

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Polymorphisme I/D du gène *ACE*
chez les hémodialysés

❖ Présenté et soutenu par :

- CHELLOUF Rimal
- NECER Meriem

Le 03/09/2020

❖ Jury d'évaluation :

- **Président du jury:** Dr. REZGOUNE Mohamed Larbi (MC-A-UFM, Constantine1)
- **Rapporteur :** Pr. HANACHI Sabah (Faculté de Médecine, UC 3).
- **Examineur :** Dr ZEKRI Salima (Faculté de Médecine, UC 3).

Année universitaire

2019-2020

Remerciements

Nous remercions en premier lieu Dieu, le tout puissant de nous avoir accordé la force, la patience et la persévérance pour achever ce modeste travail.

Au terme de ce travail, il nous est très agréable de rendre hommage à tous ceux qui nous ont aidés, soutenues et supportées.

Nous tenons ici à adresser notre profonde gratitude au Pr S. HANACHI d'avoir accepté de nous encadrer, pour l'intérêt qu'elle a porté à notre travail et tout le temps qu'elle nous a consacré, pour ses bons conseils et le plus important pour les connaissances scientifiques que nous avons acquises

Nos sincères remerciements vont aux membres de jury, qui nous font l'honneur d'examiner ce travail et de participer à la soutenance de ce mémoire.

Au président de jury monsieur M.L. REZGOUNE de nous avoir fait bénéficier de son expérience et surtout de sa rigueur scientifique.

Nous tenons à remercier très chaleureusement madame S. ZEKRI d'avoir accepté de juger ce travail et pour le temps qu'elle a consacré pour l'examiner.

Enfin, nos sincères remerciements vont à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes chers parents « Assia » et « Abdellghani »

*Il n'y a pas des mots assez forts pour vous
exprimer mon immense amour et ma
profonde gratitude pour tous les sacrifices
consentis et le soutien
que vous m'avez apporté tout au
long de ma vie.*

A mes chers sœurs : Roudaina, Phaima et Hadil

Ma deuxième mère Souad

A mes frères Slimane, Haytem et Mohamed

*pour leurs encouragements permanents
et leur soutien moral.*

*A toute ma famille, mes proches
et mes camarades de promotion.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également à tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation
de ce modeste mémoire*

Sans oublier mon binôme « Meriem » que dieu la protège.

Rimal

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents « Loubna » et « Ismail »

Aucun mot ne saurait exprimer l'amour

*Incommensurable que je vous porte, ni la reconnaissance que je vous dois,
pour vos sacrifices, votre dévouement et votre*

Soutien sans failles durant ces 25 longues années de bonheur à vos côtés.

A toute ma famille et tous ceux qui ont partagé

avec moi tous les moments d'émotion et m'ont

chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours

A mes chers frères Nabil, Abderahime et Aymen

et mes sœurs Sofía, Rawna, Norhen et Loubna

pour leurs soutien, appui et encouragements

A ma sœur, mon amie, ma binôme « Rimal »

merci infiniment d'être là à mes côtés, de m'avoir aidée, soutenue et surtout supportée

À mes amis et camarades de promotion.

*À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin
à la réalisation de ce travail.*

Meriem

Sommaire :

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Revue bibliographique

Chapitre 01 : Insuffisance rénale chronique (IRC)

I- Les reins	3
1- Rappel anatomique et physiologique du rein	3
1.1. Anatomie	3
1.1.1. Configuration externe	3
1.1.2. Configuration interne	3
1.2. Le néphron	4
1.2.1. Le corpuscule rénal	4
1.2.2. Tubule rénal	4
1.3. Appareil juxtaglomérulaire	5
2- Physiologie du rein	5
2.1. Fonction exocrine ou excréto-rénale	5
2.1.1. Filtration glomérulaire	6
2.1.2. Modification tubulaire de l'ultrafiltrat glomérulaire	6
2.2. Fonctions endocrines du rein	7
2.2.1. Erythropoïétine (EPO)	7
2.2.2. Activation de la vitamine D3	8
2.2.3. La rénine	8
2.3. Fonctions métaboliques du rein	8
II- L'insuffisance rénale	8
1- Définition et classification	8
1.1. Définition de l'IRC	8
1.2. Différence entre IRC et l'insuffisance rénale aiguë (IRA)	9
1.3. Définition de l'insuffisance rénale terminale (IRT)	9
1.4. Classification de l'IRC	9
2- Epidémiologie	11
2.1. A l'échelle mondiale	11

2.1.1. Prévalence de l'IRC selon le stade	12
2.1.2. Prévalence de l'IRC selon le sexe	13
2.1.3. Prévalence de l'IRC selon les causes	13
2.2.A l'échelle nationale	13
3- Evaluation de la fonction rénale	14
3.1.La mesure ou l'estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG)	14
3.2.Mesure de l'albuminurie et de la protéinurie	16
4- Symptômes de l'IRC	16
5- Physiopathologie de l'IRC	17
6- Facteurs de progression de l'IRC	18
7- Causes de l'IRC	18
7.1.La néphropathie vasculaire	18
7.2.La néphropathie diabétique (ND)	19
7.3.Les glomérulonéphrites (GN) chroniques	20
7.4.Les néphropathies interstitielles chroniques	22
7.5.Les pyélonéphrites	22
7.6.Les intoxications chimiques	22
7.7.Les maladies congénitales et héréditaires	22
8- Complications de l'IRC	23
8.1.Défaut d'excrétion des déchets azotés	23
8.2.Les troubles de l'équilibre acide-base	23
8.3.Les troubles hydro-électrolytiques	23
8.4.Troubles hématologiques	24
8.5.Trouble du métabolisme phosphocalcique	24
8.6.Autres complications liées à l'IRC	25
9- Diagnostic de l'IRC.....	25
9.1.Affirmé la présence d'une maladie rénale chronique (MRC).....	25
9.2.Affirmé le caractère chronique de la maladie rénale	26
9.3.Diagnostic étiologique	26
9.4.Identifier les facteurs de progression	28
10- Traitement de l'IRT	28
Chapitre 02 : Enzyme de conversation de l'angiotensine (ACE)	
I- Rappel sur le système rénine angiotensine (SRA)	31

II- Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)	34
1- Définition	34
2- Forme	34
3- Structure	35
4- Fonction	36
5- Gène	37
III- Association du polymorphisme I/D du gène ACE et l'IRT	38
1- Le polymorphisme génétique du gène ACE	38
2- Contrôle génétique du niveau d'ACE plasmatique	38
3- Relation entre le polymorphisme I/D du gène ACE et l'IRT	39
4- Mécanisme d'action de l'Ang II sur la détérioration de la fonction rénale...	40
Partie pratique	
Matériels et méthodes	41
1- Stratégie de la recherche	41
2- Critères d'inclusions et d'exclusions	41
3- Extraction et synthèse de données	42
4- Analyse statistique	44
Résultats	45
1- Caractéristiques de l'étude	45
2- Association du polymorphisme I/D du gène ACE avec le risque de l'IRT	46
Discussion	49
Conclusion et perspectives	52
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

