisé :

- **Echantillonnage**

Il s'agit d'une étude rétrospective portée sur une série de 20 patients diagnostiqués avec la fièvre méditerranéenne familiale, et qui ont consulté le laboratoire de génétique au Centre Hospitalier Universitaire Hassan II Fès entre l'année 2017 à 2022 pour une confirmation génétique. Notre étude se focalise sur la recherche des différentes mutations qui peuvent se trouver au niveau des exons 2 et 10 du gène *MEFV*. Les données des patients sont présentées dans le tableau III.

○ Stratégie du travail

Les renseignements cliniques et paracliniques des patients ont été recueillis à travers leurs dossiers médicaux au niveau des archives du service de génétique du CHU Hassan II Fès, à l'aide d'une fiche d'exploitation clinique.

L'analyse génétique repose sur une analyse de l'ADN génomique à partir du sang total. Pour cela, on commence tout d'abord par une extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin des différents patients, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique. L'ADN ainsi extrait, est amplifié par la suite, en ciblant la région qui semble responsable de la maladie, grâce à une technique de PCR, puis on visualise les fragments d'ADN amplifiés sur gel d'agarose pour confirmer l'amplification. Et on passe après au séquençage pour détecter la présence ou l'absence des différentes mutations chez la population cible sur les deux exons 10 et 2 du gène *MEFV*.

B- Méthode

Extraction d'ADN

○ Principe

L'extraction de l'ADN est nécessaire pour initier toute étude génétique. C'est une technique qui sert à isoler de l'ADN à partir des cellules en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Au niveau du laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique, l'extraction d'ADN se fait à partir d'un prélèvement sanguin (3 à 5 ml) réalisé dans un tube EDTA (Éthylène Diamine Tétra-acétique acide). Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou -20°C pour utilisation ultérieure.

Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules (globules rouges et globules blancs)
- Élimination des protéines et des impuretés (autres acides nucléiques : ARN, etc.)
- Précipitation et concentration de l'ADN

Notre extraction d'ADN génomique par le Kit « Pure Link™ Genomic DNA qui permet d'isoler l'ADN à partir d'une suspension cellulaire grâce à un kit muni d'une colonne qui après lyse cellulaire va permettre de collecter l'ADN dispersé dans la solution sur une membrane

permettant ainsi de le purifier avec un rendement maximal. Ce qui rend cette technique avantageuse lorsqu'il y a un faible volume de sang.

○ Protocole expérimental

Lyse des cellules avec la protéinase K et le tampon de lyse

Prévoir un bain marie à 55° C ou une étuve à 55°C. Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml :

- Ajouter 200 µl de sang + 20µl de protéinase K + 20µl de RNase A
- Vortexer environ 15 secondes
- Incuber 2 minutes à température ambiante
- Ajouter 200 µl de Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer
- Vortexer environ 15 secondes
- Incuber 10 minutes à 55°C
- Ajouter 200µl d'éthanol absolu, vortexer environ 5 secondes ;

Adsorption de l'ADN sur la membrane

- Mettre le mélange dans la colonne Pure Link™ et centrifuger 1 minute à 8000rpm ;
- Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat ;

Élimination des contaminants résiduels

- Ajouter 400ml de tampon Wash Buffer 1 et centrifuger 1 minute à 8000rpm ;
- Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le Kit) et jeter le tube contenant le filtrat ;
- Ajouter 400ml de tampon Wash Buffer 2 et centrifuger 3 minutes à 1400rpm ;
- Placer la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5ml ;
- Mettre 50 ou 100 ml de tampon Pure Link™ Genomic Elution buffer et incuber 1 à 5 minutes à température ambiante ;
- Centrifuger 1 minute à 8000rpm ;
- Faire une deuxième élution : remettre les 50ml dans la colonne et centrifuger 1 minute à 8000rpm ;
- Conserver l'ADN extrait 0 +4°C ou -20°C.

C- Dosage de l'ADN extrait

La concentration d'ADN extrait est déterminée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultra-violet se situant à 260nm, alors que les protéines absorbent à 280 nm. Une unité DO à 260 nm = 50 µg/ml d'ADN. La valeur de l'absorbance (ou densité optique DO) à 280 nm permettra de déterminer toute contamination protéique. Ainsi, le ratio DO260/DO280 est utilisé pour estimer la pureté de l'ADN. Un extrait d'ADN est considéré pur lorsqu'il présente un rapport DO260 / DO280 compris entre 1.8 et 2. Si ce rapport est >2 on déduit qu'il y a une contamination par les ARN, et s'il est <1,8 il y a donc contamination par des protéines.

