

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Option :

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

Recherche des variants C282Y et H63D dans le gène *HFE* en
Algérie et leur association avec la performance sportive.

Présenté par :

Date de soutenance : 13 septembre 2022

*DRIOUECH Yousra

*BELGUET Yousra

Devant le jury :

Nom	Grade/ Lieu	Qualité
Mme GUESSAIBIA N.	MCB/USDB1	Présidente
Mr KHEIR M.	MCA/USDB1	Examineur
Mme CHERRALLAH A.	MCB/USDB1	Promotrice
Mme ZAABAT N.	MCA /Pasteur	Co-promotrice

Promotion : 2021-2022

Remerciement

Elhamdoulillah le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Le présent mémoire n'aurait pas vu le jour sans l'aide bienveillante, la compréhension et le dévouement de certaines personnes qui, par leur présence et leurs conseils, nous ont soutenus.

Nous tenons tout d'abord à remercier notre promotrice : **Mme CHERRALLAH Amira** pour le thème qu'elle nous a proposé et pour la qualité de son encadrement exceptionnelle, pour sa patience et sa disponibilité durant la préparation de ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent aussi à notre co-promotrice : **Mme ZAABAT N** pour nous avoir ouvert les portes du laboratoire d'Immunologie Cellulaire de l'Institut Pasteur d'Alger, dans lequel elle travail, ainsi que pour son soutien durant la période de notre stage.

Nous voudrions remercier **Mme GUESSAIBIA N** de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury et d'avoir porté un intérêt à notre travail.

Nous remercions également **Mr KHEIR M** pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury.

Nous remercions énormément notre chef d'option **Mme SAADIL**, Pour tout ce qu'elle nous a donné au court de ces dernières années.

Un grand merci pour le personnel du laboratoire pour l'accueil, l'aide, le soutien, la disponibilité et l'encouragement qu'il nous a apporté, spécifiquement **Mr ZEMAM A** et **Mme REDJAH H.**

Nous tenons également à remercier **Dr. BENHLEL** pour nous avoir ouvert les portes de son laboratoire là où nous avons fait les prélèvements sanguins.

Nous adressons nos remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné durant notre cursus universitaire.

Enfin un merci à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réussite de notre travail.

Dédicaces

Je dédie cet humble travail :

À mes très chers parents qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours et pour qui aucune dédicace ne saurait exprimer le respect et l'amour que je leur porte.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi et avoir réalisé aujourd'hui l'un de vos rêves.

À mes chers frères

À ma chère petite sœur

À toute ma famille

Et à mes amis.

DRIOUECH Yousra.

Je dédie ce modeste travail :

À mes parents, il n'y a pas de mots ou de remerciement qui expriment ma gratitude pour m'avoir soutenue et encouragé durant mon cursus.

À mon mari pour le soutien et l'aide qu'il m'avait apporté. Je te souhaite tout le bonheur cher mari.

À mes petites sœurs, mon frère, qu'Allah accorde chacun de vous de brillantes études couronnées.

À mes chers camarades de promo 2022.

BELGUET Yousra.

Résumé

La performance sportive est un trait complexe qui varie d'un athlète à un autre, où un athlète mesure sa performance comme une progression vers l'excellence ou la réussite. Cette performance est influencée par plusieurs facteurs. Plusieurs études ont montré qu'il y'a plusieurs gènes impliqués dans la performance d'un athlète, parmi ces gènes, le gène *HFE* qui régule l'homéostasie du fer. Le but de notre travail est de rechercher les variants C282Y et H63D du gène *HFE* associés à la performance sportive chez des individus de la population générale et chez des athlètes de haut niveau. Afin de réaliser ce travail, nous avons fait en premier temps des prélèvements sanguins sur deux panels afin de réaliser l'extraction d'ADN des témoins de la population générale ainsi que des athlètes d'élite. Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'effectuer une PCR simple pour amplifier les exons 2 et 4 du gène *HFE*. Suite aux extractions d'ADNs réalisées, nous pouvons dire que la plupart des ADNs de nos échantillons sont purs et de bonne qualité. Après les différentes tentatives de mise au point de la technique PCR, nous avons réussi à amplifier les deux exons 2 et 4 du gène *HFE*. Cette amplification devra cependant être refaite avec de nouveaux réactifs et dans de meilleures conditions pour permettre la suite des explorations, à savoir le séquençage des exons 2 et 4 à la recherche des variants C282Y et H63D.

Mots clés : performance sportive, gène *HFE*, variants C282Y et H63D, athlète de haut niveau.

Abstract

Sports performance is a complex trait that varies from one athlete to another, where an athlete measures his performance as a progression towards excellence or success. This performance is influenced by several factors. Several studies have shown that there are several genes involved in an athlete's performance, among these genes, the *HFE* gene which regulates iron homeostasis. The aim of our work is to research for the C282Y and H63D variants of the *HFE* gene associated with sports performance in individuals of the general population and in high-performance athletes. In order to carry out this work, we first took blood samples from two panels in order to extract DNA from the witnesses of the general population as well as elite athletes. In a second step, we tried to perform a simple PCR to amplify exons 2 and 4 of the *HFE* gene. Following the ADN extractions, we can say that most of the ADN of our samples are pure and of good quality. After the various attempts to develop the PCR technique, we succeeded to amplify the two exons 2 and 4 of the *HFE* gene. However, this amplification will have to be redone with new reagents and under better conditions to allow the continuation of the explorations, namely the sequencing of exons 2 and 4 in search of the C282Y and H63D variants.

Keywords : sports performance, *HFE* gene, C282Y and H63D variants, high level athlete.

ملخص

الأداء الرياضي هو صفة معقدة تختلف من رياضي إلى آخر ، حيث يقيس الرياضي أدائه باعتباره تقدمًا نحو التميز أو النجاح. يتأثر هذا الأداء بعدة عوامل. أظهرت العديد من الدراسات أن هناك العديد من الجينات المشاركة في أداء الرياضي ، من بين هذه الجينات ، جين *HFE* الذي ينظم توازن الحديد. الهدف من عملنا هو البحث عن متغيرات *C282Y* و *H63D* من جين *HFE* المرتبط بالأداء الرياضي لدى الأفراد من عامة السكان والرياضيين ذوي المستوى العالي. من أجل تنفيذ هذا العمل، أخذنا أولاً عينات دم من فئتين لاستخراج الحمض النووي من شهود من عامة السكان وكذلك من الرياضيين رفيعي المستوى. ثانيًا، حاولنا إجراء PCR بسيط لتضخيم الإكسونين 2 و 4 من جين *HFE* . بعد عمليات استخراج الحمض النووي التي تم إجراؤها ، يمكننا القول أن معظم الحمض النووي لعيناتنا نقي وذو نوعية جيدة. بعد محاولات مختلفة لإتقان تقنية PCR ، نجحنا في تضخيم الإكسونين 2 و 4 من جين *HFE* . ومع ذلك ، يجب إعادة بناء هذا التضخيم باستخدام كواشف جديدة وتحت ظروف أفضل للسماح بمواصلة الاستكشافات ، أي تسلسل الإكسونين 2 و 4 بحثًا عن المتغيرات *C282Y* و *H63D* .

الكلمات المفتاحية : الأداء الرياضي، جين *HFE* ، المتغيرات *C282Y* و *H63D* ، رياضي ذو المستوى العالي.

Table des matières

Introduction	1
Recherche bibliographique.....	2
Chapitre I.....	3
I.1. La performance sportive.....	3
I.2. Athlètes de haut niveau	3
I.3. Différents facteurs qui influencent la performance sportive	4
I.3.1. Facteurs environnementaux	4
I.3.2. Facteurs physiologiques.....	4
I.3.3. Facteurs technologiques.....	5
I.3.4. Facteurs génétiques.....	5
I.4. Rôle de la génétique dans la performance sportive.....	6
I.4.1. Gènes impliqués dans la performance sportive	6
Chapitre II	9
II.1. Structure du gène <i>HFE</i>	9
II. 2. Structure de la protéine HFE.....	10
II.3. Rôle de la protéine HFE.....	12
II.4. Mutations du gène <i>HFE</i>	12
II. 4.1.Mutation C282Y	13
II.4.2. Mutation H63D	13
II. 4.3.Mutation S65C	13
Chapitre III	15
III.1. Le métabolisme du fer	15
III.2. Intervention de la protéine HFE	17
III.3. Rôle de l'hepcidine.....	18
III.4. Relation entre les deux mutations du gène <i>HFE</i> et la performance sportive	18
Matériel & Méthodes	20
I. Matériel	21
I.1. Matériel biologique	21
I.2. Matériel non biologique	24
II. Méthodes	24

II.1. Extraction de l'ADN totale par salting out.....	24
II.2. Estimation de la concentration de l'ADN.....	26
II.3. Recherche par PCR simple les exons 2 et 4 du gène <i>HFE</i>	27
II .3.1. Mise au point de la technique PCR simple.....	29
II.4. Mise en évidence des profils d'amplification	31
Résultats et discussion.....	32
I. Vérification de la concentration et de la pureté de l'ADN par le Nanodrop.....	34
II. Amplification génique par PCR simple des exons 2 et 4 du gène <i>HFE</i>	37
II.1. Mise au point de PCR simple des exons 2 et 4 du gène <i>HFE</i>	37
Conclusion et perspective.....	46
Références bibliographiques	48

Annexe

Liste des figures

Figure 1 : Structure du gène <i>HFE</i>	10
Figure 2 : Structure de la protéine HFF.....	11
Figure 3 : Régulation de l'homéostasie du fer.....	15
Figure 4 : Régulation de l'expression de l'hepcidine.....	17
Figure 5 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR. La flèche blanche : migration.....	38
Figure 6 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR. La flèche blanche : migration.....	39
Figure 7 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR. La flèche blanche : migration.....	40
Figure 8 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR. La flèche blanche : migration.....	41
Figure 9 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR. La flèche blanche : migration.....	42
Figure 10 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR. La flèche blanche : migration.....	43
Figure 11 : illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR, M : marqueur de taille 100pb lader. La flèche blanche : migration.....	44

Figure annexe

Figure 1 : questionnaire dans le cadre de recherche scientifique

Liste des tableaux

Tableau I : Gènes étant potentiellement impliqués dans les performances sportives.....	8
Tableau II : Données relatives aux témoins.....	22
Tableau III : Données relatives aux athlètes de haut niveau.....	24
Tableau IV : Mise au point de la PCR.....	30
Tableau V : Vérification de la pureté et la concentration d'ADN des témoins.....	34
Tableau VI : Vérification de l'ADN des athlètes.....	36

Tableaux annexe

Tableau I : Matériels non biologique utilisés dans notre travail.

Liste des abréviations

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine.

ACTN3 : Alpha-actinine3.

BMP : Bonne Morphogénétique Protéines.

CMH : Complexe majeur d'Histocompatibilité.

DCYTB : Duodéna1 cytochrome B fer réductase.

DMT1 : Divalent metal transporter.

EPO : Erythroprotéine.

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes.

FPN : Ferroportine.

GABA : Acid gamma-aminobutyrique.

GAD : Glutamate décarboxylase.

GH : Growth hormone.

GHRH : Growth hormone releasing hormone.

HAMP : Hepsidine antimicrobide peptide.

HEP : Héfastine ferroxidase.

HFE : Régulateur de fer homéostatique.

HGE : Hépatogastro-entérologie.

HjV : Hémojuveline.

IGF : Insulin-like growth factor.

LMP: Latent Membrane Proteins.

Nramp2 : Natural resistance-associated macrophage protein 2 .

POMC : Pro-opiomélanocortine.

PPRD: Pentatricopeptide repeat.

SLC : Gène porteur de soluté humain.

TfR : Récepteur de la transferrine.

TGF: Transforming growth factor.

Introduction

Introduction

La performance sportive est définie comme les possibilités maximales d'un athlète dans une discipline, à un moment donné de son développement.

Un athlète de haut niveau, présente des capacités biologiques hors de la normale, qui résultent de l'interaction entre son génome et son environnement.