- aa** : acide aminé
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire
- AGEs** : Advanced Glycation End-products
- ANAES** : Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé
- Ang I** : Angiotensine I.
- Ang II** : Angiotensine II
- ARN** : acide ribonucléique
- AT1R** : récepteur de l'angiotensine II de type 1
- AT2R** : récepteur de l'angiotensine II de type 2
- CKD-EPI** : Chronic Kidney Disease Epidemiology
- cm** : centimètre.
- D** : Délété
- DFG** : débit de filtration glomérulaire
- DPA** : dialyse péritonéale automatisé
- DPCA** : dialyse péritonéale ambulatoire continue
- EER** : épuration extra rénale
- EPO** : Erythropoïétine
- FTI** : fibrose tubulo-interstitielle
- GEM** : glomérulonéphrite extra-membranaire
- GN** : glomérulonéphrite.
- HAS** : Haute Autorité de Santé
- Hb** : hémoglobine
- HD** : Hémodialyse
- HSF** : hyalinose segmentaire et focale
- HTA** : hypertension artérielle
- I** : Inséré
- I/D** : Insertion / Délétion
- IACE** : Inhibitor Angiotensine Converting Enzyme
- IC** : Intervalle de Confiance
- IgA** : Immunoglobuline A

- IgG** : Immunoglobuline G
- IRA** : insuffisance rénale aiguë
- IRC** : insuffisance rénale chronique
- IRT** : insuffisance rénale terminale
- Kb** : Kilobase
- kDa** : kilodalton
- KDIGO** : Kidney Disease Improving Global Outcomes
- KDOQI** : Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
- MBG** : membrane basale glomérulaire
- MCV** : maladie cardiovasculaire
- MDRD** : Modification of Diet in Renal Disease
- MRC** : maladie rénale chronique
- NCBI** : National Center for Biotechnology Information
- ND** : néphropathie diabétique
- NIGA** : néphropathie à Immunoglobuline A
- OR** : Odds Ratio.
- pb** : paire de bases
- PTH** : parathormone.
- RCPG** : récepteur couplé aux protéines G
- RFLP** : polymorphisme de longueur des fragments de restriction
- sACE** : somatic Angiotensin Converting Enzyme
- SGLT 1 et 2** : co-transporteurs sodium-glucose 1 et 2
- SNI** : syndrome néphrotique idiopathique
- SNP** : single nucléotide polymorphism
- SRA** : système rénine-angiotensine
- SRAA** : système rénine-angiotensine-aldostérone
- tACE** : testicular Angiotensin Converting Enzyme
- TCD** : tube contourné distal
- TCP** : tube contourné proximal
- TGF- β** : Transforming Growth Factor Beta

Liste des tableaux

Tableau I :	Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique	10
Tableau II :	Classification de la maladie rénale chronique et estimation du risque relatif de progression vers l'IRT en fonction du DFG estimé (en ml/min/1.73 m ²) et de l'albuminurie (mg/g de créatinine)	11
Tableau III :	Bilan initial à faire devant la découverte d'une IRC	27
Tableau IV :	Principaux facteurs de risque de progression des maladies rénales	28
Tableau V :	Localisation des deux types de récepteurs de l'Ang II (AT1R et AT2R)	33
Tableau VI :	Les données extraites à partir des différentes études	43

Liste des figures

Figure 01 :	Position des reins	3
Figure 02 :	Coupe frontale du rein gauche (vue antérieure)	4
Figure 03 :	Les différents compartiments du néphron	5
Figure 04 :	La réabsorption tubulaire	6
Figure 05 :	Réabsorption du sodium dans le tube collecteur cortical	7
Figure 06 :	La prévalence mondiale de l'IRC en 2017	12
Figure 07 :	La prévalence de l'IRC selon les stades	12
Figure 08 :	La prévalence de l'IRT en Algérie selon le traitement.....	14
Figure 09 :	Néphropathie à IgA	20
Figure 10 :	Glomérulonéphrite extra-membraneuse	21
Figure 11 :	Hémodialyse	29
Figure 12 :	Dialyse péritonéale	30
Figure 13 :	La cascade du système rénine angiotensine (SRA)	32
Figure 14 :	Signalisation intracellulaire par l'Ang II	32
Figure 15 :	Les différents rôles de l'Ang II	34
Figure 16 :	Structure de l'ACE	36
Figure 17 :	Organisation du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine humaine	37
Figure 18 :	Le locus du gène <i>ACE</i>	37
Figure 19 :	Les étapes de perte de la fonction rénale	40
Figure 20 :	Organigramme de la recherche documentaire et du processus de sélection	46

Figure 21 :	Association de l'allèle D avec le risque d'IRT dans l'ensemble des populations (D vs I)	47
Figure 22 :	Association du génotype DD avec le risque d'IRT dans l'ensemble des populations (DD vs ID+II)	47
Figure 23 :	Association du génotype II avec le risque d'IRT dans l'ensemble des populations (II vs DD+ID)	48

Introduction

Introduction

Les reins jouent un rôle important dans notre organisme par l'élimination des déchets et des substances chimiques exogènes, de plus, ils sont absolument essentiels pour maintenir l'homéostasie corporelle. Les reins peuvent se détériorer et perdre leurs fonctions aboutissant à une insuffisance rénale chronique (IRC) ^[1]. Cette dernière représente un principal contributeur à la morbidité et à la mortalité due aux maladies non transmissibles. Elle doit être activement combattue pour atteindre l'objectif visant à réduire d'un tiers la mortalité prématurée due à cette pathologie d'ici 2030. En effet, l'IRC fait plus de décès que la tuberculose et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) où le nombre de décès causé par cette maladie est presque égal au nombre de décès dus aux accidents de la route ^[2]. Elle progresse rapidement, silencieusement et d'une manière indépendante de la maladie causale pouvant aboutir à l'insuffisance rénale terminale (IRT) ^[1] ; forme avancée de la maladie rénale chronique (MRC). ^[1]

L'IRT est une pathologie complexe multifactorielle où des facteurs sociaux, environnementaux et génétiques tel que le polymorphisme I/D (insertion /délétion) du gène *ACE* (Angiotensin Converting Enzyme) semblent avoir un impact significatif sur sa progression. ^[3] Ce polymorphisme a été mis en évidence pour la première fois par *Rigat* et ces collaborateurs en 1990 par l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) ^[4]. Le clonage de l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) de l'*ACE* a permis d'identifier un polymorphisme I/D d'un fragment intronique de 287 pb (paire de bases), riche en séquence *Alu* au sein de l'intron 16. La présence singulière de formes délétées ou insérées reflète l'existence de deux allèles, I (Inséré) de 490 pb et D (Délété) de 190 pb définit le polymorphisme I/D du gène *ACE*. ^[5]