Au laboratoire de génétique médicale, le Spectrophotomètre Nanovue plus (**figure 4**) est l'appareil utilisé pour doser la concentration d'ADN. Il suffit de déposer dans l'appareil 2µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration.



Figure 4 : Photo du spectrophotomètre Nanovue utilisé dans le laboratoire de génétique CHU

Fès.

D- Amplification de l'ADN extrait par PCR

○ Principe

Après extraction d'ADN, on procède à la technique de réaction de polymérisation en chaîne qui permet l'amplification in vitro d'un gène ou d'une région spécifique d'un gène, et donc d'obtenir une quantité suffisante et détectable de la séquence d'ADN choisie.

Cette réaction est réalisée en une succession de cycles, les copies d'ADN obtenues à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant. L'amplification est donc exponentielle.

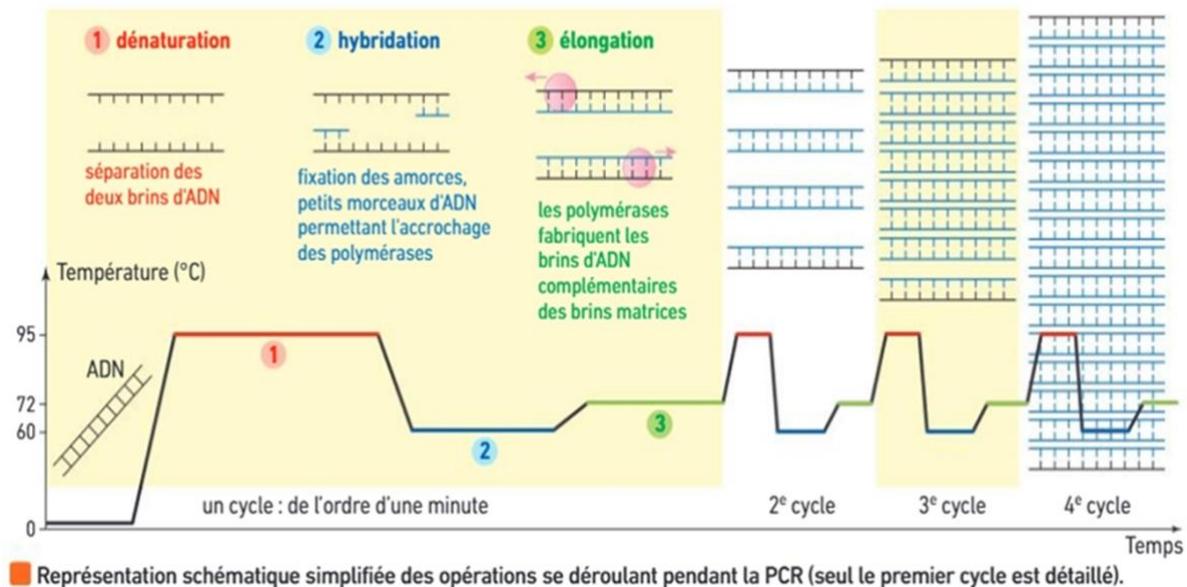


Figure 5 : Schéma des cycles de température de la PCR

○ Réactifs utilisés

Pour chaque échantillon, on prépare un milieu réactionnel dans un tube Eppendorf, contenant chacun :

- 10 µl de DreamTaq Green PCR Master Mix
- 12 µl d'eau (nuclease free water)
- 2 µl des amorces (1 µl sens et 1 µl anti-sens)
- 1 µl d'ADN (100 ng/µl)

Les mélanges préparés sont ainsi d'un volume final de 25 µl par tube, en tenant compte du volume d'incertitude de pipetage.

○ Protocole expérimental

Afin de rechercher les différentes mutations au niveau du gène *MEFV* responsable de la fièvre méditerranéenne familiale deux couples d'amorces ont été utilisés pour la détection et l'amplification de l'exon 2 et 10. Le tableau I résume les informations concernant les amorces utilisées, ainsi les différentes températures d'hybridation obtenu après mise au point.