Les sports de haut niveau nécessitent plusieurs paramètres pour atteindre la haute performance, parmi ces paramètres la morphologie corporelle, la puissance et l'endurance.

Par ailleurs, différents facteurs influencent la performance positivement ou négativement. Ces facteurs ont un impact direct ou indirect comme exemple, les facteurs environnementaux, et les facteurs génétiques.

Au cours de ces dix dernières années, plusieurs études se sont concentrées sur la relation entre la performance sportive et les polymorphismes génétiques. Différents gènes candidats ont été identifiés comme participant à la performance de haut niveau. Parmi ces gènes, le gène régulateur de l'homéostasie du fer, *HFE*.

Le fer est indispensable à la synthèse de l'hémoglobine, qui transporte l'oxygène vers tous les tissus, et à la myoglobine, qui joue un rôle énergétique dans les muscles. Par ailleurs, le métabolisme du fer est régulé par l'hepcidine, une hormone gouvernée par le gène *HFE*. Ce dernier code pour une protéine HFE, qui à son tour favorise l'augmentation de la production de l'hepcidine qui conduit à une diminution de l'absorption du fer.

D'après les études faites par le Pr Olivier Hermine et Pr Gérard Dine, les mutations C282Y et H63D du gène *HFE*, sont considérés comme des facteurs positifs pour la performance sportive, en donnant un avantage aux sportifs de haut niveau qui en sont porteurs en raison d'une meilleure absorption du fer et une meilleure reconstitution musculaire ainsi qu'une meilleure fabrication des globules rouges (**Hermine et al., 2015**).

L'objectif de ce travail sera de tenter de rechercher la présence ou l'absence des variants les plus fréquemment décrits dans le gène *HFE* (C282Y et H63D) chez des individus de la population Algérienne et enfin si le temps et les moyens le permettent, nous tenterons d'établir l'association entre ces variants génétiques et la performance sportive en travaillant sur un panel d'athlètes de haut niveau.

Recherche bibliographique

I. Chapitre I

I.1. Performance sportive

La performance physique est multifactorielle, elle est déterminée par plusieurs facteurs tels que les facteurs environnementaux (la prise en charge, la qualité de l'entraînement physique et le régime nutritionnel), les facteurs physiologiques comme le métabolisme musculaire, le contrôle cardiovasculaire, etc..., les facteurs psychologiques et neuronaux qui contribuent également au succès des performances sportives grâce à la solidité mentale, à l'anticipation et à la motivation à subir et tolérer la douleur pendant l'entraînement et la compétition (**El Helou et al., 2011**). Les facteurs génétiques participent également à la performance sportive, car cette dernière se manifeste en tant que phénotype complexe sensiblement déterminé par le potentiel génétique (**Macarthur et al., 2005**).

I.2. Athlètes de haut niveau

Les athlètes de haut niveau sont des êtres humains complexes et souvent singuliers dont les capacités physiques, physiologiques, psychologiques et comportementales sont en dehors de la norme (**Speed et al., 2010**).

Ils peuvent, par exemple, être dotés d'une capacité pulmonaire totale (volume d'air mesuré lors d'une exploration respiratoire) de 9 litres ou d'une consommation maximale d'oxygène (VO₂ max) > De 0.8 litre /kg/min. Chez un individu normal par exemple, le volume de l'air mesuré est environ 0,5 litre (cette quantité peut s'élever à près de 2 litres au maximum). Par ailleurs, les athlètes de haut niveau peuvent endurer plus de 200 km de course à pied par semaine ou soulever deux fois leur poids corporel (**Speed et al., 2010**).

I.3. Facteurs influençant la performance sportive

I.3.1. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux peuvent modifier les résultats en fonction des règles de la discipline, en fonction du milieu de mobilité (neige, eau, air...), en fonction du type d'activité (course, natation, vélo) et selon la durée de l'événement.

La performance atteindra rapidement ses limites asymptotiques, suggérant que les conditions environnementales et climatiques affectent parfois la performance sans modifier la tendance séculaire de progression qui se dirige vers ses limites (**El Helou et al., 2010**).

Des études ont montrés que parmi les paramètres environnementaux, le principal facteur qui influence la performance (vitres de course) est la température de l'air quel que soit le niveau de performance de l'athlète (**Tsianos et al., 2010**).

I.3.2. Facteurs physiologiques

Les capacités physiques ont des composantes sensorielles et motrices interdépendantes, les athlètes d'élite affichant non seulement une plus grande précision dans l'exécution, mais également des performances supérieures dans la perception, l'anticipation et la prise de décision (**Wilmore et al., 2006**).

Ces meilleures performances sont spécifiques à la tâche et dépendent d'un entraînement intensif et dans une certaine mesure, de différences innées entre les individus. Il existe des preuves de changements structurels et physiologiques dans le cortex sensoriel et moteur avec l'entraînement : changements analogues dans le cortex frontal médial et latéral, le cortex pariétal postérieur et les structures sous-corticales qui accompagnent la perception, la planification et la prise de décision chez les athlètes de haut niveau (**Yarrow et al., 2009**).

La compréhension des mécanismes neuronaux qui distinguent les athlètes d'élite des autres athlètes peut fournir la base d'un raffinement supplémentaire des stratégies d'entraînement.

I.3.3. Facteurs technologiques

La science et les nouvelles technologies jouent un rôle très important pour améliorer et optimiser la performance des athlètes. Via des techniques de formation plus avancées et des avancées technologiques dans les équipements sportifs, les athlètes ont repoussés leurs limites et ont fixés de nouveaux seuils déterminant les performances maximales.

La technologie permet également, par le biais de la modélisation par exemple, d'observer l'évolution des performances sportives, d'identifier les limites humaines et de prédire les futures performances (**Berthelot et al., 2008**).

La compétition sportive se tourne davantage vers la technologie et vers les industries permettant ces innovations. On l'observe dans plusieurs sports : patinage de vitesse, cyclisme, Natation... où les innovations technologiques récentes ont révolutionné les performances (**Neptune et al., 2009**) (**Filipp et al., 2007**).

Aujourd'hui, la science des matériaux est devenue un facteur décisif majeur des sports. Les avancées technologiques dans les nouvelles conceptions de piscines et de nouvelles combinaisons qui apportent une augmentation soudaine des performances permettant ainsi aux athlètes de dépasser des limites physiologiques qui sont déjà sur le point d'être atteintes (**Berthelot et al , 2010**) (**Filipp et al., 2007**).

I.3.4. Facteurs génétiques

Le bagage génétique d'un athlète influence ses capacités physiques, car l'entraînement et la nutrition ne sont pas suffisants. Le bagage génétique peut conférer un avantage à la performance en modifiant et augmentant la capacité de transport d'oxygène des globules rouges ainsi que le transport du fer (**El Helou et al., 2011**).

I.4. Rôle de la génétique dans la performance sportive

Certaines mutations génétiques peuvent contribuer à la performance sportive, il y'a parmi ces mutations celles qui participent à l'augmentation de la disponibilité du fer et une meilleure capacité de transport d'oxygène (**El Helou et al., 2011**).

La génétique peut également contribuer au succès de l'angiogenèse chez les athlètes d'élite (Wahl et al., 2014) car, la néo-angiogenèse facilite l'apport d'oxygène par les globules rouges aux muscles, les rendant disponibles pour favoriser le métabolisme musculaire (Brodal et al., 1977) .

I.4.1. Gènes impliqués dans la performance sportive

La prédisposition génétique des athlètes de haut niveau et leur phénotype qui résulte d'interactions entre leurs gènes et l'environnement leur permettent d'accomplir ces performances sportives maximales (El Helou et al., 2011).

Plusieurs gènes semblent présenter un potentiel d'amélioration des performances physiques afin d'acquérir des caractères du sport d'endurance. Le tableau I résume le rôle de quelques gènes impliqués dans la performance sportive.

Plus de détails seront donnés sur le gène *HFE* plus bas dans ces généralités, puisque c'est sur ce gène que se concentre notre étude.

Tableau I : Gènes potentiellement impliqués dans les performances sportives
 (Gatzidou et al., 2009) (Pérusse et al., 2003) (Baoutina et al., 2007).

Le gène	Protéine	Potentiel d'amélioration des performances	Leur rôle dans la performance sportive
ACTN3 (chromosome 11 q)	Alpha- actinine-3.	Performance vitesse	Responsable de la génétique de la force rapide. (les fonctions de fibres musculaires rapides)
ACE (pour allèle ACE1 situé sur le chromosome 17 q)	Enzyme de conversion de l'angiotensine 1.	Performance endurance	Diminution de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensin-1 qui va induit une augmentation de l'efficacité mécanique des muscles.
VEGE, FGF, HGE, HIF1A, gène pour Del-1		Endurance accrue	augmenter la production de nouveaux vaisseaux sanguins, la perfusion tissulaire et l'apport d'oxygène et de nutriments
Gène pour BMP, LMP, IGF,FGF, ...		Fracture osseuse et cicatrisation articulaire	Large éventail de fonctions associées à la formation osseuse
EPO (chromosome 7q)	Erythropoïétine	endurance accrue	stimule l'érythropoïèse, augmente l'oxygénation du sang et l'apport d'oxygène aux tissus

Recherche bibliographique

<i>GH, GHRH (chromosome 2 HI).</i>	Hormone de libération de l'hormone de croissance.	effets anabolisants - augmentation de la masse musculaire et de la force	Régulateur positif de la croissance musculaire
Gène pour GAD, POMC, IL-4		soulagement de la douleur	Bloquer la transmission des signaux de douleur des nerfs endommagés au cerveau en déclenchant la production du puissant neurotransmetteur inhibiteur GABA(GAD)
<i>PPRD</i>		Endurance accrue	Récepteur hormonal nucléaire, régulateur transcriptionnel du catabolisme des acides gras dans le tissu adipeux et dans le muscle squelettique
<i>HFE</i> (chromosome 6q)	Protéine de l'hémochromatose humaine	Endurance accrue	Augmentation de l'absorption du fer et augmentation de la capacité de transport d'oxygène des globules rouges

II. Chapitre II

II.1. Structure du gène *HFE*

L'identification du gène *HFE* par Feder et ces collaborateurs en 1996, jouait un rôle important dans la compréhension du CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) (Feder *et al.*, 1996).

HFE est un gène organisé en 7 exons et cinq introns. Ce gène est localisé sur le brin court du chromosomes 6 (6p21.3), à environ 4,5 mégabases télomériques de HLA-A, d'une longueur de 12 KB (Barton *et al.*, 2015). (Figure1)

Ce gène code pour la protéine HFE. L'exon 1 code le peptide signal, les exons 2-4 codent les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ respectivement, l'exon 5 correspond au domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique est codée par la partie 5' de l'exon 6 qui comprend un codon stop (de Campos *et al.*, 2019).