Le gène *ACE* code pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui fait partie intégrante du système rénine-angiotensine (SRA), un régulateur clé de la pression artérielle et des fonctions rénales. Sa participation dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle est bien documentée mais sa contribution à l'IRC et sa progression vers l'IRT reste débattue. ^[6]

A cet égard nous avons réalisé ce travail qui traitera en deux parties :

- Une revue bibliographique qui synthétise l'état actuel de la recherche sur l'IRC et sa progression vers l'IRT tout en évoquant le rôle du facteur génétique en particulier « le polymorphisme I/D du gène *ACE* » dans cette progression.
- Une partie pratique réalisée sous forme d'une analyse d'articles, qui combine les résultats de cinq études cas-témoins indépendantes sur un problème unique « association du polymorphisme I/D du gène *ACE* et le risque de l'IRT » dans l'intention de fournir une conclusion plus fiable sur la signification de cette association.

Chapitre 01

Insuffisance rénale chronique (IRC)

I. Les reins

1- Rappel anatomique et physiologique du rein

1.1. Anatomie

Les deux reins sont situés dans l'espace rétro-péritonéal de part et d'autre de la colonne dorso-lombaire, entre les 12^{èmes} vertèbres dorsales et les 2^{èmes} vertèbres lombaires (figure 01).^[7]

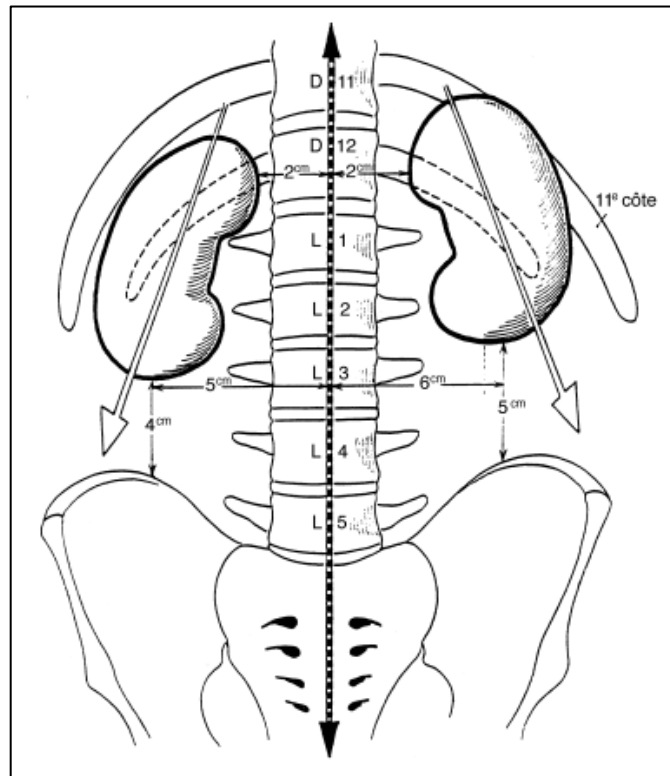


Figure 01 : Position des reins.^[7]

1.1.1. Configuration externe

Les reins sont deux organes dont la forme ressemble à celle d'un haricot pesant chacun de 100 à 200 grammes environ. Ils mesurent environ 12 centimètres (cm) de long, 6 cm de large et 5 cm d'épaisseur. Le rein droit est généralement un peu plus bas situé que le gauche due à la présence du foie.^[8]

1.1.2. Configuration interne

Une coupe frontale du rein révèle deux régions distinctes :

Une zone superficielle rougeâtre, à texture lisse, appelée cortex rénal et une zone profonde, brun rougeâtre, appelée médulla rénale (figure 02).^[9]

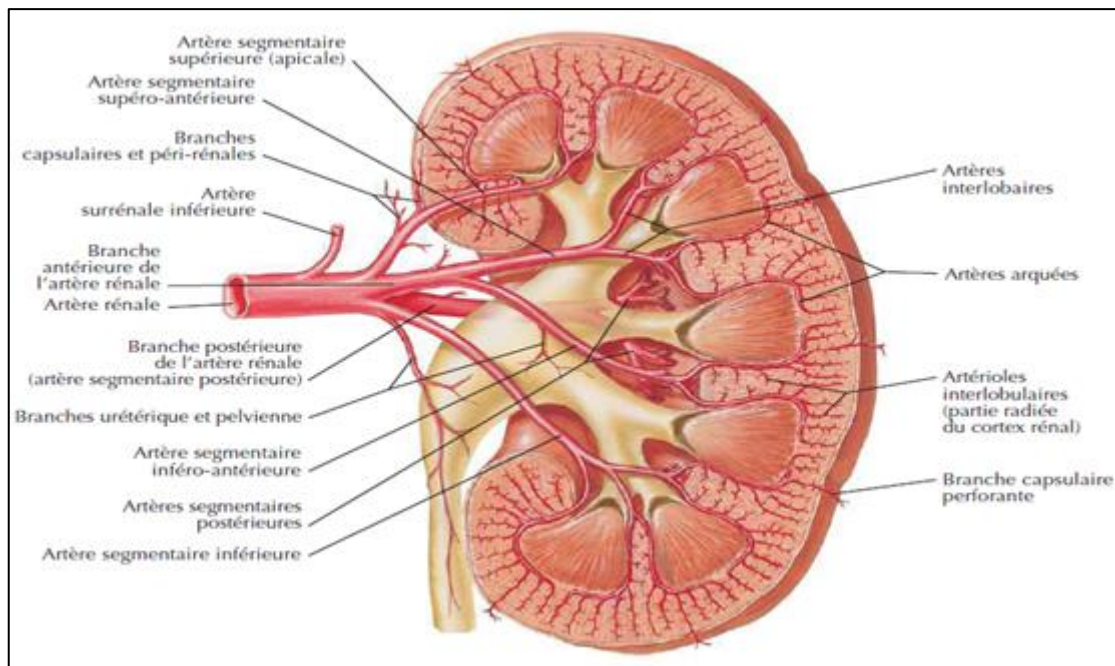


Figure 02 : Coupe frontale du rein gauche (vue antérieure). ^[10]

1.2. Le néphron

Les néphrons représentent des unités structurales et fonctionnelles du rein. Chaque rein comprend 1 million de ces minuscules unités de filtration du sang aboutissant à la formation de l'urine (figure 03). ^[11]

Chaque néphron est constitué de deux parties distinctes :