Tableau I : Amorces utilisées pour la mise en évidence des mutations du gène *MEFV*

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique	T° d'hybridation	Taille de l'amplification
pour Exon 2	5'GCCTGAAGACTCCAGACCACCCCG '3	62	157
	5'CAGAGAGAAGGCCTCGGAG GGCCT'3		
pour Exon 10	5'GAGGTGGAGGTTGGAGACAA'3	60	368
	5'ATCTGTCCAGTGGGTGGTCA' 3		

La réaction de PCR séquençage est réalisée avec le Kit « DreamTaq Green PCR Master Mix » (**figure 6**) qui est une solution prête à l'emploi contenant : le DreamTaq DNA Polymerase, le DreamTaq Green buffer optimisé (tampon), la MgCl₂ les dNTP et l'Eau (Water nuclease free).



Figure 6 : Réactifs du Kit «DreamTaq Green PCR Master Mix».

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 1 min, pour mélanger et éliminer les bulles d'air, puis déposés dans un thermocycleur (Applied Biosysteme) ; l'amplification est effectuée en 35 cycles de températures, précédée par une étape de dénaturation allongée de 3 min à 95°C, et terminée par une étape d'élongation finale de 9min à 72°C. L'ensemble se déroule en 2h environ. Le tableau II résume le programme du PCR utilisé.

Tableau II : Programme de l'amplification des exons 2 et 10 du gène *MEFV* dans le thermocycleur

Etape	T°	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95°C	3 min	X 1
Dénaturation	95°C	30 secs	X 35
Hybridation	60°C ou 62°C selon l'amorce	30 secs	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	9 min	X 1

Après les 35 cycles, la réaction se termine par une phase d'élongation terminale. Le produit est récupéré afin d'être analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

E- Migration du produit de PCR sur gel d'agarose

- Préparation du gel d'agarose à 2% :

2g d'agarose ont été pesés et mélangés avec 100ml du tampon de migration TBE [X10] dilué à 10% (Tris Borate EDTA), le mélange a été solubilisé par chauffage sous agitation jusqu'à ébullition et obtention d'un liquide transparent. 4µl du BET [10mg/ml] ont été ajoutés. Le mélange a été coulé par la suite dans un moule muni d'un peigne dont les empreintes formeront des puits au sein du gel servant au dépôt des échantillons à tester (produits PCR). Après refroidissement (environ 30min), le moule a été ensuite installé dans la cuve d'électrophorèse remplie du tampon de migration (TBE 1X).

- Dépôt des échantillons :

Après polymérisation du gel, on dépose dans chaque puits du 6 µl du produit PCR seulement, du fait que la solution de charge fait partie de la composition du Kit « Green Taq ». Le support avec le gel chargé est placé dans le dispositif d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode chargée négativement (pôle noir).

○ La visualisation des bandes d'ADN :

Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge orangé, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. Après la migration des bandes d'ADN sous voltage de 110mV pendant 30 minutes, le gel a été éclairé sous ultraviolet à l'aide d'un trans-illuminateur afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes.

Si la PCR est satisfaisante, on procède au séquençage dans le but de détecter les mutations génétiques.

F- Séquençage des produits PCR du gène MEFV

Le séquençage est un procédé qui permet de déterminer la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN donné. Dans notre cas, on a utilisé la technique de séquençage afin de détecter la présence ou l'absence des différentes mutations au niveau des exons 2 et 10 du gène *MEFV*. Avant de procéder au séquençage, proprement dit, de nos produits PCR, il est nécessaire de passer par des étapes de préparation du produit à séquencer afin d'obtenir un résultat optimal.

1- Purification par ExoSAP®

○ Principe

La purification du produit PCR consiste à éliminer l'excès d'amorces, dNTP (non incorporés) et d'ADN polymérase pour ne pas interférer avec le séquençage.

ExoSAP sert à la purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I (Exo) qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres et en excès pour éviter leur interférence avec la suite des réactions. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100pb sont ainsi dégradés.

○ Protocole expérimental

- Dans un tube Eppendorf, mettre 2.5µl de l'enzyme ExoSAP + 5.5µl du produit PCR
- Par la suite, centrifuger à 8000 rpm pendant une minute

Puis, placer le tube au niveau du thermocycleur suivant le cycle de T° représenté dans le tableau

Tableau III. Programme de cycle de T° de l'ExoSap.