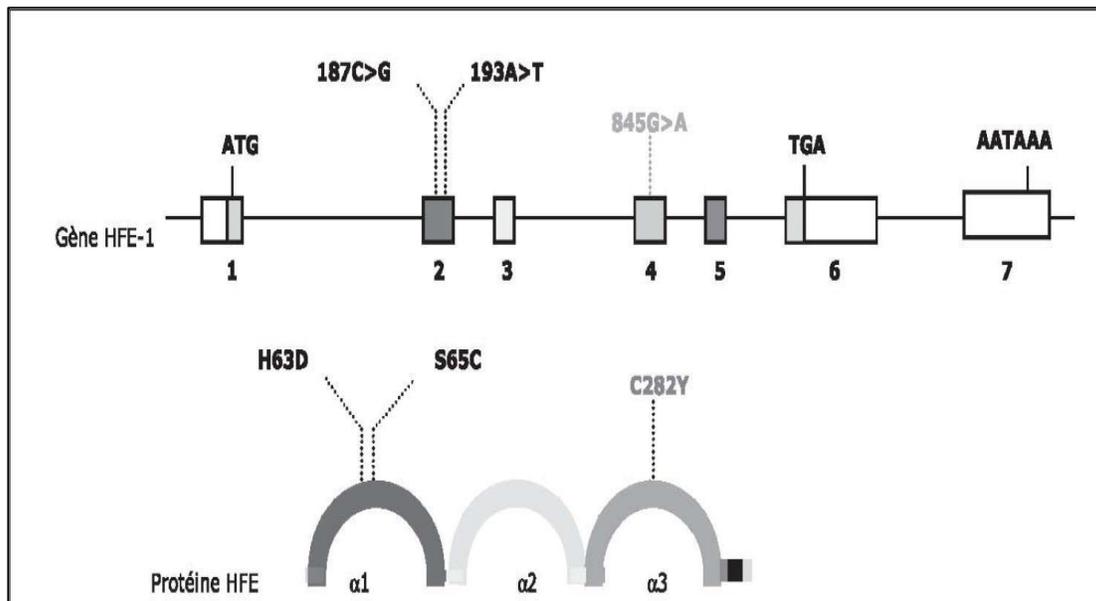


Figure 1 : structure de gène *HFE* (Bruce *et al.*, 2015)

II.2. Structure de la protéine HFE

HFE est un membre ancien de la famille du CMH. La protéine HFE humaine se compose de 343 acides aminés, homologues aux molécules du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Elle comporte ainsi trois domaines extracellulaires (α_1 , α_2 et α_3), une région transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (**Barton et al., 2015**).

La protéine HFE est exprimée par des cellules épithéliales intestinale appeler entérocytes cryptiques. Cette protéine a un faible niveau, par les macrophages, les cellules de kuppfer et les cellules endothéliales (**Biomnis., 2012**).

La protéine HFE est constituée de 3 domaines extracellulaires (α_1 , α_2 et α_3), segment d'ancrage transmembranaire et une courte queue intracytoplasmique. Sa structure tridimensionnelle est en partie liée à l'existence d'un pont disulfure interne entre 2 cystéines (**Lebron et al., 1998**). (**Figure 2**)

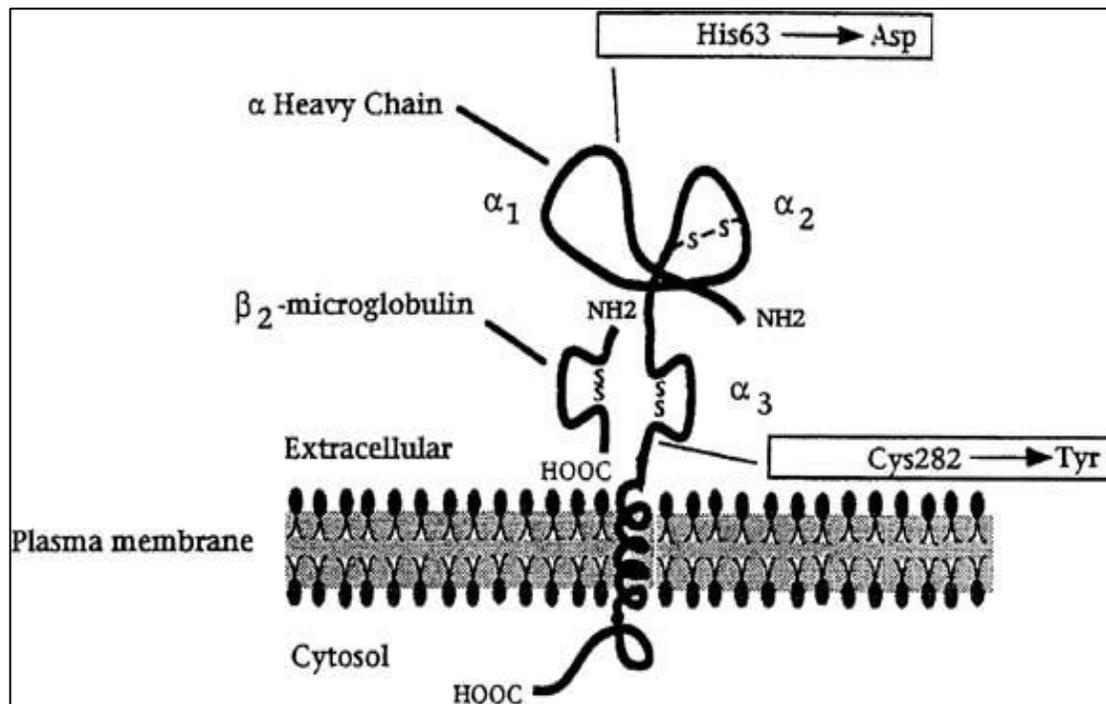


Figure 2 : structure de la protéine HFE (**Bruce et al., 2001**)

II.3. Rôle de la protéine HFE

La protéine HFE joue un rôle essentiel non seulement dans la régulation fine de l'absorption intestinale, mais aussi dans celle de son stockage et de son recyclage par les macrophages du système réticulo-endothélial (rate, moelle, foie) (**Bennett et al., 2000**) (**Bahram et al., 1999**).

Renseigner les entérocytes de la crypte des villosités de pôle basolatérale sur l'état de charge en fer qui vont faciliter ou diminuer l'absorption du fer alimentaire (**biomnis et al., 2012**).

En cas de répression de la protéine chez les sujets homozygote C282Y, les entérocytes de cryptes se comportent comme des cellules déficientes en fer (**biomnis et al., 1996**).

II.4. Mutations du gène *HFE*

Il existe à ce jour un grand nombre de mutations qui ont été mises en évidence dans le gène *HFE*. On a ainsi pu répertorier plus de 4765 SNPs dont 11 sont retrouvés de manière relativement fréquentes. De plus, en utilisant la base de données (Ensembl genome browser), on a trouvé plusieurs polymorphismes associés à des phénotypes différents: 55 SNPs impliqués dans l'Hémochromatose de type 1, 27 SNPs impliqués dans l'Hémochromatose Hériditaire, 4 SNPs pour les troubles du spectre autistique ou schizophrénie, 3 SNPs associés à la maladie d'Alzheimer, et d'autres phénotypes telles que : la Porphyrie cutanée tardive familiale, la Porphyria variegata et des Complications microvasculaires du diabète (**OMIM**).

En utilisant les bases de données OMIM et dbSNP nous avons pu obtenir la description et l'épidémiologie des SNPs du gène *HFE* qui semblent être associés à la performance physique. En effet, il semblerait qu'il existe trois SNPs d'intérêts (C282Y, H63D, S65C) qui seraient impliqués dans la performance physique (**Hermine et al., 2015**).

II.4.1. Mutation C282Y

C'est la plus importante mutation, correspondant à la transition d'une base azotée, la guanine en adénine au niveau du nucléotide 845. Cette mutation est responsable de la substitution au niveau du codon 282 de l'acide aminé cystéine par une tyrosine (**Lucotte et al., 2001**).

Cette mutation, lorsqu'elle est retrouvée à l'état homozygote, associée au minimum à une élévation du coefficient de saturation de la transferrine permet d'établir le diagnostic d'hémochromatose *HFE* (**Biomnis, 2012**).

En association avec la mutation de p.cys282tyr à l'état hétérozygote, les variants p.His63Asp et p.ser65cys peuvent contribuer à la survenue d'une surcharge en fer modérée (**biomnis, 2012**).

La mutation C282Y abolit la formation d'un pont disulfure intra-chaîne au niveau du domaine alpha3, compromettant le repliement correct du domaine alpha3 et son interaction avec la beta2 macroglobuline. Cette mutation est responsable d'une anomalie dans le routage de la protéine HFE vers la membrane cellulaire. Cette protéine retenue dans le compartiment réticulo-endoplasmique est dégradée, aboutissant à une répression d'HFE et donc à une absence de protéine à la surface des cellules (**biomnis, 2012**).

II.4.2. Mutation H63D

La deuxième mutation identifiée était de la transversion d'une cytosine en guanine au nucléotide 187, ce qui entraîne une substitution de l'acide Aspartique en histidine à l'acide aminé 63. Cette mutation mineure est la p.His63Asp ou H63D. La mutation H63D ne se produit pas, sauf dans de très rares cas, sur le même allèle que C282Y (**Lucotte et al., 2001**).

II.4.3. Mutation S65C

La mutation S65C est due au remplacement (transversion) de la base azoté adénine par la thymine ce qui provoque la substitution de l'acide aminé sérine en position 65 par une cystéine au niveau de la protéine HFE (**Gerald et al., 2005**).

Cette dernière est moins fréquente que les deux mutations précédentes C282Y et H63D).

Elle semble impliquée dans l'hémochromatose de type 1 et sa fréquence est de 2 % en Europe et absente en Asie et en Afrique.

III. Chapitre III

III.1. Le métabolisme du fer

Le fer est un élément indispensable au fonctionnement cellulaire, il joue un rôle critique dans de nombreux processus biologiques, tels que la synthèse de l'ADN, la respiration cellulaire et sa fonction principale est le transport de l'oxygène via l'hémoglobine (Chung *et al.*, 2003). Mais l'excès de fer est aussi potentiellement dangereux, sa toxicité repose en grande partie sur sa capacité à s'engager dans des réactions d'oxydoréduction aboutissant à la formation de radicaux libres toxiques, qui favorisent la mort cellulaire et les lésions tissulaires (Papanikolaou *et al.*, 2005).

Le Fe^{3+} alimentaire est réduit en Fe^{2+} , par une réductase membranaire (Dcyt B [Duodenal cytochrome B]) localisée dans les bordures en brosse des entérocytes (McKie *et al.*, 2001).

Le fer est transporté par la suite à travers la membrane par Nramp2/DMT1 (Gunshin *et al.*, 1997).

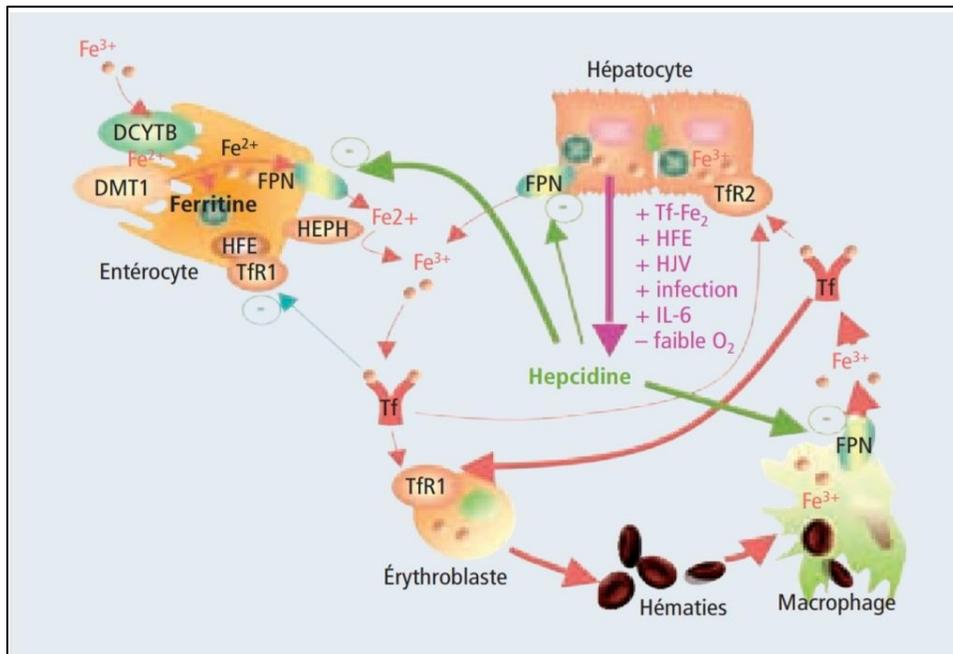


Figure 3 : Régulation de l'homéostasie du fer (Louiset, 2009).