1.2.1. Le Corpuscule rénal

Est une vésicule formée de la capsule glomérulaire « capsule de Bowman » et d'un bouquet capillaire artériel nommé « le glomérule » du rein, il est doté d'une adaptation « endothélium capillaire percé par de nombreux pores de 75 nanomètre (nm) » qui lui permet de filtrer de grandes quantités du sang riche en soluté et pratiquement dénué de protéines plasmatiques vers la chambre glomérulaire du corpuscule rénal. ^[11]

1.2.2. Le tubule rénal

Le tubule rénal se compose de quatre segments : le tube contourné proximal (TCP), l'anse de Henlé, le tube contourné distal (TCD) et le tube collecteur. Il fait suite au glomérule et constitue avec celui-ci le néphron. ^[12]

1.3. Appareil juxtaglomérulaire

Chaque néphron comprend une partie appelée appareil juxtaglomérulaire où la portion la plus éloignée de la partie ascendante du néphron s'appuie contre l'artériole afférente qui alimente le glomérule (et parfois contre l'artériole efférente). Elle comprend trois populations cellulaires qui jouent un rôle important dans la régulation du volume du filtrat glomérulaire et de la pression artérielle systémique. [13]

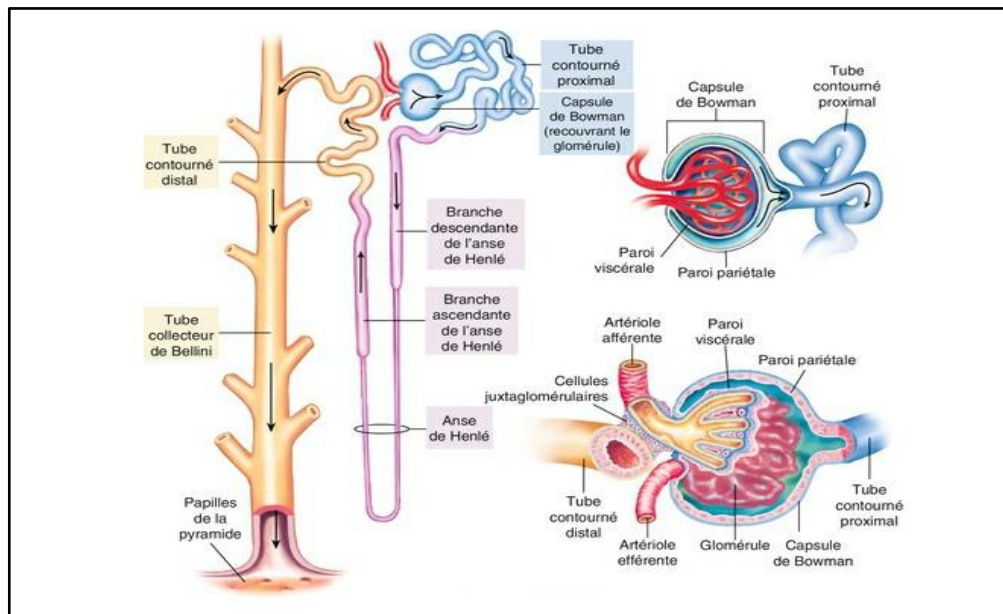


Figure 03 : Les différents compartiments du néphron. [14]

2- Physiologie du rein

Les reins sont responsables de l'élimination urinaire de toxines urémiques et de la régulation de plusieurs systèmes de l'organisme comme la volémie intra-extracellulaire, l'état acido-basique, le métabolisme phosphocalcique et l'érythropoïèse. Ils adaptent quantitativement et qualitativement la composition de l'urine afin de garder ces systèmes en équilibre. [15]

2.1. Fonction exocrine ou excréto-rénale

Elle est réalisée par le néphron. Ce dernier permet l'élimination des dérivés terminaux du métabolisme et de maintenir l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique du milieu intérieur. Cette fonction se déroule en deux étapes successives jusqu'à l'élaboration de l'urine définitive. [16]

2.1.1. Filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire est assurée par le glomérule et consiste en un processus d'ultrafiltration. ^[16]

C'est un processus passif, non sélectif pendant lequel le sang est poussé à travers une membrane par la pression hydrostatique. Cette étape permet la formation de l'urine glomérulaire « urine initiale ou primitive » qui possède une composition analogue à celle du plasma sanguin. ^[14]

2.1.2. Modifications tubulaires de l'ultrafiltrat glomérulaire

Cette étape consiste à récupérer les substances indispensables perdues lors de la filtration glomérulaire « réabsorption tubulaire » (figure 04). Elle concerne notamment l'eau et les électrolytes. ^[16]

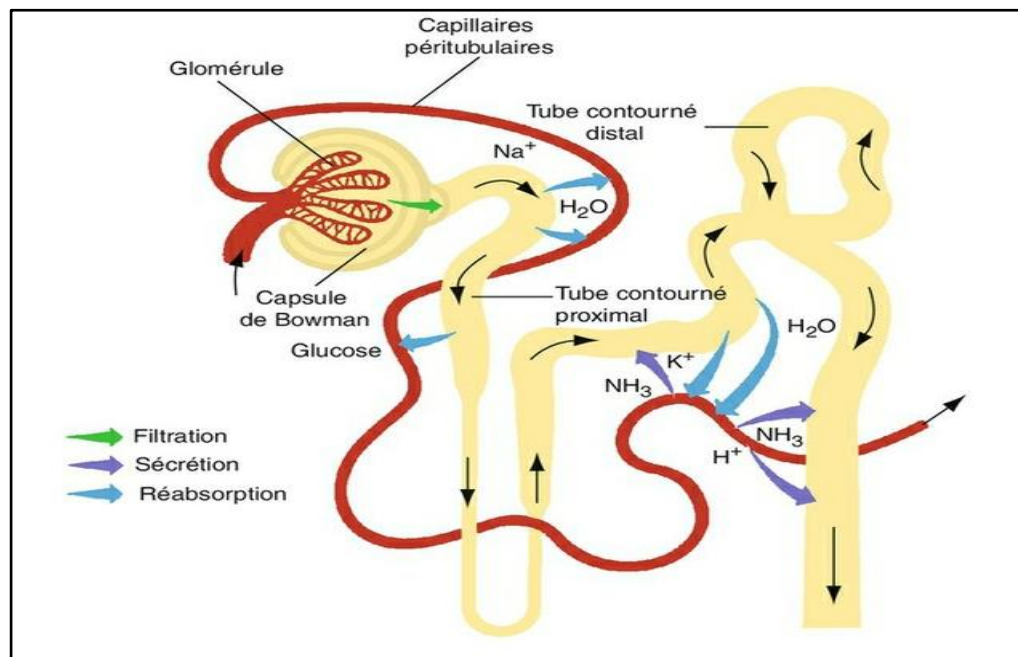


Figure 04 : La réabsorption tubulaire. ^[14]