Température	Durée
37°C	3 mn
80 °C	15 min
10°C	∞

2- Réaction de séquence par BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing

○ Principe

Selon la méthode de Sanger, la réaction de séquence repose sur l'incorporation aléatoire, par une ADN polymérase, de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP), présents dans le milieu réactionnel, chacun étant marqué par un fluorophore spécifique avec un spectre d'émission spécifique (Tableau IV). Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore à leur extrémité terminale. On les appelle des terminateurs d'élongation ou "BigDye Terminators" ou "Dye-labeled Terminator".

La technologie BigDye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (*FRET*) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichloroRhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur. Ce dernier est différent pour chaque type de ddNTP.

La fluorescéine (fluorochrome donneur) est excitée par un rayon laser à argon émettant à 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le dichlororhodamine (fluorochrome accepteur) qui est excité à son tour.

Tableau IV. Les dichloroRhodamine avec leur spectre d'émission maximum.

ddNTP	dichloroRhodamines utilisées	Spectre d'émission maximum
A	dR6G	560-565nm
T	dROX	615-620nm
C	dR110	530-535nm
G	dTAMRA	590-595nm

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dichlororhodamine permet une amplification du

signal et, par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (**figure 6**).

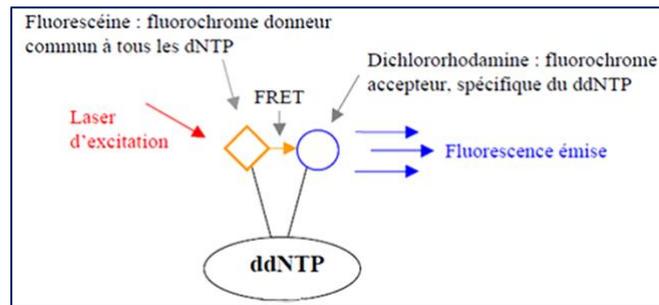


Figure 7. Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

○ Protocole expérimental

Notre étude rentre dans le domaine recherche scientifique et ne fait pas partie du diagnostic de routine fait dans le laboratoire. Pour cette raison, et dans le but d'économiser l'utilisation des réactifs, on réalise la réaction de séquence en utilisant juste l'amorce F, et si on trouve une mutation on confirme le résultat par l'amorce R (tableau I). Pour chaque patient, on prépare 3 tubes eppendorf, chacun contient l'amorce F correspond à l'un des trois exons étudiés. Pour avoir un volume final égal à 10 μ l, le mix préparé est illustré dans le tableau V.

Tableau V. Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence.

Réactif	Volume (μ l)
BigDye	1
Eau stérile	4
Amorce F	1
Produit PCR purifié	4

Ensuite, on centrifuge puis on place les tubes dans le Thermocycleur pour effectuer une amplification en 25 cycle répétée selon un programme spécifique correspondant aux conditions spécifiques à la réaction de séquence. Chaque cycle comprend 3 étapes (Tableau VI).

Tableau VI. Programme utilisé au niveau du thermocycleur pour la réaction de séquence.

Etape	T°	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation	95°C	10 secs	X 25
Hybridation	50°C	5 secs	
Elongation	60°C	2 Min	

3- Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye® Xterminator™

○ Principe

Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence. Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les Dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par séquenceur.

Le kit contient : un flacon « SAM Solution » (stockage à T° ambiante) qui stabilise la réaction de séquence et un flacon « XTerminator Solution » (stockage à 4°C, ne pas congeler) qui permet d'éliminer les Dyes non-incorporés.

○ Protocole expérimental

- Déposer 10µl de produits de réaction de séquence dans la plaque Applied
- Centrifuger la plaque
- Préparer un mix contenant :
 - 45 µl de solution SAM par puits
 - 10 µl de XTerminator Solution par puits à l'aide des cônes spécifiques, préalablement vortexé (à 10 secs) pour suspendre les résines.
- Vortexer le mélange et ajouter 55µl dans chaque puits à l'aide de la pipette distritips ou de la pipette monocanale.
- Sceller la plaque correctement avec un film adhésif

- Mettre la plaque sur l'agitateur (Eppendorf Mix Mate) à 1800 rpm pendant 30 secondes et vérifiez que tout se mélange bien et que la plaque reste bien attachée.
- Agiter à 1800 rpm pendant 30 minutes.
- Centrifuger la plaque 3 minutes à 1000 g (Centrifugeuse HeraeusMultifuge 3S-R).
- Transférer le surnageant contenant les fragments à séquencer dans les puits de la plaque du séquenceur. Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C avant d'être analysées.