L'ion Fe^{3+} , présent dans la lumière de l'intestin, est réduit en Fe^{2+} par l'enzyme DCYTB (le cytochrome B fer-réductase). Le Fe^{2+} peut rentrer dans les entérocytes par l'intermédiaire d'un transporteur transmembranaire de métal divalent (DMT1) situé au pôle apical des cellules. Le fer est stocké dans les entérocytes en se liant à la ferritine ou exportée par la ferroportine 1 (FPN) localisée au pôle basal des cellules.

Il est réoxydé en Fe^{3+} par l'héphaestine (HEPH) et transféré dans le sang en raison de la transferrine (Tf) jusqu'au site d'utilisation ou stockage du fer. Tf- Fe^{2+} va se lier à son récepteur haute affinité (TfR1) exprimée par les cellules consommatrices du fer pour leur fournir les ions nécessaires pour leur activité cellulaire telle que la synthèse de l'hémoglobine dans les érythroblastes. Le Fe^{3+} des hématies est recyclé par les macrophages.

Le Tf- Fe^{2+} interagit avec plusieurs autres protéines, dont le complexe formé par les protéines de l'hémochromatose (HFE) et la β 2-microglobuline des entérocytes pour réduire l'absorption intestinale du fer. Tf- Fe^{2+} se lie également à un récepteur de moindre affinité (TfR2) exprimé par les hépatocytes. Fe^{3+} est stocké dans les hépatocytes sous forme de ferritine.

Le fer contenu dans les hépatocytes ou les macrophages peut ensuite être déversé ultérieurement dans la circulation grâce à la ferroportine 1 pour une nouvelle utilisation, sous le contrôle négatif d'une hormone, l'hepcidine, produite par les hépatocytes. La sécrétion d'hepcidine est stimulée par Tf- Fe^{2+} HFE, l'hémojuveline (HJV), une infection ou l'il-6, mais est inhibée par une hypoxie (Louiset, 2009) (Figure 3).

III.2. Intervention de la protéine HFE

L'interaction de la protéine HFE avec les récepteurs de la transferrine (TfR1 et TfR2) joue également un rôle critique dans la régulation de l'hepcidine.

L'HFE et les récepteurs hépatocytaires de la transferrine 1 et 2 (TfR1, TfR2) fonctionnent comme des capteurs de fer extracellulaires, en détectant les concentrations de fer lié à la transferrine dans la circulation sanguine.

L'HFE entre en compétition avec la transferrine(Tf). Lorsque les niveaux de fer sérique sont faibles, l'HFE se lie avec le TfR1. Si la concentration de fer sérique augmente, la transferrine se lie avec TfR1 dû à son affinité accrue, ce qui entraîne le déplacement de HFE.

L'HFE libéré se lie avec TfR2. Ce complexe interagit ensuite avec l'hémojuveline (HJV) et renforce la voie de signalisation BMP, conduisant ainsi à la transcription de l'hepcidine.

Par conséquent, le déficit en HFE ou le dysfonctionnement de la voie BMP/SMAD entraîne une diminution de la synthèse de l'hepcidine, conduisant ainsi à une surcharge en fer (Vogt et al., 2021) (Figure 4).

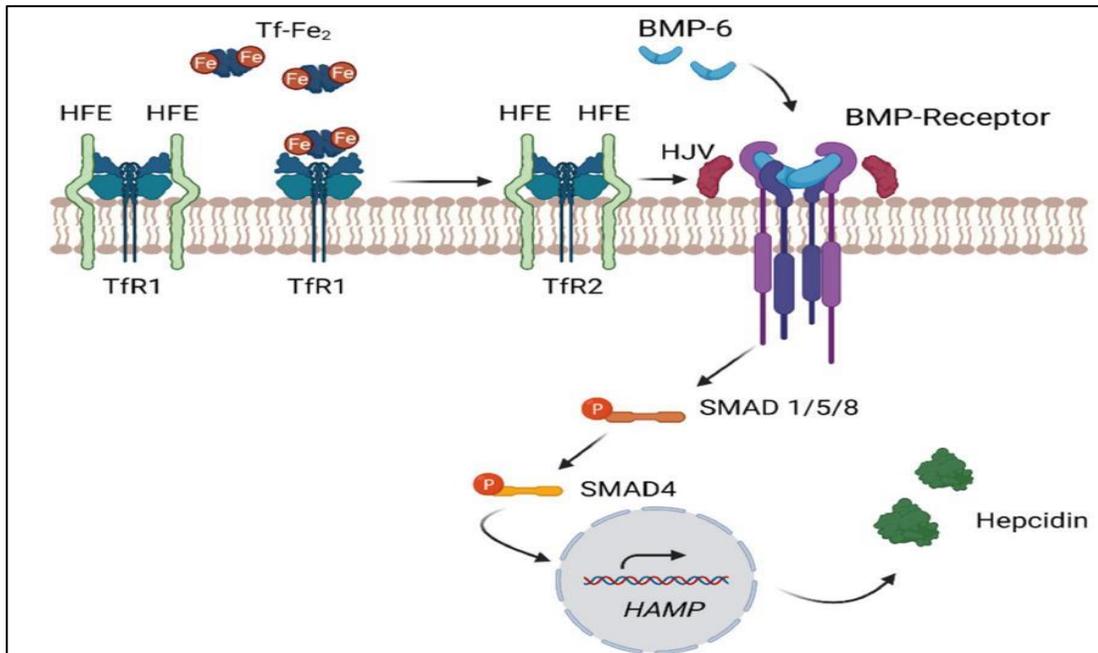


Figure 4 : Régulation de l'expression de l'hepcidine (Vogt et al., 2021).

III.3. Rôle de l'hepcidine

L'hepcidine est une hormone peptidique, synthétisée principalement dans le foie et sécrétée sous forme de peptides de 20-25 acides aminés (Nicolas *et al.*, 2003).

Cette hormone hépatique joue un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie du fer (Estelle, 2009), produite par les hépatocytes en réponse à une augmentation des taux sériques du fer dans l'organisme ou en cas d'inflammation (Nicolas *et al.*, 2002, 2003).

L'hepcidine agit sur l'expression de la ferroportine à la surface des entérocytes et des macrophages, en fonction des réserves en fer et des besoins nécessaires à la synthèse des hématies, l'érythropoïèse. Elle contrôle les changements dans les différents niveaux de fer disponibles et s'assure de leur maintien à des taux très précis. Ce contrôle se fait par l'intermédiaire de la ferroportine, protéine de Transport du fer, à laquelle l'hepcidine se lie (Nemeth *et al.*, 2006).

III.4. Relation entre les mutations C282Y et H63D du gène *HFE* et la performance sportive

La mutation C282Y perturbe la liaison disulfure dans le domaine extramembranaire de la protéine HFE, empêchant sa liaison au TfR1 (Philippe, 2014).

Le variant H63D forme un complexe stable avec TfR1, ce qui affecte légèrement l'absorption du fer et entraîne rarement une surcharge en fer (philippe, 2014). Dans plusieurs études, des fréquences plus élevées de *HFE* H63D ont été trouvées chez les athlètes d'endurance tels que les cyclistes.

Les mutations C282Y et H63D à l'état homozygote ou hétérozygotes composites, résultent en la perte de fonction du gène *HFE*, ce qui entraîne des maladies tel que l'hémochromatose qui est caractérisée par l'accumulation excessive du fer dans l'organisme (Barton et Edwards, 1993 ; Barton *et al.*, 2015).

Le taux élevé du fer et qui est inférieur au seuil pathologique, peut être bénéfique pour la performance sportive car le polymorphisme *HFE* H63D a une capacité à se lier au récepteur de la transferrine, ce qui entraîne une augmentation du transport du fer dans le

sang et les cellules, conduisant le transport et l'apport de l'oxygène aux muscles, par conséquent, il est plausible que toute altération de l'absorption du fer se traduise par une augmentation du fer circulant et une augmentation de la disponibilité de l'oxygène, les deux sont importantes pour la performance (**Raffaele et al., 2019**).

La mutation H63D du gène *HFE* peut fournir un avantage à l'endurance. Le polymorphisme H63D est fonctionnel, lorsque l'allèle G rare réduit la capacité de la protéine HFE à se lier à ses ligands, entraînant une augmentation du transport circulatoire du fer intracellulaire (**Feder et al., 1998**). L'hypothèse selon laquelle un polymorphisme H63D du gène *HFE* favorise les performances d'endurance a été confirmée dans une étude fonctionnelle, où l'allèle G s'est avéré associé à une augmentation du $\dot{V}O_{2\max}$ chez les athlètes d'endurance russes (**Ekaterina et al, 2019**).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du service d'immunologie laboratoire d'immunologie cellulaire de l'institut Pasteur d'Alger, durant une période de six mois, de mars à septembre 2022.

Il s'agit d'une étude génétique réalisée sur 33 témoins et 10 athlètes de haut niveau.

Notre étude avait pour objectif de tenter de rechercher les variants les plus fréquemment décrits dans la littérature dans le gène *HFE* (C282Y et H63D) chez des témoins de la population Algérienne et enfin si le temps et les moyens le permettent, nous tenterons de mettre en évidence une association entre ces variants génétiques et la performance sportive chez des athlètes de haut niveau.

I. Matériel

I. 1. Matériel biologique

Tous les individus qui ont participé à ce travail ont donné leur accord en signant un consentement éclairé. De plus, tous ont fournis des renseignements en se basant sur un questionnaire préalablement établi (**Annexe 1**).

Le **Tableau II** résume les données récoltées pour le groupe témoin (33 individus) et le **Tableau III**, ceux pour les athlètes de haut niveau (10 individus).

Tableau II : Données relatives aux témoins.

Numéro	Sexe	Age	Origine
T1	F	37 ans	Tizi Ouzou
T2	M	22 ans	Ain Defla
T3	M	31 ans	Blida
T4	M	22 ans	Jijel
T5	F	51 ans	Médéa
T6	M	25 ans	Blida
T7	M	24 ans	Tlemcen
T8	M	25 ans	Blida
T9	F	25 ans	Médéa
T10	M	21 ans	Jijel
T11	M	35 ans	Oran
T12	F	45 ans	Tizi Ouzou
T13	M	31 ans	Médéa
T14	F	31 ans	Oran
T15	F	21 ans	Blida
T16	M	31 ans	Blida
T17	F	26 ans	Blida

T18	M	24 ans	Blida
T19	F	24 ans	Ain Defla
T20	F	22 ans	Alger
T21	F	25 ans	Chlef
T22	M	22 ans	Blida
T23	F	24 ans	Ouargla
T24	F	25 ans	M'sila
T25	M	22 ans	Blida
T26	M	29 ans	Tébessa
T27	M	21 ans	Ain Defla
T28	M	29 ans	Blida
T29	M	27 ans	Médéa
T30	M	38 ans	Alger
T31	F	21 ans	Chlef
T32	M	40 ans	Blida
T33	F	38 ans	Tizi Ouzou

Tableau III : Données relatives aux athlètes de haut niveau.

Numéro	Sexe	Age	Discipline
A1	M	50 ans	Athlétisme triple saut longueur
A2	M	48 ans	Décathlon
A3	M	28 ans	Athlétisme 110 m haies/Rugby à 7
A4	M	15 ans	Athlétisme 400 m haies
A5	M	25 ans	Athlétisme saut en longueur
A6	M	17 ans	Athlétisme sprinter
A7	F	44 ans	Athlétisme lancer de marteau/Haltérophilie
A8	M	19 ans	Athlétisme saut longueur 100 m
A9	F	32 ans	Athlétisme heptathlon
A10	M	17 ans	Athlétisme 100 m/saut en longueur

I.2. Matériel non biologique (Annexe 2)

Le tableau I de l'Annexe 2, résume le matériel non biologique utilisé dans notre travail.

II. Méthodes

II. 1. Extraction de l'ADN totale par salting out

La première étape de notre travail consistait à réaliser une extraction d'ADN génomique par la méthode de "salting out".

A. Principe

La méthode de relargage salin ("salting out") se base sur la propriété qu'a une concentration saline à très forte molarité de précipiter une grande partie des débris générés par la lyse de la cellule. L'étape subséquente de précipitation de l'ADN par de l'éthanol permet alors de récupérer l'ADN (**Sambrook et al., 1989**).