Les cellules principales dites "P" sont le siège de la réabsorption du sodium et l'excrétion du potassium qui dépend de l'activité de la pompe Na⁺/K⁺. Ces cellules sont sensibles au stimulus de l'aldostérone ce qui va augmenter la réabsorption du sodium et l'excrétion du potassium et par conséquent, régule la composition en sel de l'urine (figure 05). ^[17]

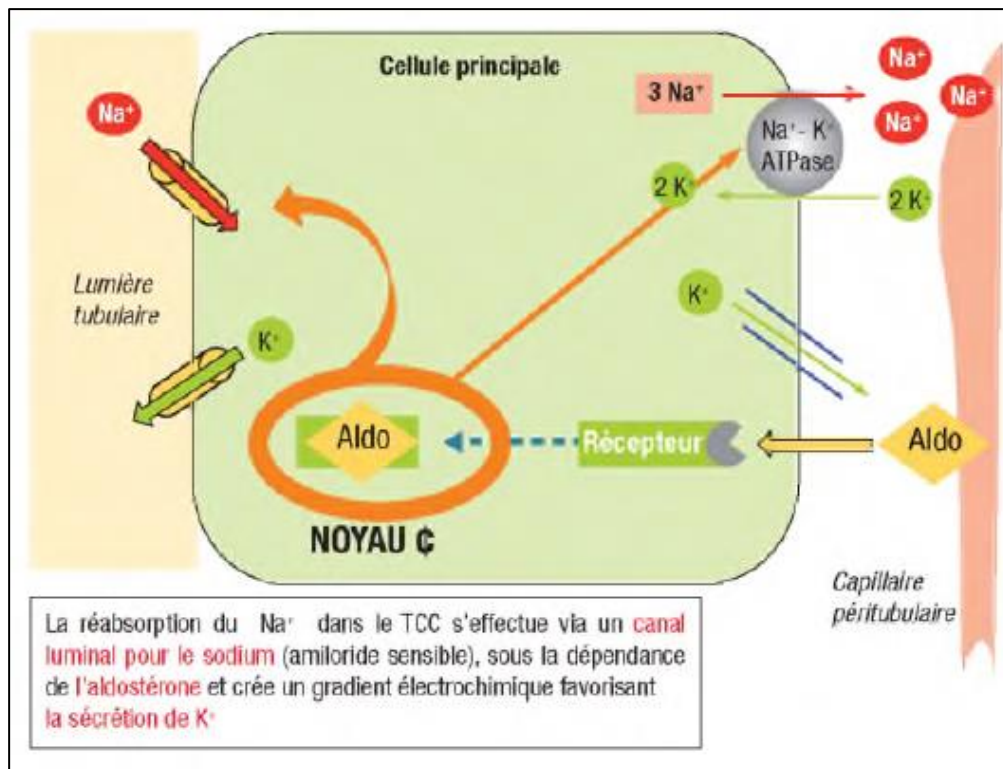


Figure 05: Réabsorption du sodium dans le tube collecteur cortical. ^[18]

Le rein participe également à la régulation de l'équilibre acido-basique et le maintien du pH sanguin à un niveau constant par la sécrétion des ions H^+ et /ou HCO_3^- . ^[17]

Ces divers processus de réabsorption et de sécrétion sont régulés par les facteurs humoraux et hormonaux ou même nerveux qui dépendent de la régulation des grands équilibres et homéostasies dans lesquels les reins sont impliqués. ^[16]

2.2. Fonctions endocrines du rein

Le rein intervient dans la production et la sécrétion de nombreuses hormones telle que : ^[19]

2.2.1. Erythropoïétine(EPO)

Cette glycoprotéine est produite par les fibroblastes péritubulaires dans le cortex rénal. Cette production est induite par l'hypoxie tissulaire. L'action physiologique de cette hormone est la stimulation de la synthèse des globules rouges par la moelle osseuse (érythropoïèse). ^[19]

2.2.2. Activation de la vitamine D3

Elle nécessite deux hydroxylations afin d'aboutir au métabolite actif le 1,25 di-hydroxy-cholécalciférol ou calcitriol ; la première est assurée par le foie et la deuxième se fait surtout dans les mitochondries des cellules tubulaires proximales. Le rôle du calcitriol est de maintenir l'hémostase du calcium et du phosphore et la minéralisation osseuse. ^[19]

2.2.3. La rénine

Elle est produite par les cellules granuleuses de l'appareil juxtaglomérulaire et considérée comme une hormone protéolytique. Elle a comme substrat l'angiotensinogène, ce dernier est transformé en angiotensine I (Ang I) (décapeptide inactif) lui-même convertit en angiotensine II (Ang II) par l'ACE. L'Ang II assure de multiples fonctions biologiques tel que le maintien de la pression artérielle systémique et la libération de l'aldostérone. ^[20]

2.3. Fonctions métaboliques du rein

Le rein intervient dans un certain nombre de fonctions métaboliques d'importance moindre mais non négligeable comme :

- La néoglucogenèse à partir du lactate.
- Ammoniogenèse et son rôle fondamental dans l'équilibre acido-basique.
- Le catabolisme des protéines de petit poids moléculaire, chaîne légère d'immunoglobuline, hormone polypeptidique (insuline, parathormone (PTH), glucagon). ^[16]

II. L'insuffisance rénale

1- Définition et classification

1.1. Définition de l'IRC

IRC est définie par la diminution irréversible du débit de filtration glomérulaire (DFG) qui est le meilleur indicateur du fonctionnement rénal. Elle résulte soit de l'évolution d'une MRC, soit de la non récupération après une agression rénale aiguë. ^[18]

En France, l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES) définit l'IRC comme un DFG inférieur à 60 ml/min par 1,73m². L'IRC est toujours secondaire à une maladie rénale qui a affectée un des quatre secteurs du parenchyme rénal : glomérules, tubes, interstitium ou vaisseaux. ^[21]

1.2. Différence entre l'IRC et l'insuffisance rénale aiguë (IRA)

L'IRC s'oppose à l'IRA au cours de laquelle la diminution du DFG est transitoire (moins de trois mois) et dans la grande majorité des cas réversible contrairement à l'IRC qui est irréversible. ^[21]

1.3. Définition de l'insuffisance rénale terminale (IRT)

La Haute Autorité de Santé (HAS) et l'organisation internationale américaine « Kidney Disease Outcomes Quality Initiative » (KDOQI) définissent l'IRT ou IRC stade 5 par une diminution permanente de la clairance de la créatinine « DFG » à un niveau inférieur à 15 ml/min pour 1,73m² ^[22]. Le plus souvent, elle est synonyme de « mort rénale » avec la nécessité vitale de recourir à une technique de suppléance de la fonction rénale ainsi la dialyse et la transplantation sont les interventions médicales les plus évidentes. ^[23]