4- Détermination de la séquence

La plaque est placée dans le séquenceur, un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences. Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur à 8 capillaires applied biosystems 3500 DX) (**figure 7**).



Figure 8 : Photo du séquenceur automatique (Genetic Analyzer 3500Dx).

G- Les outils de bioinformatique :

Logiciel BLAST :

BLAST (acronyme de basic local alignment search tool) est un algorithme utilisé en bioinformatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Ce programme permet de calculer significativement les pourcentages de similitude (parfois abusivement qualifiés de « pourcentages d'homologie ») entre les séquences en les comparant avec des banques de données. Il existe différents types d'analyses du programme BLAST. Dans notre étude, on a utilisé l'outil BLAST pour comparer les séquences obtenues après séquençage avec les séquences répertoriées dans la banque de données.

CHAPITRE 3 : Résultats & discussion :

1- Données épidémiologiques

- Répartition selon le sexe :

Répartition de la FMF selon le sexe montre une prédominance masculine avec 11 garçons soit 55% et 9 de sexe féminin soit 45% et un ratio homme/femme de 1.2 (**Figure 9**)

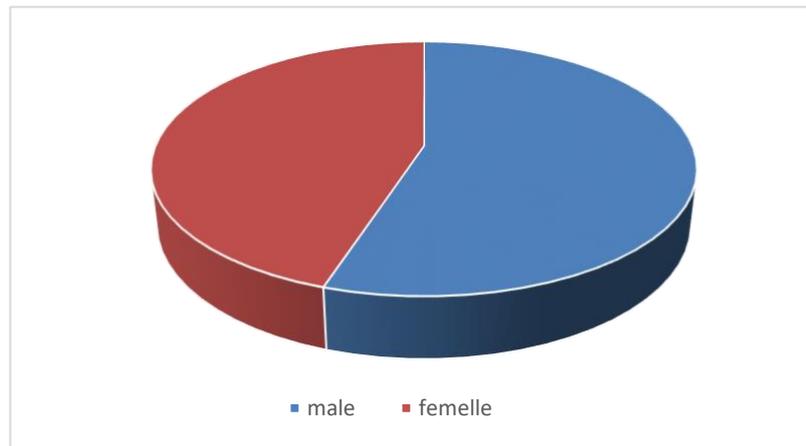


Figure 9 : Répartition des patients selon le sexe.

La maladie affecte les deux sexes. Cependant, plusieurs études semblent montrer que les hommes sont plus atteints que les femmes, dans un rapport approximatif de 3/2 [20], ce qui laisse supposer, soit une pénétrance plus faible du phénotype chez les femmes, soit une plus grande fréquence d'avortements spontanés des fœtus de sexe féminin porteurs de deux allèles mutés.

- Répartition selon l'âge au moment de diagnostic :