B. Solution

- Solution de lyse des globules rouges « SLR » (10 mM Tris, pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl).
- Solution de lyse des globules blancs « SLB » (10 mM Tris, pH 7.6, 10 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM NaCl).
- SDS 10%, Protéinase K (10 mg/ml).
- Ethanol 100%.
- Ethanol 70 %
- NaCl 6 M.
- Eau distillée.

C. Mode opératoire

1. Prélever 10 ml de sang dans un tube avec anticoagulant (EDTA).
2. Transférer dans un tube de 50 ml.
3. Compléter à 45 ml avec la solution SLR glacée, mélanger puis mettre les tubes dans de la glace pendant 20 min.
4. Centrifuger à 5000 tpm pendant 15 min à 4°C, puis éliminer le surnageant constitué de globules rouges lysés.
5. Répéter les deux précédentes étapes jusqu'à éclaircissement du culot.

6. Resuspendre le culot constitué de globules blancs dans 2 ml de solution SLB, puis ajouter 300 µl de SDS 10 % et 20 µl de Protéinase K (10 mg/ml).
7. Incuber durant toute une nuit à 37°C sous agitation.
8. Ajouter 1 ml de NaCl 6 M et agiter vigoureusement pendant 15-20 secs.
9. Centrifuger à 5000 tpm pendant 15 min à 4°C.
10. Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 50 ml.
11. Ajouter 2 volumes d'Ethanol 100% glacé et mélanger doucement par retournement jusqu'à apparition de la méduse d'ADN.
12. Récupérer la méduse avec une pipette Pasteur et la transférer dans un microtube de 1.5 ml.
13. Laver la méduse avec 1 ml d'Ethanol 70% puis éliminer l'éthanol.
14. Répéter l'étape précédente une à deux fois selon le besoin.
15. Laisser sécher l'ADN à température ambiante.
16. Ajouter de l'eau distillée ou du tampon TE et laisser la méduse se resuspendre à 4°C.

II.2. Estimation de la concentration de L'ADN

Dans le cadre de notre travail, les ADNs ont directement été dosé par Nanodrop pour vérifier la qualité et la concentration des ADNs extraits.

A.Principe

Cet appareil permet la quantification et l'analyse de la pureté des acides nucléiques

La spectrophotométrie est la plus répandue et évalue la quantité d'acides nucléiques par mesure de l'absorbance à 260 nm. Leur pureté est évaluée en mesurant l'absorbance à 280 nm et 230 nm. Le ratio 260/280 permet de détecter une contamination des acides

nucléiques par des protéines. Sa valeur varie entre 1,8 et 2,0 pour de l'ADN. Lorsqu'il est plus faible, cela indique la présence de contaminants comme le phénol, l'EDTA, guanidine HCL etc. Cependant, la spectrophotométrie ne permet pas de distinguer les ADN et ARN dans une même solution. Une concentration d'ADN peut donc être surestimée à cause de la présence d'ARN ou de contaminants absorbant à 260 nm.

II.3. Recherche par PCR simple les exons 2 et 4 du gène *HFE*

A. Principe

La PCR ("Polymerase Chain Reaction" ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un segment particulier d'ADN, nommé ADN cible en utilisant deux amorces, courtes séquences d'ADN (18-24 nucléotides), qui s'hybrident en des sites complémentaires situés en orientation inversée sur les deux brins de l'ADN et qui encadrent la région que l'on veut amplifier. L'élongation des brins complémentaires à partir des amorces est alors assurée par une enzyme de polymérisation thermorésistante, la Taq polymérase dérivée d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus* et qui présente la propriété d'être stable à la chaleur (Mullis *et al.*, 1994).

La réaction PCR se déroule en un nombre répété de cycles (25-40), eux-mêmes composés de trois étapes généralement :

- une dénaturation de l'ADN à haute température (15-60 sec à 95-96°C) conduisant à la séparation des deux brins d'ADN.
- une hybridation des amorces spécifiques à une température dépendant de la composition nucléotidique des amorces et de leur longueur (15-60 sec à 50-65°C).
- une élongation des brins d'ADN, effectuée à 72°C pendant 15 sec-2 min selon la taille de la séquence à amplifier.

Compte tenu des conditions d'amplification précises qui caractérisent ces amplifications simultanées, une telle approche se révèle être complexe, mais d'une très grande utilité lorsque l'on veut explorer un gène d'une grande taille ou composé d'une multitude d'exons, comme cela est le cas pour le gène *HFE*.

B. Solutions

- Tampon PCR (10x, Invitrogen™).
- MgCl₂ (50 mM, Invitrogen™).
- dNTPs (mélange équimolaire de dATP, dTTP, dGTP, dCTP, à 10 mM chacun, Roche®).
- Amorces sens et reverse (WiraGen).
- Taq polymerase (5 U/μl, Roche®).

C. Mode opératoire

Une PCR simple permet d'amplifier les exons ciblés dans cette étude, à savoir les exons 2 et 4 du gène *HFE*.

1- La PCR simple a été réalisée dans un volume total de 25 μl contenant :

- 100 ng d'ADN génomique.
- 0.2 mM de dNTPS.
- 0.4 μM de chacune des amorces (sens et reverse) selon le pool.
- Une concentration variable en MgCl₂ jusqu'à l'obtention d'une bande nette, intense et sans qu'il y ai de fragment non spécifique.
- 5 U de Taq polymerase.
- un tampon d'amplification 1x final.

2- Les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur programmé pour le profil suivant :

A- Programme 1 : *HFE* exon 2

-94C°, 5min.

-94C°, 30sec.

-Nous avons changé la température plusieurs fois avant de trouver la bonne température d'hybridation, 30sec. *35

-72C°, 30sec.

-72C°, 10min.

-4C°, infini.

B- Programme 2 : *HFE* exon 4

-94C°, 5min.

-94C°, 30sec.

- Nous avons changé la température plusieurs fois avant de trouver la bonne température d'hybridation, 30sec. *35

-72C°, 30sec.

-72C°, 10min.

-4C°, infini.

II.3.1. Mise au point de la technique PCR simple

Le tableau suivant (IV) présente les différentes conditions expérimentales que nous avons choisies pour mettre au point la PCR pour les deux exons 2 et 4 du gène *HFE*.

Tableau IV : Mise au point de la PCR.

	Exon	Température d'hybridation	[MgCl₂]	Echantillons
Test 1	<i>HFE2</i>	54° C	1,5mM	T17, T2, T3, T4
	<i>HFE4</i>	55° C		
Test 2	<i>HFE2</i>	55° C	1,5mM	T3, T17
	<i>HEE2</i>	56° C		
Test 3	<i>HFE2</i>	53° C	2mM	T17, T2
	<i>HFE2</i>	54° C		
Test 4	<i>HFE2</i>	53° C	1,5mM	T17, T2, T3, T4
	<i>HFE4</i>	54° C		
Test 5	<i>HFE4</i>	53° C	1,5mM	T17, T2, T3, T4
	<i>HFE4</i>	54° C		
Test 6	<i>HFE4</i>	57° C	2mM	T17, T2, T3, T4
Test 7	<i>HFE2</i>	53° C	2mM	T17, T2, T3, T4
	<i>HFE4</i>	57° C	2,5mM	

II.4. Mise en évidence des profils d'amplification

A. Principe

Le contrôle des produits d'amplification sur gel d'agarose permet de s'assurer que la PCR s'est déroulée correctement, permettant ainsi d'apprécier :

- 1- qu'il y ait effectivement un produit d'amplification (dans notre protocole)
- 2- que ces fragments aient la taille attendue
- 3- qu'il n'y ait pas d'amplifications parasites ou de contaminants (**Sambrook et al., 1989**).

B. Solution

- (Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 1x (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.0).
- Bromure d'éthidium (30 mg/ml).
- Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60% Glycérol).
- Marqueur de poids moléculaire 100-Base pair ladder (1 µg/ml).

C. Mode opératoire

1. Préparer un gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE 1x supplémenté de bromure d'éthidium à une concentration finale de 0.5 µg/ml.
2. Préparer les échantillons : 5 µl de produit PCR + 1 µl de Bleu de dépôt
3. Déposer les échantillons et le marqueur de poids moléculaire dans le gel et laisser migrer à 120 V pendant 20min.
4. Révéler les produits d'amplification par exposition aux UV.

Résultats et discussion

A travers ce mémoire, nous avons essayé de mettre en évidence les variants génétiques C282Y et H63D du gène *HFE* chez une population algérienne. Ce travail a été réalisé au sein du service d'immunologie, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire de l'Institut Pasteur d'Alger.

Les échantillons qui ont fait l'objet de cette étude ont été obtenus sur la base des critères suivants :

- Echantillons hétérogènes.
- Signature un consentement éclairé.
- Récolte de certaines informations personnelle en se basant sur un questionnaire.

Nous avons réalisé notre étude sur deux panels, 33 individus sains de la population générale et 10 athlètes de haut niveau. Ces prélèvements ont été réalisés entre Février et Juillet 2022.

Nous avons réalisé les extractions d'ADN à partir du sang périphérique de nos échantillons, dans des tubes contenant un anticoagulant de type EDTA.

Notre choix s'était porté sur la technique d'extraction d'ADN par « salting out » ou autrement dit relargage salin, qui a comme avantages : la rapidité, de la simplicité d'exécution, de l'utilisation de réactifs limités et non toxiques, et au final d'une quantité non négligeable d'acide nucléique.

I. Vérification de la concentration et de la pureté de l'ADN par le Nanodrop

La mesure d'absorption d'un échantillon à 260 nm est une méthode largement utilisée pour la quantification de la concentration d'ADN. Cependant, plusieurs d'autres molécules absorbent à 260 nm comme l'ARN et d'autres substances conduisant à une surestimation de la quantité d'ADN et à sa faible concentration.

Les deux tableaux suivants présentent les résultats obtenus suite au dosage des ADNs extraits par le Nanodrop, pour les 33 témoins (**Tableau V**) et les 10 athlètes (**Tableau VI**) représentant la population algérienne.

Tableau V : vérification de la pureté et la concentration d'ADN des témoins.

Les témoins	[ADN] ng/µl	Ratio (260/280)
T1	300	1,887
T2	218,5	1,821
T3	454	1,900
T4	48	1,684
T5	239	1,498
T6	4	0,889
T7	4,5	1,286
T8	621,5	1,872
T9	141,5	1,814
T10	186	1,788
T11	1192	1,330
T12	813	1,668
T13	1464	1,377
T14	875	1,699
T15	490,5	1,540
T16	630	1,892
T17	490,5	1,793

T18	433	1,800
T19	632,5	1,787
T20	808	1,794
T21	1203	1,570
T22	35,5	1,273
T23	365	1,667
T24	966	1,863
T25	469,5	1,785
T26	931	1,838
T27	223	1,756
T28	721	1,870
T29	262	1,735
T30	407	1,770
T31	1038	1,474
T32	412,5	1,867
T33	510,5	1,745

D'après les données répertoriées dans le tableau V, l'ADN de nos échantillons a une bonne pureté et sa concentration est acceptable pour l'ensemble des témoins sauf pour les témoins T6, T7, T13 et T22.

Les témoins T6, T7, T13 et T22 ne seront pas inclus dans l'étude, car leur ratio 260nm/280nm est inférieur à 1.3.

La concentration d'ADN du T6, T7 et T22 est sous-estimée, et du T13 est surestimée, ce qui pourrait être expliqué par une mauvaise qualité de l'ADN ou une contamination lors de la manipulation.

Tableau VI: vérification de la d'ADN des athlètes.

Les athlètes	[ADN] ng/μl	Ratio (260/280)
A1	619,5	1,502
A2	178,5	1,909
A3	641	1,761
A4	734	1,889
A5	604	1,867
A6	11,5	1,917
A7	68	1,813
A8	442	1,853
A9	399	1,909
A10	626,5	1,901

Le tableau VI montre que l'ADN des athlètes est pur, de bonne qualité et ne présente aucune contamination sauf l'A6 où on retrouve une concentration très basse en ADN.