1.4. Classification de l'IRC

Selon l'HAS la MRC évolue en cinq stades ; cette classification (tableau I) a été basée sur deux critères :

- Le premier critère est la présence des marqueurs d'atteinte rénale qui sont les témoins d'une lésion parenchymateuse ayant une expression biologique (protéinurie , hématurie...), morphologique (petit rein à l'échographie...) ou histologique.
- Le deuxième critère est la valeur du DFG qui est le meilleur indicateur du fonctionnement rénal (il correspond au volume du plasma filtré par le rein par unité du temps). ^[1]

Tableau I : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique (Haute Autorité de Santé. Guide du parcours de soins – Maladie rénale chronique de l'adulte). ^[1]

Stade	DFG (ml/min/1.73m ²)	Définition
1	≥ 90	Maladie rénale chronique avec DFG normal ou augmenté
2	Entre 60 et 89	Maladie rénale chronique avec DFG légèrement diminué
3	Stade 3A : entre 45 et 59	Insuffisance rénale chronique modérée
	Stade 3B : entre 30 et 44	
4	Entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère
5	<15	Insuffisance rénale chronique terminale

Cette classification ne tient pas compte de l'âge des sujets, ce qui peut conduire à considérer comme malades des sujets âgés dont la réduction de la fonction rénale est physiologique liée au vieillissement. Pour les patients âgés, il est impératif de faire la distinction entre la réduction physiologique et celle associée à une maladie rénale évolutive. Il faut également prendre en considération l'existence d'albuminurie ou de microalbuminurie. ^[24]

La nouvelle classification de la MRC donnée par la « Kidney Disease Improving Global Outcomes » (KDIGO) en 2012 est définie selon les critères suivants : la cause, la valeur du DFG et le taux de l'albuminurie. Le rapport albumine/créatinine (ACR) apparaît non seulement comme un élément important du diagnostic de la maladie rénale mais également comme élément pronostic de la progression de la maladie et des complications cardio-vasculaires (tableau II). ^[25]

Tableau II : Classification de la maladie rénale chronique et estimation du risque relatif de progression vers l'IRT en fonction du DFG estimé (en ml/min/1.73 m²) et de l'albuminurie (mg/g de créatinine). [25]

Pronostic de progression de la MRC en fonction du stade (GxAx)				Description et classification en fonction de l'albuminurie (rapport albumine/créatinine)		
				A1	A2	A3
				Optimale à normale haute	Albuminurie modérée	Albuminurie sévère
				< 30 mg/g	30 – 300 mg/g	> 300 mg/g
Catégorie DFG estimé (mL/min/1.73m ²)	G1	Normal ou hyperfiltration	≥ 90			
	G2	Légèrement abaissé	60 – 89			
	G3a	Légèrement à modérément abaissé	45 – 59			
	G3b	Modérément à sévèrement abaissé	30 – 44			
	G4	Sévèrement abaissé	15 – 29			
	G5	IRT	< 15			

NB : Les recommandations de suivi clinique et biologique de la progression sont : vert, 1 fois par an ; jaune, 2 fois par an ; orange, 3 fois par an ; rouge, minimum 4 fois par an voire une fois par mois (par exemple juste avant la mise en dialyse).

2- Epidémiologie

Au cours des dix dernières années, de nombreuses publications scientifiques ont fait référence à une « épidémie » d'IRC. Une épidémie étant une progression rapide et subite de l'incidence d'une pathologie au-delà de ce qui est normalement observé à un lieu et un moment donnés. [26]

En 2017, l'insuffisance rénale a occupé le 12^{ème} rang des principales causes de décès dans le monde où elle a entraîné 1,2 million de décès, un nombre qui devrait augmenter d'ici 2040 à 2,2 millions jusqu'à 4,0 millions. [2]

2.1. A l'échelle mondiale

En 2017, la prévalence mondiale de l'IRC était de 9,1% (697,5 millions de cas). Près d'un tiers des patients atteints d'IRC vivaient dans deux pays, la Chine (132,3 millions cas) et l'Inde (115,1 million cas). Le Bangladesh, le Brésil, l'Indonésie, le Japon, le Mexique, le Nigéria, le Pakistan, la Russie, les États-Unis et le Vietnam comptaient chacun plus de 10 millions de cas de MRC (figure 06).

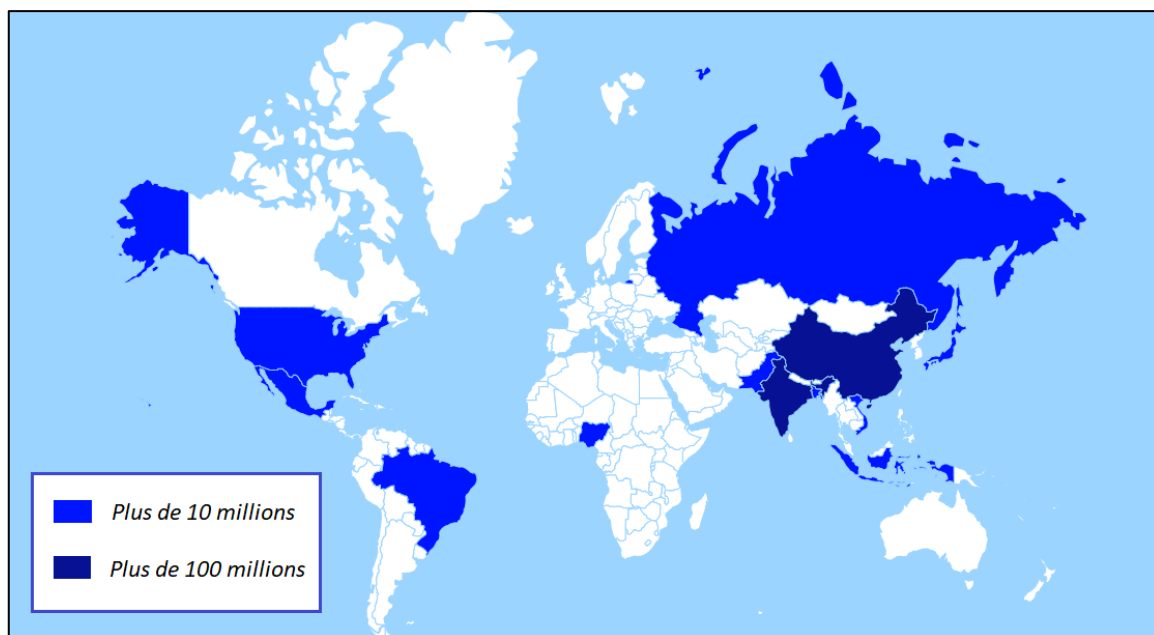


Figure 06: La prévalence mondiale de l'IRC en 2017. ^[2]

2.1.1. Prévalence de l'IRC selon le stade

Dans la population mondiale, la prévalence de la maladie selon les stades de son évolution était de 5,0% pour les stades 1 et 2 ; 3,9% pour le stade 3 ; 0,16% pour le stade 4 et 0,07% pour le stade 5 (Figure 07).