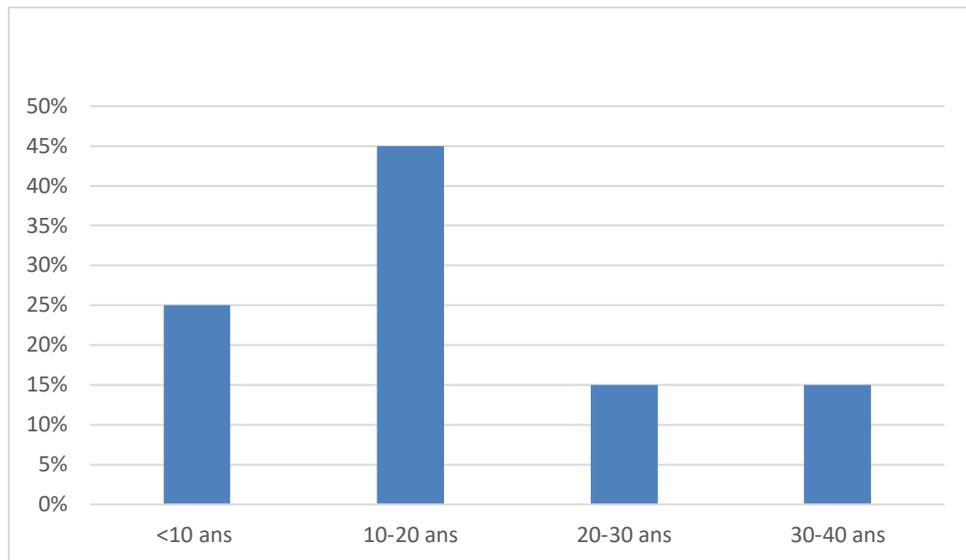


Figure 10 : Répartition des patients selon l'âge

Dans cette étude de 20 cas chez qui un diagnostic de FMF a été retenu devant des fièvres récurrentes et des douleurs abdominales. L'âge moyen de nos patients au moment du diagnostic est aux alentours de 20 ans avec un pourcentage d'atteinte important chez les patients dont l'âge est entre 10 et 20 ans. Tandis qu'une étude faite dans un centre européen par Ayfer, Inal et al incluant 124 enfants (66 garçons – 58 filles), atteint de la FMF, la moyenne d'âge était de 11 ans.

2- Données cliniques et génétiques :

○ Les signes cliniques :

Dans notre série, les manifestations cliniques observées initialement étaient très variables dominées par la fièvre, les douleurs abdominales, les arthralgies, et les vomissements. (Tableau VII)

- La fièvre était présente chez tous les malades de séries soit 100%.
- Les douleurs abdominales étaient présentes chez 18 patients de la série soit 90%.
- Les manifestations articulaires étaient observées chez 5 patients soit 25. Il s'agit d'arthralgies.
- Les vomissements étaient observés chez un seul patient soit 5%.

Tableau VII : Symptômes et types de mutations des 20 patients.

	Symptômes	Examen génétique	Evolution
1	Fièvre Douleur abdominale au niveau lombaire	M694V Homozygote E148Q Hétérozygote	Evolution en amylose AA en absence de traitement
2	Pas de fièvre ni de douleurs abdominales	M694V E148Q Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
3	Pas de symptomologie évidente de FMF	M694V E148Q Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
4	Fièvre Douleur abdominale au niveau lombaire	M694V E148Q Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
5	Fièvre Douleur abdominale au niveau lombaire	E148Q Hétérozygote	Réponse favorable sur corticoïde
6	Douleur abdominale au niveau lombaire	E148Q Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
7	Fièvre Douleur abdominale Arthralgie	M694V Homozygote E148Q Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
8	Fièvre Douleur abdominale	M694V E148Q Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
9	Fièvre Douleur abdominale	M694V E148Q Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
10	Fièvre Arthralgie	M694V E148Q Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
11	Douleur abdominale	Négative	
12	Fièvre Douleur abdominale Arthralgie	Négative	

13	Fièvre Douleur abdominale Arthralgie	M694V Hétérozygote	Réponse favorable à la colchicine
14	Fièvre Douleur abdominale	M694V Homozygote	Réponse favorable à la colchicine
15	Douleurs abdominales associés à des diarrhées	M694V Homozygote	Réponse favorable à la colchicine
16	Fièvre Douleur abdominale	M694V Homozygote	Réponse favorable à la colchicine
17	Fièvre Douleur abdominale	M694V Homozygote	Réponse favorable à la colchicine
18	Fièvre Douleur abdominale	M694V Homozygote	Réponse favorable à la colchicine
19	Fièvre Douleur abdominale Vomissements	Négative	Réponse favorable à la colchicine
20	Fièvre Douleur abdominale Arthralgie	Négative	Réponse favorable à la colchicine

La fièvre et les douleurs abdominales sont les signes les plus fréquemment retrouvés, leurs fréquences dépassent 90% dans la plupart des cas étudiés. Une fréquence moindre est observée dans le groupe de le Crète. [20]

Ensuite, les arthralgies présentent la troisième manifestation la plus fréquente. Elles sont significativement plus observées chez les juifs sépharades (70%) et chez nos patients marocains (65%) que chez les turcs (45%) et les arabes (33%).