Le ratio 260 nm/280 nm est supérieur à 1.5 et inférieur à 2 pour tous les cas est la quantité d'ADN est suffisante, ce qui confirme la bonne pureté des ADNs.

Nous avons pu montrer que la plupart des ADNs extraits des athlètes et des témoins par la technique de salting-out étaient compatibles avec les explorations moléculaires que nous voulions accomplir sauf le T6, T7, T13, T22 et A6 et cela a été confirmé par une vérification de la pureté et la concentration d'ADN par le Nanodrop.

II . Amplification génique par PCR simple des exons 2 et 4 du gène *HFE*

Après l'extraction de l'ADN de nos échantillons, une vérification de la pureté de ce dernier était indispensable pour la suite de nos explorations.

L'étape suivante de notre travail consistait en l'amplification par PCR simple des deux exons 2 et 4 du gène *HFE*, grâce à l'utilisation des amorces spécifiques : Ex2-*HFE* sens et reverse, Ex4-*HFE* sens et reverse.

Suite à cette amplification, tous nos produits PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose de 1% en présence de Bromure d'éthidium (TBE) à fin de s'assurer de l'amplification des séquences cibles.

II.1 Mise au point de la PCR simple des exons 2 et 4 du gène *HFE*

L'objectif de cette étape était l'obtention pour chacun des exons amplifiés, d'un fragment unique, clair, à la taille souhaitée (**418 pb** exon 2 *HFE* et **390 pb** exon 4 *HFE*) et sans aucune contamination. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons dû passer par plusieurs étapes de mises au point de la PCR simple pour les deux exons 2 et 4 du gène *HFE*.

Test 1

Dans un premier temps, notre principale préoccupation était de déterminer la bonne température d'hybridation. Pour cela, nous nous sommes basés sur les recommandations de fournisseurs pour notre premier test PCR. Concernant les échantillons, notre PCR était réalisée sur 4 échantillons : T17, T2, T3 et T4. La température d'hybridation des amorces sens et réverses pour l'exon 2 était à 54°C et 55°C respectivement. Nous avons opté dans un premier temps pour la température de 54°C et une concentration en MgCl₂ de 1,5mM.

Le résultat de la PCR est illustré dans la figure 5

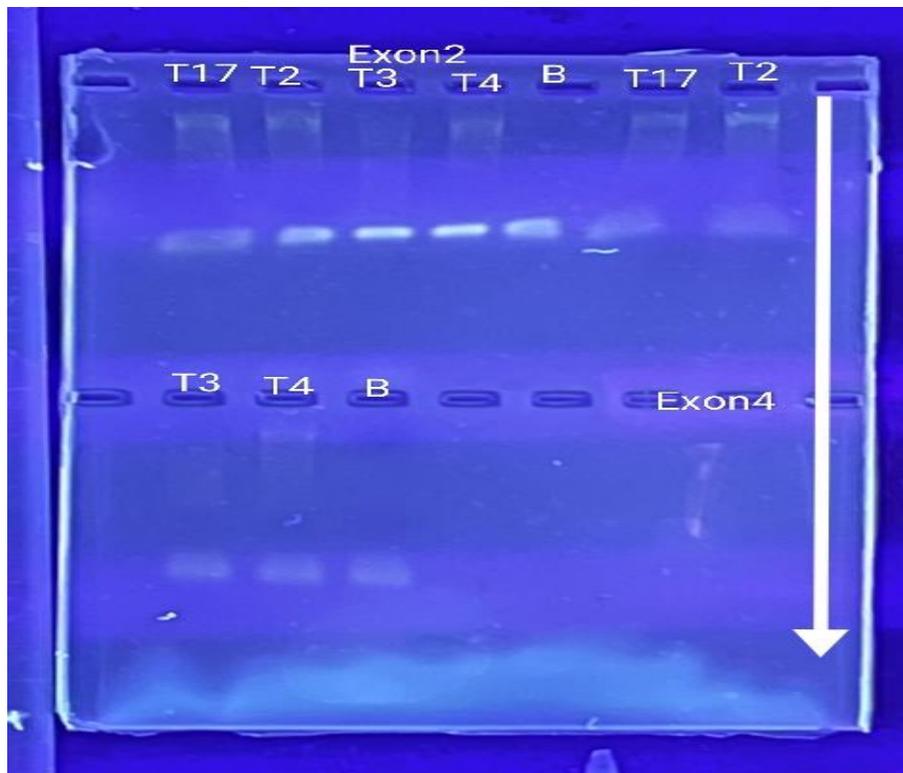


Figure 5 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B :Témoins négative de PCR. La flèche blanche: migration.

Pour ce premier test, nous n'avons obtenu aucune amplification des exons 2 et 4 du gène *HFE* pour les échantillons suivants : T17, T2, T3 et T4. Cette absence d'amplification serait peut être due à l'utilisation d'une température d'hybridation inadéquates.

Test 2

Puisque nous n'avons pas réussi notre premier test PCR, un deuxième test était nécessaire. Cette fois ci nous avons utilisé deux nouveaux programmes pour l'exon 2 : une température d'hybridation à 55°C et une deuxième à 56°C pour les échantillons T3, T17 avec une concentration en MgCl₂ de 1,5 mM.

Le résultat de ce test est représenté dans la figure 6.

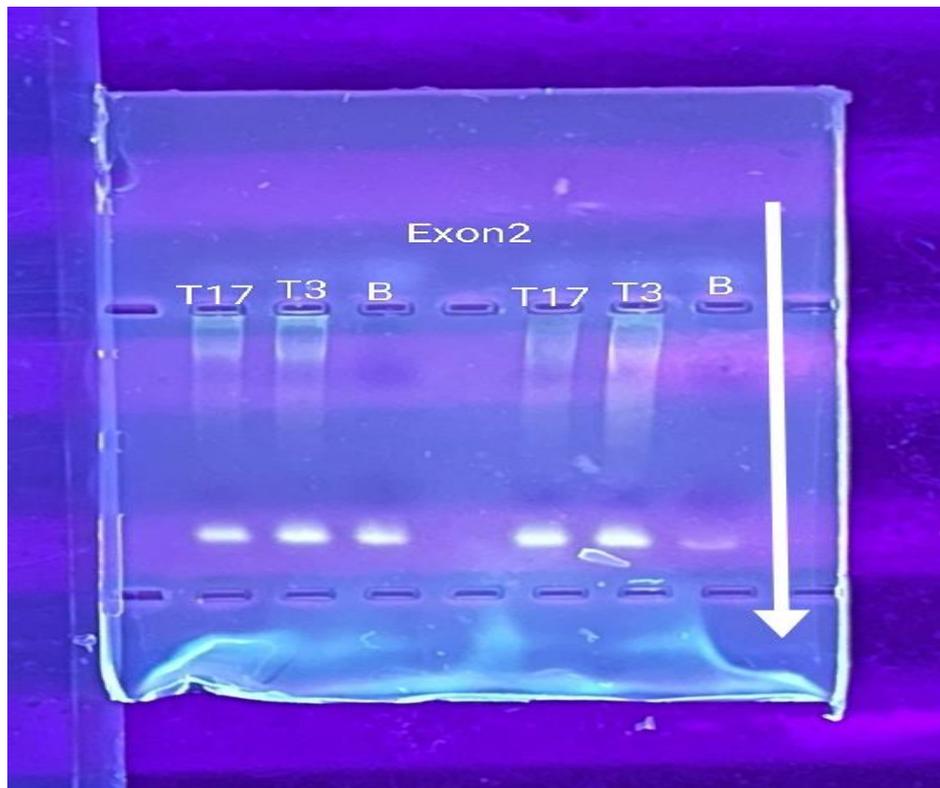


Figure 6 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T,B :Témoins négative de PCR. La flèche blanche :migration.

Encore une fois, nous n'avons obtenu aucune amplification de l'exon 2 du gène *HFE* pour les échantillons T3 et T17 en raison d'une température d'hybridation non optimale. Notre gel de migration est propre et ne présente aucune contamination ni amplification aspécifique.

Test 3

Pour déterminer la bonne température d'hybridation, nous avons réalisé un troisième test PCR pour l'exon 2 du gène *HFE*, sur deux échantillons T2 et T17, en utilisant une concentration de 2mM en MgCl₂ et une température d'hybridation de 53°C et 54°C pour le programme 1 et 2 respectivement.

Les résultats de la PCR du test 3 sont présentés dans la figure 7.

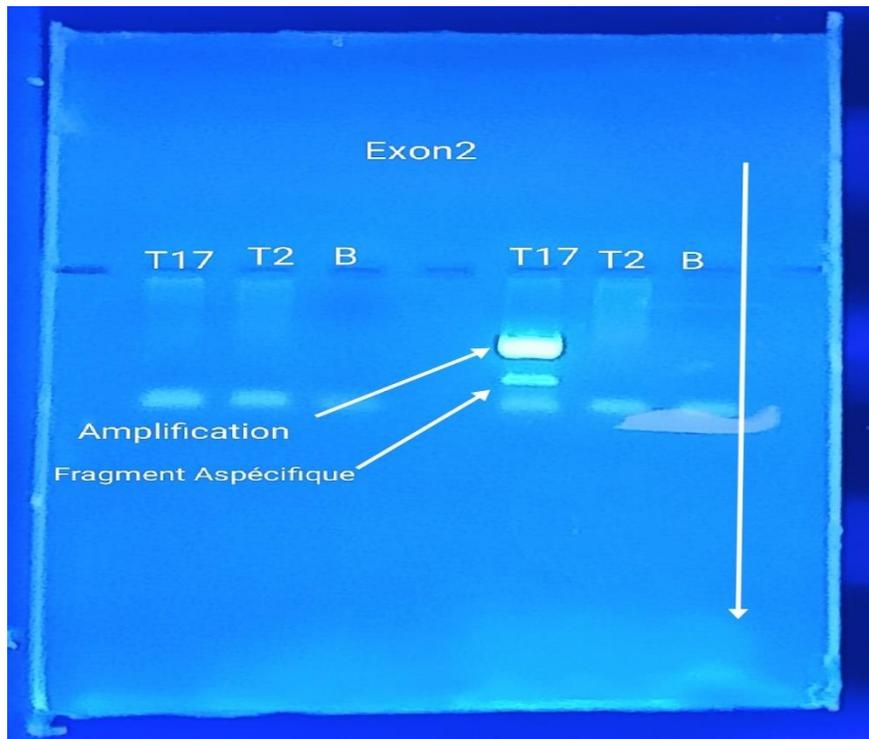


Figure 7 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T,B :Témoins négative de PCR. La flèche blanche :migration.

Pour ce test, nous avons obtenu une amplification de l'exon 2 du gène *HFE* pour l'échantillon T2.

Nous avons remarqué la présence d'une amplification aspécifique due probablement à une concentration en $MgCl_2$ trop importante. Nous devons refaire la même PCR en diminuant la concentration de $MgCl_2$.

Test 4

Nous avons ajusté la concentration en $MgCl_2$ à 1,5 mM avec une température d'hybridation de 53°C pour l'exon 2 du gène *HFE*. Concernant l'exon 4, la température d'hybridation était à 54°C.

Nous avons réalisé le test 4 sur 4 échantillons : T17, T2, T3, T4.