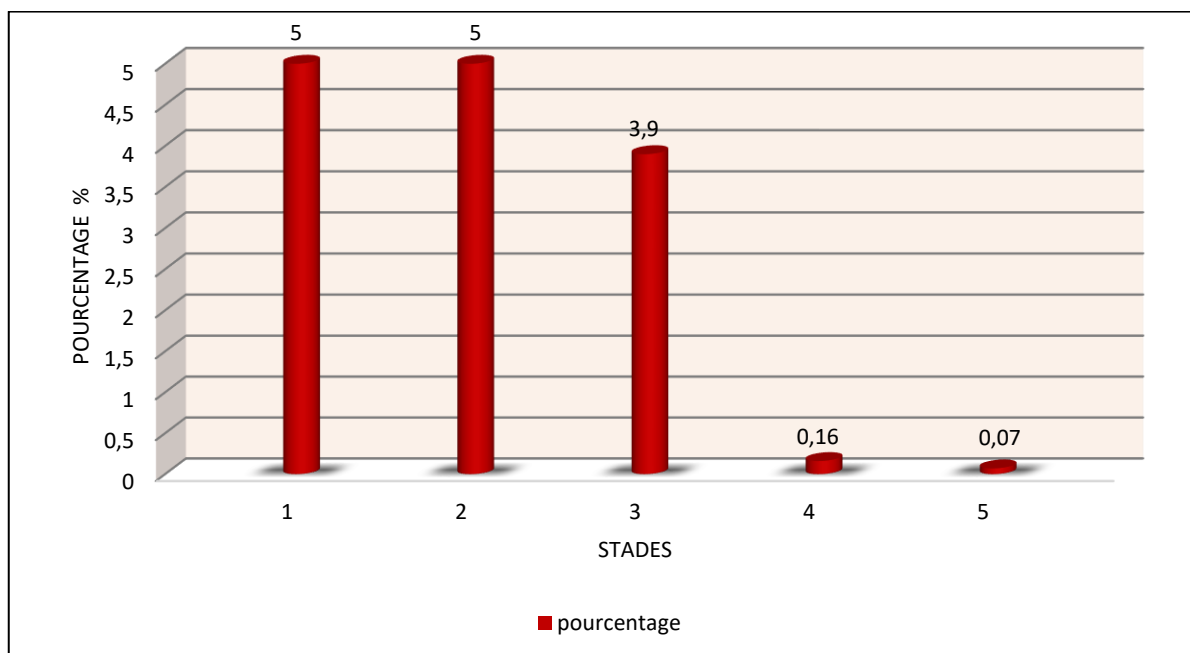


Figure 07: La prévalence de l'IRC selon les stades. ^[2]

2.1.2. Prévalence de l'IRC selon le sexe

L'IRC est plus fréquente chez les femmes et les filles (9,5%) que chez les hommes et les garçons (7,3%).^[2]

2.1.3. Prévalence de l'IRC selon les causes

Etant donné que les principales causes de l'IRC sont le diabète et l'hypertension, l'augmentation de l'incidence et de la prévalence de ces maladies entrainera à son tour un accroissement de l'incidence et de la prévalence de l'IRC. Cela a été constaté par une étude observationnelle réalisée par *Angela* et al en 2017 où ils ont estimé que le diabète représente 30 à 50% de toutes les MRC et affecte 285 millions (6,4%) d'adultes dans le monde, bien que ce nombre devrait augmenter de 69% dans les pays à revenu élevé et de 20% dans les pays à faible revenu et à revenu intermédiaire d'ici 2030. Le même constat était signalé pour l'hypertension dont plus d'un quart de la population en souffre bien que cette proportion devrait augmenter d'environ 60% d'ici 2025.^[27]

En Asie et en Afrique, l'augmentation de la prévalence de l'IRC est liée à l'utilisation des plantes médicinales qui ont un effet néphrotoxique. L'infection par VIH est endémique en Afrique subsaharienne, avec une atteinte rénale variant de 5 à 83%. La néphropathie au VIH varie suivant la race où elle affecte beaucoup plus les Afro-Américains que les blancs et les asiatiques.^[27]

2.2. A l'échelle nationale

La prévalence de l'IRC est en constante augmentation. Plus de 3500 nouveaux cas sont enregistrés chaque année, soit un taux d'incidence de 100 nouveaux cas par million d'habitants par an, en raison du vieillissement de la population et de l'augmentation de la prévalence de l'HTA et du diabète.^[28]

En novembre 2016, près de 23 900 patients en IRT étaient traités par épuration extra rénale (EER) et greffe rénale, dont 91% par hémodialyse (HD), 3% par dialyse péritonéale et seulement 6% par greffe rénale. La prévalence de l'IRT traitée est de 556 patients par million d'habitants. L'incidence est de 104 patients par an et par million d'habitants (figure 08).^[28]

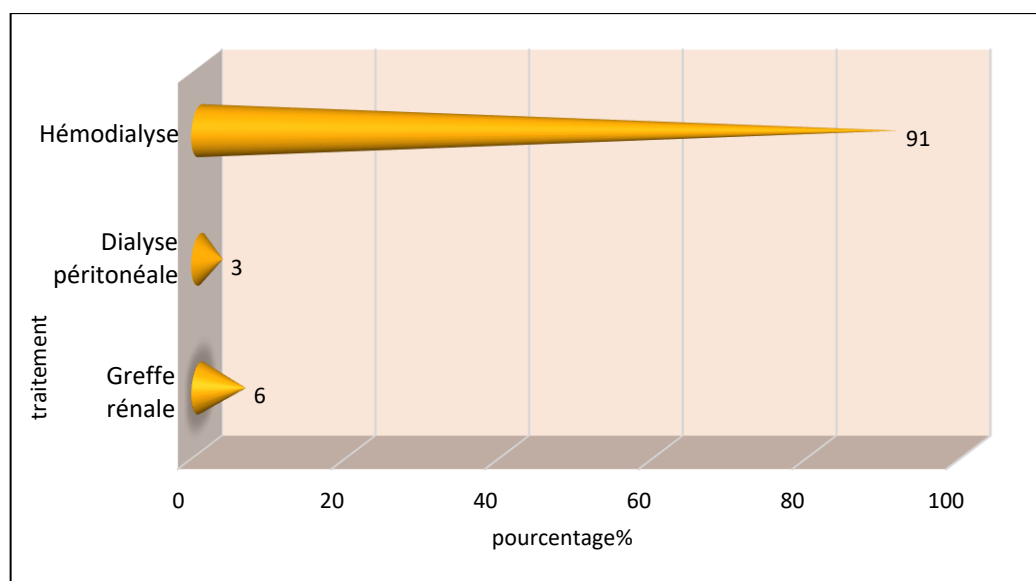


Figure 08 : La prévalence de l'IRT en Algérie selon le traitement. ^[29]