○ Etude génétique :

L'étude génétique à la recherche de mutations a été faite chez 20malades, et a révélé :

- Chez 7 patients : présence de la mutation M694V à l'état homozygote chez 8 cas, la mutation M694V à l'état hétérozygote.
- Chez 4 patients : étude génétique normale.
- Chez 1 patient : présence de la mutation E148Q à l'état hétérozygote.

D'après ce tableau on remarque une diversité de symptômes et de types de mutations d'ailleurs la mutation M694V a été associée aux cas les plus pathogènes, elle a aussi le même effet quand elle est associée à la mutation E148Q. Il existe aussi des cas moins sévères où la seule mutation est E148Q à l'état hétérozygote. Ces résultats sont confirmés par une étude ou une investigation faite au niveau du département de génétique médicale de l'institut national d'hygiène de Rabat ou une étude de 100 personnes porteuses d'une seule ou de deux mutations du gène *MEFV* dont 48% des mutations prédominantes sont la M694Q associées à un pronostic sévère de FMF avec un haut risque d'atteinte d'amylose rénale.[21]

Notons aussi l'existence dans notre étude l'existence de familles FMF non liées au gène *MEFV* ce qui rend possible que ces patients souffrent d'une autre fièvre périodique [19].

On remarque aussi que l'administration modérée de la colchicine a un effet positif et immédiat sur les symptômes de la FMF, même les plus sévères d'entre eux.

○ Analyse des séquences et mutations détectées :

Dans le but de mettre en évidence la présence ou l'absence des éventuelles mutations affectant le gène *MEFV*, les deux exons du gène *MEFV* des 20 patients ont été séquencés. Après alignement (BLAST) et correction (Logiciel Sequencing Analysis software v5.4) des séquences obtenues, les résultats ont montré la présence de deux types de substitutions au niveau du gène *MEFV* chez la majorité des patients étudiés.

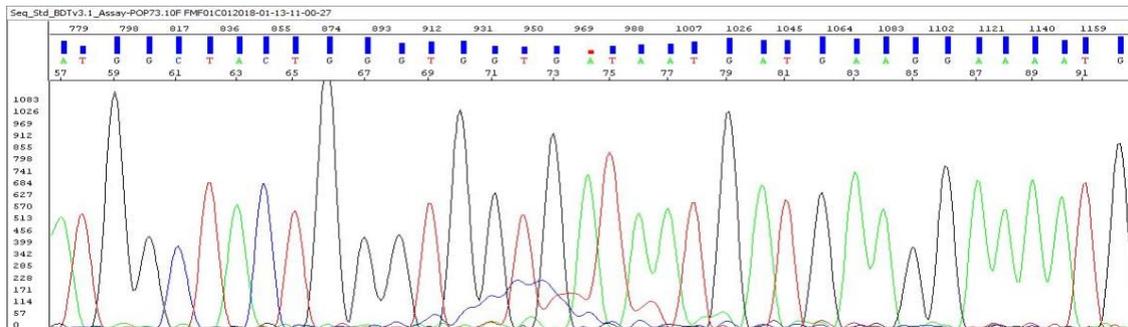


Figure 11 : Electrophorogramme de la séquence de l'exon 10 du gène non muté.

L'alignement avec la séquence requête de la base de données BLAST nous a permis de confirmer la mutation sur le gène par substitution de A en G.

```

Query 1 AACATGACTCTGTCGCCAGAGAATGGCTACTGGGTGGTGATAATGATAAAGAAAATGAG 60
Sbjct 1623 AACATGACTCTGTCGCCAGAGAATGGCTACTGGGTGGTGATAAGATGAAGAAAATGAG 1682
Query 61 TACCAGGCGTCCAGCGTTCCTCCCGACCCGCCTGCTAATAAAGGAGCCCAAGCGTGTG 120
Sbjct 1683 TACCAGGCGTCCAGCGTTCCTCCCGACCCGCCTGCTAATAAAGGAGCCTCCAAGCGTGTG 1742
Query 121 GGCATCTTCGTGGACTACAGAGTTGGAAGCATCTCCTTTTACAATGTGACAGCCAGATCC 180
Sbjct 1743 GGCATCTTCGTGGACTACAGAGTTGGAAGCATCTCCTTTTACAATGTGACAGCCAGATCC 1802
Query 181 CACATCTATACATTCGCCAGCTGCTCTTTCTCTGGGCCCTTCAACCTATCTTCAGCCCT 240
Sbjct 1803 CACATCTATACATTCGCCAGCTGCTCTTTCTCTGGGCCCTTCAACCTATCTTCAGCCCT 1862
Query 241 GGGACACGTGATGGAGGGAAGAACACAGCTCCTCTGACTATCTGTCCAGTGGGTGGTCA 299
Sbjct 1863 GGGACACGTGATGGAGGGAAGAACACAGCTCCTCTGACTATCTGTCCAGTGGGTGGTCA 1921