Le résultat est sur la figure 8

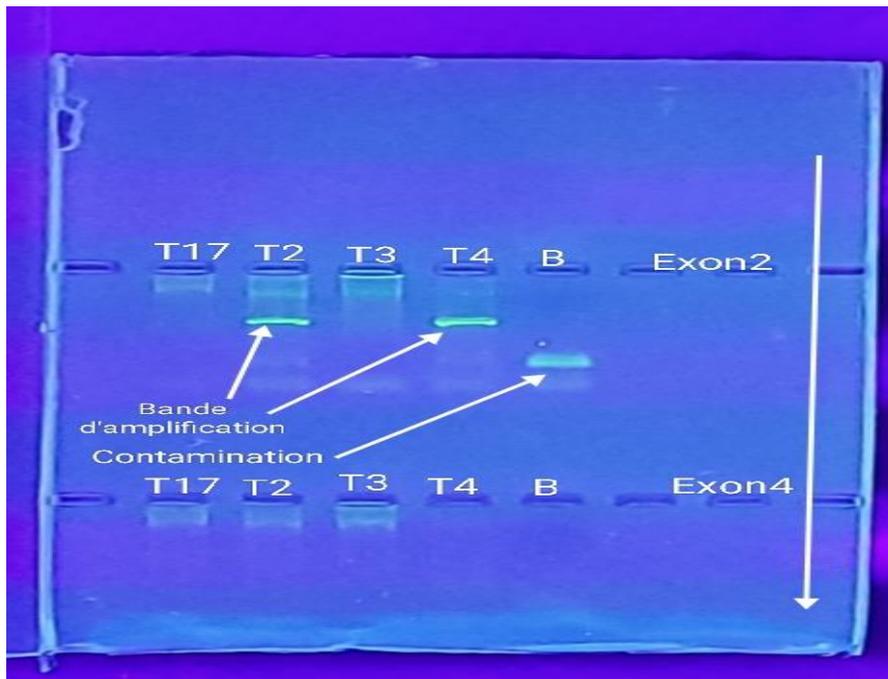


Figure 8 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B :Témoins négative de PCR. La flèche blanche: migration.

Le résultat obtenu après ce test a permis de mettre en évidence la présence d'une amplification de l'exon 2 pour les échantillons T2 et T4 et son absence pour l'échantillon

T1 et T3. L'absence d'amplification pour ces derniers serait probablement due à l'absence d'ADN dans l'embout de la micropipette lors de la manipulation.

Nous avons également remarqué la présence d'une bande d'amplification aspécifique qui pourrait être due à l'utilisation d'une concentration trop importante en MgCl₂.

Enfin, toujours concernant l'exon 2 du gène *HFE*, nous avons obtenu une bande d'amplification du contrôle négatif signe d'une contamination des réactifs par de l'ADN. Par ailleurs, l'analyse des résultats de ce test a également montré une absence d'amplification de l'exon 4 du gène *HFE*. Cette migration devra être refaite puisque nous n'avons pas fait notre électrophorèse dans des conditions optimale et nous n'avons donc pas pu analyser le résultat de cette PCR convenablement.

Test 5

Afin de déterminer la bonne température d'hybridation pour l'exon 4 du gène *HFE* nous avons tenté d'effectuer une PCR en utilisant les conditions suivantes : les températures d'hybridations des amorces sens et reverse de l'exon 4 était à 53°C et à 54°C avec 1,5 mM de concentration en MgCl₂.

Les échantillons présents dans ce test PCR sont : T17, T2, T3, T4.

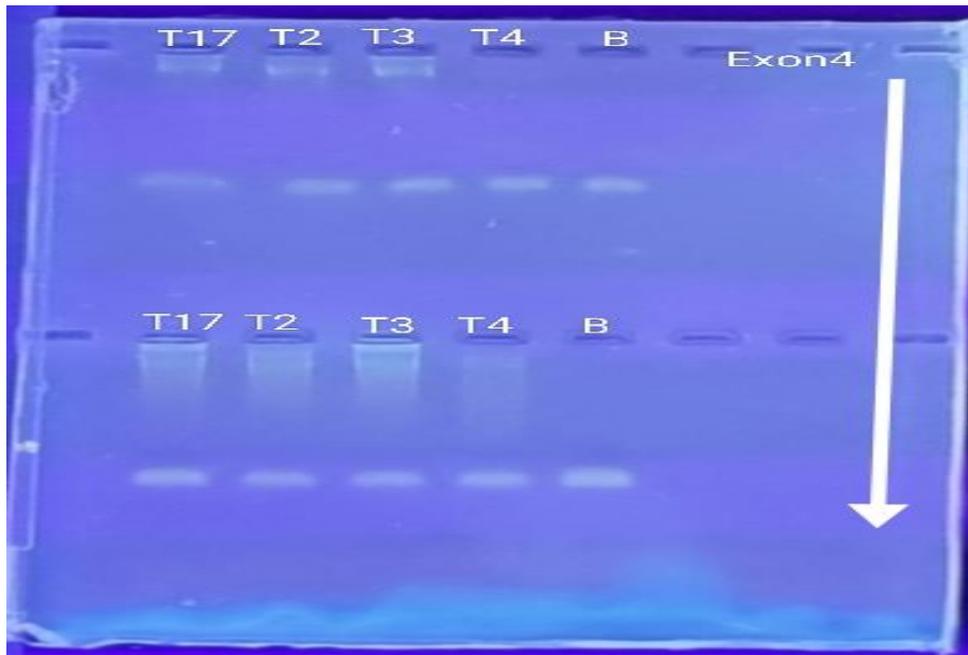


Figure 9 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR. La flèche blanche : migration.

L'analyse des résultats issus de l'électrophorèse sur gel d'agarose suite à la tentative d'amplification de l'exon 4 du gène *HFE* en utilisant deux programmes différents n'a montré aucune amplification. Cela montre que la température d'hybridation n'était pas optimale pour ce test également.

Test 6

Une autre PCR était donc obligatoire pour l'exon 4 du gène *HFE*. Nous avons opté cette fois pour une température d'hybridation de 57°C et une concentration en MgCl₂ de 2mM. Les échantillons utilisés pour cette PCR sont : T17, T2, T3, T4. La figure 10 illustre le résultat obtenu de cette PCR.

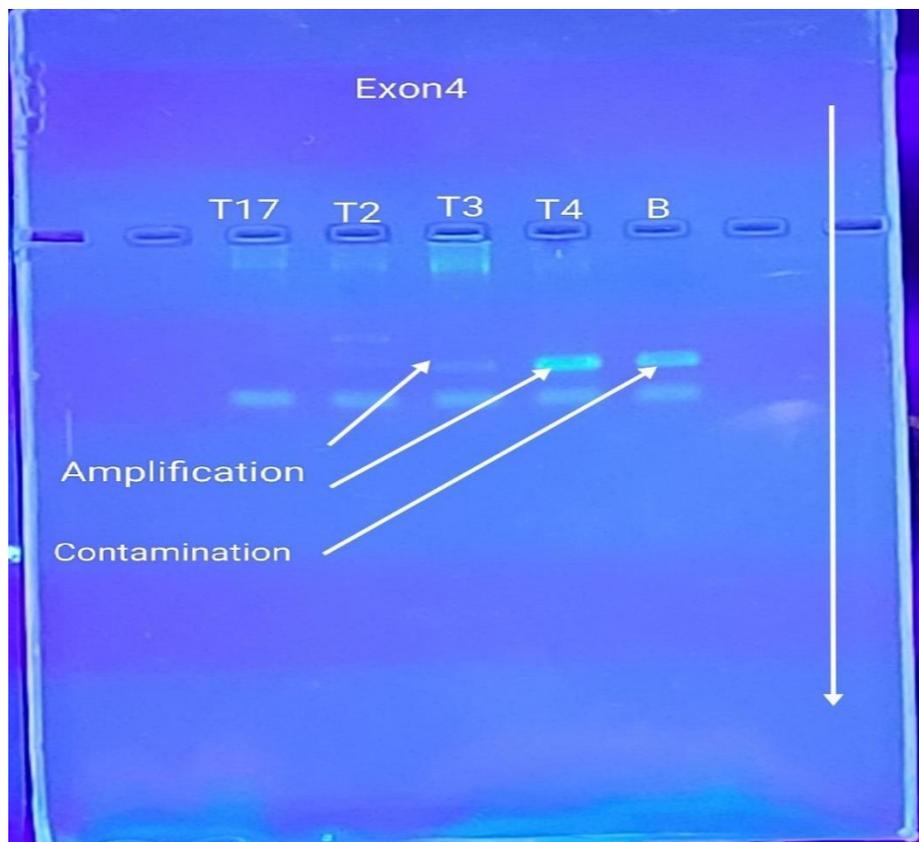


Figure 10 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B : Témoins négative de PCR. La flèche blanche : migration.

Le résultat obtenu suite à ce test permet d'observer une amplification de l'exon 4 du gène *HFE* pour les échantillons T2 et une contamination et/ou un fragment aspécifique pour les échantillons T17, T2 et T3.

Test 7

La dernière PCR que nous avons réalisé pour les exons 2 et 4 de gène *HFE*. Concernant l'exon 2, nous avons utilisé les conditions suivantes : une température d'hybridation à 53°C avec une concentration de 2mM en MgCl₂.

Pour l'exon4, nous avons utilisé les conditions suivantes : la température d'hybridation à 57°C et la concentration en MgCl₂ est de 2,5mM.

Les échantillons présents dans ce test PCR sont : T17, T2, T3, T4.

La figure 11 présente le résultat de cette PCR.

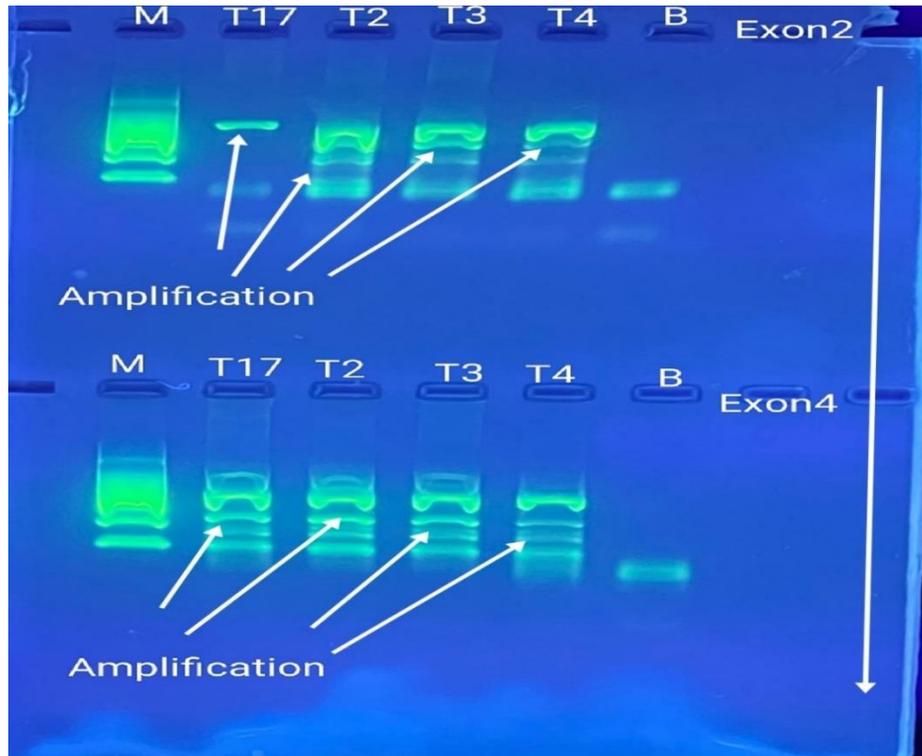


Figure 11 : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium. Témoins testés : T, B :Témoins négative de PCR, M : marqueur de taille 100pb lader. La flèche blanche : migration.

Le résultat obtenu après ce test a permis de mettre en évidence la présence d'une amplification de l'exon 2 et 4 du gène *HFE* pour l'ensemble des échantillons (T17, T2, T3, T4).

Nous avons remarqué la présence d'une contamination due peut être à une contamination des réactifs ou du matériel de travail.

De plus, malgré plusieurs tentatives de migration des produits PCR sur gel d'agarose en utilisant un marqueur de poids moléculaire, nous n'avons pas pu vérifier avec certitude la taille des fragments obtenus bien qu'ils semblent à la bonne taille (**418 pb** exon 2 *HFE* et **390 pb** exon 4 *HFE*).