```

Figure 15 : Alignement de la séquence obtenue à partir du séquençage de l'exon 2 du sujet malade

Conclusion

La fièvre méditerranéenne familiale est une maladie génétique autosomique récessive répandue dans certaines populations dont celles du bassin méditerranéen, la fièvre demeure le maître symptôme.

Plusieurs facteurs de risques sont liés à la diversité des symptômes d'un patient à un autre ; Facteurs de risques génétiques liés au gène *MEFV* mais aussi des facteurs de risques non génétiques comme le sexe puisque que les hommes ont plus de risque que les femmes, en plus de facteurs environnementaux.

L'évolution est chronique et variable, elle peut se développer à une grave complication qui est l'amylose rénale, cette dernière peut menacer le pronostic vital, cependant le pronostic global reste favorable avec un suivi régulier. La colchicine est le traitement de référence permettant de prévenir la survenue des poussées inflammatoires mais ainsi la survenue de l'amylose secondaire.

Références bibliographiques

- [1] : Dr François Lavaud Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 36(3):310-314 mai 1996
- [2] : Sophie Georquin-Lavialle La fièvre méditerranéenne familiale DOI:10.1016/ Mar 2018
- [3] : Vinceneux P, Pouchot J, Méry J P. Maladie périodique (fièvre Méditerranéenne familiale). In : MF Khan, AP Peltier, O Meyer, JC Piette, Maladies systémiques. Flammarion-Médecine /Sciences 2000 :1237-68)
- [4] : Touitou Publié La biologie Journal européen de génétique humaine 1er juillet 2001
- [5] : le conseil médicale du Canada version : mars 2022
- [6] : La Revue de Médecine Interne 39 DOI : 10.1016/j.revmed.2018.02.005
Volume 37, Supplement 2, Pages A119-A120, Decembre 2016
- [7] : https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp Pr Raffaele MANNA - Janvier 2012
- [8] : Ben Chetrit E, Levy M. familial mediterranean fever. Lancet 1999, 351 : 659-664
- [9] : Z.Benjelloun NÃ©phrologie & Thérapeutique 14(5):344 September 2018
- [10] : Inserm, decrypter les mécanismes de destruction du rein 8 nov 2017,
- [11]: Centola M, Wood G, Frucht DM, et al. The gene for familial Mediterranean fever, Blood 2000 ; 95 : 3223-31
- [12]: The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. Cell 1997 ; 90 : 797-807)
- [13]: Haimov-Kochman R, Prus D, Ben-Chetrit E. Azoospermia due to testicular amyloidosis in a patient with familial Mediterranean fever. Hum Reprod 2001;16:1218–20
- [14] : Fertilité chez les patients atteints de fièvre méditerranéenne familiale (FMF) : étude au sein d'une population de 331 patients - 06/06/18 Doi : 10.1016/j.revmed.2018.03.360
- [15] :L. Savey, K. Stankovic, V. Avellino, G. Grateau,

[16] : S. Georjin Laviaille service de médecine interne, CEREMAIA, CHU Tenon, Paris, France

P.BERBIS-réalité pédiatrique

[17] : A. Livneh, P. Langevitz, D. Zemer, N. Zaks, S. Kees, T. Lidar, *et al.* Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever Arthritis Rheum, 40 (1997), pp. 1879-1885

[18] : P.VinceneuxJ.Pouchot La Presse Médicale Volume 34, Issue 13, July 2005, Pages 938-946

[19] :Akarsu AN, Saatci U, Ozen S et al. Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. J Med Genet 1997 34 573-78.

[20]: M. Abdelmounim Arraka Fièvre méditerranéenne familiale: difficultés diagnostiques et prise en charge avril 2022

[21] : KHATTABI, Soukaina Pathologie moléculaire de la fièvre méditerranéenne familiale au Maroc. EL 2016