Les explorations moléculaires visant à amplifier les exons 2 et 4 du gène *HFE*, bien qu'inachevée nous ont pourtant permis de bien avancer dans ce travail. La prochaine étape sera donc de refaire la PCR des deux exons du gène *HFE*, en utilisant un nouveau lot de réactifs et ce après avoir soigneusement nettoyé tout le matériel et les surfaces de travail et après avoir stérilisé tout le consommable utilisé lors des manipulations visant à réaliser ce travail.

Le séquençage pourra être envisagé une fois que nous aurons obtenu pour chacun des exons :

- Une bande claire, intense et unique correspondant à la bonne taille.
- Aucun fragment non spécifique.
- Aucune contamination du Blanc (contrôle négatif).

Conclusion et perspective

L'objectif de notre travail était de rechercher les variants génétiques C282Y et H63D du gène *HFE* dans la population algérienne.

Les résultats obtenues montrent que l'ADN extrait est de bonne qualité et en quantité suffisante, pour réaliser la suite du travail et ce pour la plus grande partie de nos prélèvements.

La technique PCR que nous avons réalisé pour amplifier les exons 2 et 4 du gène *HFE* n'a pas pu être achevée en raison de nombreuses contraintes techniques et sanitaires. En effet, les nombreuses tentatives de mises au point pour réussir la technique PCR n'ont pas encore abouti bien qu'elles aient bien avancé et sont toujours en cours.

De plus, pour répondre à la problématique initiale, une technique de séquençage était nécessaire. Cependant, nous n'avons pas eu le temps de séquencer les exons 2 et 4 du gène *HFE* afin de mettre en évidence les variants C282Y et H63D, et c'est ce qui devra être fait à l'avenir pour compléter ce travail et tenter de mettre en évidence une corrélation entre ces variants génétiques et la performance sportive.

Références bibliographiques

Bahram S, Gilfillan S , et al experimental hemochromatosis due to MHC class 1 HFE deficiency immune status and iron metabolism , *proc Nat p Acad sci USA* (1999 :96 :13312-7)

Baoutina A, Alexander IE, Rasko JEJ & Emslie KR. Potential use of gene transfer in athletic performance enhancement. *Mol Ther.* 2007;15:1751-1766.

Barton, J.C., & Edwards, C.Q. 1993. HFE hemochromatosis. In *gene reviews*((R)). M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, editors, Seattle (WA).

Barton JC, Edwards CQ, Acton RT. HFE gene: structure, function, mutations, and associated iron abnormalities. *Gene* 2015;574:179–92. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.009>.

Bennett MJ , Lebron JA ,Bjorkman PJ , crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor nature (2000 ; 403 :46-53)

Berthelot G, Thibault V, Tafflet M, Escolano S, El Helou N, et al. The citius end : world records progression announces the completion of a brief ultra-physiological quest. *PLoS ONE.* 2008 ;3 :e155.2008 ;3 :e1552.

Berthelot G, Tafflet M, El Helou N, Len S, Escolano S, et al. Athlete atypicality on the edge Of human achievement : performances stagnate after the last peak, in 1988. *PLoS ONE.*2010 ;5 :e8800.

Biomnis,(2012). Hemochromatose liée au gène *HFE-1*. Précise de biopathologie analyses médicales spécialisées. P1,2.

Brodal, P., Ingjer, F., & Hermansen, L. (1977). Capillary supply of skeletal muscle fibers in untrained and endurance-trained men. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 232(6), H705–H712. doi:10.1152/ajpheart.1977.232.6

BRUCE R. BACON division of Gastroenterology and Hepatology, Saint Louis University School of Medicine, St. Louis, Missouri; division of Gastroenterology and Hepatology, Saint Louis University School of Medicine, St. Louis, Missouri (p : 2, 2001 ;120 :718–725).

Bruce R. Bacon, Robert S. Britton. Hemochromatosis CHAPTER 74 2015. Clinical Gate.

Chung J, Wessling-Resnick M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. Crit Rev Clin Lab Sci 2003 ;40(2) :151-82.

de Campos WN, Massaro JD, Cançado ELR, Wiezel CEV, Simões AL, Teixeira AC, et al. Comprehensive analysis of HFE gene in hereditary hemochromatosis and in diseases associated with acquired iron overload. World J Hepatol 2019;11:186–98. <https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i2.186>.

Ekaterina A, Eri M, Egor B, Al-Khelaif F, Haruka M, Hirofumi Z, Elena S, Nikolay A, Andrey K, Oleg V, Motohiko M, Daniil V, Eugenia A, Mizuki T, Hiroshi K, Hisashi N, Vladimir P, Dmitry A, Eugene V, Yuliya E, Liliya B, Mohamed A, Edward V, Noriyuki F, Ildus I. The association of HFE gene H63D polymorphism with endurance athlete status and aerobic capacity: novel findings and a meta-analysis. European Journal of Applied Physiology (2020) 120:665–673. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04306-8>.

El Helou N, Berthelot G, Thibault V, Tafflet M, Nassif H, et al. Tour de France, giro, Vuelta, and classic european races show a unique progression of road cycling speed in the last 20 years. J Sports Sci. 2010 ;28 :789-796.

EL HELOU N. (2011) Evolution des performances sportives : apport de l'épidémiologie pour l'analyse des performances sportives et des influences physiologiques, technologiques, génétiques et environnementales sur les progressions humaines au cours de l'ère olympique. Thèse de Doctotat. UNIVERSITE PARIS V – RENE DESCARTES ECOLE DOCTORALE MTCE. Paris : 14 p, 85 p , 86 p ,89 p , 90 p , 91 p , 94 p , 97 p , 98 p , 4 p.

Estelle Louiset. (2009). L'hepcidine, l'hormone du fer. Correspondances en Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition – Vol. XIII – n° 4.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Dronmal IGS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer MC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary Haemochromatosis. *Nat Genet* 1996.

Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebrón JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ, Schatzman RC (1998) The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(4):1472–1477

Filipp F. Is science killing sport gene therapy and its possible abuse in doping. *EMBO Rep.* 2007 ;8 :433-435.

Gatzidou E, Gatzidou G & Theocharis SE. Genetically transformed world records: a reality or in the sphere of fantasy?. *Med Sci Monit.* 2009;15:RA41-47.

Gérald Le Gac, Claude Férec. The molecular genetics of haemochromatosis. *European Journal of Human Genetics* 2005; 1172-1185.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997 ; 388 : 482–8.

Hermine O, Dine G, Genty V, Marquet LA, Fumagalli G, Tafflet M, Guillem F, Van Lierde F, Rousseaux-Blanchi MP, Paliarne C, Lapostolle JC, Cervetti JP, Frey A, Jouven X, Noirez P, Toussaint JF. Eighty percent of French sport winners in Olympic, World and Europeans competitions have mutations in the hemochromatosis HFE gene. *Biochimie.* 2015 Dec;119:1-5. doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.028. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26416567.

Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA et al. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell.* 1998 ; 93 : 111-23.

Lucotte G, Champenois T, Semonin O. A rare case of a patient heterozygous for the hemochromatosis mutation C282Y and homozygous for H63D. *Blood Cells Mol Dis* 2001 ;27 :892-893. PubMed Abstract.

Macarthur DG & North KN. Genes and human elite athletic performance. *Hum Genet.* 2005;116:331-339.

McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001 ;291(5509) :1755-9.

Mullis, K.B., Ferre, K.B.F., et Gibbs, R.A. (1994). *The polymerase chain reaction*. Ed. Birkhäuser, Boston-Basel-Berlin.

Nemeth, E., and Ganz, T. (2006). Regulation of Iron Metabolism by Hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.*26, 323–342.

Neptune RR, McGowan CP & Fianndt JM. The influence of muscle physiology and Advanced technology on sports performance. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009 ;11 :81-107.

Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., and Vaulont, S. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide Hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* 110, 1037–1044.

Nicolas, G., Viatte, L., Lou, D.-Q., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A., Andrews, N.C., and vaulont, S. (2003). Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat. Genet.* 34, 97–101.

Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202:199–211. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.021>.

Pérusse L, Rankinen T, Rauramaa R, Rivera MA, Wolfarth B, et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2002 update. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35:1248-1264.

Philippe Saliou. Hémochromatose HFE : influence de facteurs génétiques et non génétiques sur l'expression phénotypique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale –Brest, 2014. Français. ffNNT : 2014BRES0101ff. fftel-02112072ff.

Raffaele M, Raffaele C, Silvia B, Leopoldo S, Antonio N, Andréa C, Luigi B, Beniamino F, Patrizia M, Alphonse N, Enrico B, Enrico A, Costantino A, Antonio G. L'analyse génomique révèle l'association de SNP spécifiques avec la performance sportive et la susceptibilité aux blessures chez les joueurs de football professionnel. 2019.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Speed CA & Ingham SA. Research in high-performance sports medicine : from the bench, To the bedside...to the podium. Br J Sports Med. 2010.

Tsianos GI, Evangelou E, Boot A, Zillikens MC, van Meurs JBJ, et al. Associations of Polymorphisms of eight muscle- or metabolism-related genes with performance in mount Olympus marathon runners. J Appl Physiol. 2010 ;108 :567-574.

Vogt A-CS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. Int J Mol Sci 2021;22:4591. <https://doi.org/10.3390/ijms22094591>.

Wahl, P., Jansen, F., Achtzehn, S., Schmitz, T., Bloch, W., Mester, J., & Werner, N. (2014). Effects of high intensity training and high volume training on endothelial microparticles and angiogenic growth factors.

Wilmore JH & Costill DL. Physiologie du sport et de l'exercice. Traduction de la 3^e Edition américaine. Bruxelles : Editions De Boeck Université. 2006.

Yarrow K, Brown P & Krakauer JW. Inside the brain of an elite athlete : the neural Processes that support high achievement in sports. Nat Rev Neurosci. 2009 ;10.

Annexes

Annexe 1

Questionnaire dans le cadre de recherche scientifique

Ce formulaire contient les informations personnelles du participant

Questionnaire

Nom : _____ prénom : _____

Date et lieu de naissance : _____

Adresse : _____

Email : _____

Numéro de téléphone : _____

Profession : _____

Sexe : Homme Femme

Age : _____

Groupe sanguin :

A B AB O RH+ RH-

Avez-vous une (des) maladie chronique(s) ou autre, citez-les ?

.....

Prenez-vous un traitement actuellement?

Oui Non Citez-le :

Pratiquez-vous une activité sportive ?

Oui Non Citez-le :

Niveau de pratique ?

International National Régional Loisir

Votre niveau de performance est :

Mauvais Excellent en évolution

Vous vous fatiguez :

Lentement rapidement

Vous récupérez de votre état de fatigue :

Plus vite lentement

A Le

Signature .

Annexe 2

Matériel non biologique utilisés dans notre travail

Appareillage	Produits chimiques
- Grands tubes de 50 ml	- Eau distillée
- Tubes de 1.5 ml	- Tris (trisaminométhane)
-Tubes à PCR	- EDTA (acide éthylène diamine tétra- acétique)
-Fiole jaugé	-SDS (dodécylsulfate de sodium)
-Erlenmeyer	-Ethanol 70 % et 100 %
- Une centrifugeuse (Jouan) (SiGmA)	-NaCl 6M et 1M (chlorure de sodium)
-Vortex (Techno Kartell)	-MgCl ₂ (Chlorure de magnésium)
- Nanodrop (biochrom SimpliNano)	-Acide borique
- Incubateur (Thermo Haake)	-Agarose en poudre
- Micropipettes (Eppendorf Research)	-BET (Bromure d'éthidium)
-Termocycleur (Eppendorf Mastercycler)	-TBE (Tris, acide borique, EDTA)
-Générateur de courant (E-C Apparatus Corporation)	
-Cuve de migration	
- La plaque chauffante (Stuart)	
-La balance (KERN)	
-La hotte (SIAB)	
-Lecteur pour gel (Bio-RAD) (transilluminateur)	