Selon les données du registre national des dialysés déclarées lors du 26^{ème} congrès national organisé par la société algérienne de néphrologie, dialyse et transplantation en 2018, plus de 23000 patients étaient des dialysés recensés à la fin de l'année 2018 dont 22667 étaient hémodialysés et 860 traités par dialyse péritonéale, 15000 étaient des enfants. C'est grâce à ce premier registre nationale des dialysés que la réalité se dégage en Algérie. ^[29]

Ce registre renseigne désormais que l'incidence annuelle des patients arrivés au stade de la dialyse est de 3000, mais ce chiffre ne concerne que les personnes sous surveillance. ^[29]

3- Evaluation de la fonction rénale

Le débit du plasma filtré par les reins ou DFG, est corrélé positivement à la masse néphronique fonctionnelle. Ainsi, la valeur du DFG diminue avec la perte néphronique, qu'elle soit liée à l'âge ou à une atteinte lésionnelle pathologique, ce qui en fait le meilleur marqueur quantitatif de la fonction rénale. ^[30]

Du fait de la complexité et du coût de la mesure du DFG, des techniques d'estimations ont été développées afin de les utiliser en pratique médicale courante. ^[31]

3.1. La mesure ou l'estimation du DFG

Le DFG peut être mesuré à partir de la clairance d'une substance exogène, qui n'est ni métabolisée ni sécrétée ou réabsorbée par les tubules rénaux. En pratique clinique

courante et dans le cadre du diagnostic précoce d'une insuffisance rénale, le DFG est estimé à partir du dosage de la créatininémie, en utilisant différentes équations.^[24]

➤ **Les différentes formules utilisées pour l'estimation du DFG**

Chez l'adulte, les plus utilisées sont la formule de Cockcroft et Gault proposée en 1976, la formule (MDRD) Modification of Diet in Renal Disease simplifiée à quatre paramètres en 2000 et pour terminer, la formule récente de Chronic Kidney Disease Epidemiology (CKD-EPI), développée en 2009.^[30]

○ **La formule de Cockcroft et Gault**

$$\text{DFG en ml/min} = ((140 - \text{âge}) \times \text{poids (en kg)}) / (k \times \text{créatinémie (en } \mu\text{mol/L)})$$

- $k = 1.23$ chez l'homme et 1.04 chez la femme et âge en année.
- Cette formule n'est pas indexée à la surface corporelle, elle permet juste d'estimer la clairance de la créatinine et non le DFG.
- Son utilisation est limitée parce que :
 - Elle surestime la fonction rénale des sujets obèses et sous-estime celle des patients âgés.
 - Elle est inexacte pour les patients dénutris et ceux présentant des troubles d'hydratation extracellulaire.^[18]

○ **La formule de MDRD**

Cette équation est plus précise que la précédente.^[32]

$$\text{Chez l'homme} = 186 \times (\text{créatinémie } (\mu\text{mol/L}) \times 0.0113) - 1.154 \times \text{âge} - 0.203$$

- $x : 1.21$ pour les sujets d'origine africaine.
- $x : 0.742$ pour les femmes.
- Elle aide à estimer le DFG indexé sur la surface corporelle.
- L'estimation du DFG par MDRD n'est pas souhaitable pour :

- Les sujets sains ou pour déterminer les premiers stades de l'IRC (parce qu'elle a été mise au point chez des patients ayant déjà une perte de la fonction rénale). [32]

- **La Formule CKD-EPI**

Cette formule est dérivée des quatre mêmes paramètres que pour la formule précédente. [30]

Equation

$$\text{DFG} = 141 \times \min(\text{Scr}/\text{K}, 1) \times \max(\text{Scr}/\text{K}, 1) \times 0.993^{\text{Age}} \times 1.018 \text{ (si sexe = femme)} \times 1.159 \text{ (race noir)}$$

- min indique le minimum de Scr/K ou 1.
- max indique le maximum de Scr/K ou 1.
- Scr : créatinine sérique ($\mu\text{mol/L}$).
- K : 0.7 pour les femmes et 0.9 pour les hommes.
- a : -0.329 pour les femmes et -0.411 pour les hommes.

Aux valeurs normales ou hautes du DFG, le CKD-EPI est plus performant que le MDRD, ce qui a conduit l'HAS à recommander préférentiellement l'utilisation de cette équation. [30]

3.2. Mesure de l'albuminurie et de la protéinurie

En cas de DFG normal, la fonction rénale peut être explorée par le dosage de l'albuminurie et de la protéinurie. La micro-albuminurie (terme quantitatif), désigne une albuminurie peu importante et non détectée par les méthodes traditionnelles de mesure ou du dépistage (bandelettes) de la protéinurie. La protéinurie peut être recherchée avec une bandelette urinaire, en cas de positivité, elle est confirmée et quantifiée. Ces deux derniers paramètres sont utilisés pour évaluer le risque de progression de l'IRC. [33]

4- Les symptômes de l'IRC

Les symptômes de l'IRC apparaissent plusieurs années après le début de la maladie. Les signes biologiques apparaissent lorsque la capacité des reins est réduite de 50 % et les signes cliniques lorsqu'elle n'est plus que de 25% mais lorsqu'ils apparaissent, ils sont peut caractéristiques :

- Fatigue anormale à l'effort.
- Envies fréquentes d'uriner avec des urines foncées, troubles et mousseuses.
- Nausées, vomissements, perte de l'appétit et du poids.
- Mauvais gout dans la bouche et mauvaise haleine.
- Trouble du sommeil et somnolence pendant la journée.
- Crampes musculaires surtout au niveau des jambes. ^[34]
- Démangeaisons persistantes.
- Œdèmes des paupières et/ou des chevilles. ^[34]

5- Physiopathologie de l'IRC

Une fois que le mécanisme est déclenché, il progresse inexorablement vers l'IRT, le point de non-retour étant situé à une filtration glomérulaire aux alentours de 30 ml/min. Cette progression de l'insuffisance rénale intervient quelle que soit la nature de la maladie rénale initiale et se poursuit même lorsque l'agression initiale est interrompue. ^[35]

Ce phénomène est en commun avec toute maladie rénale et met en jeux plusieurs mécanismes conduisant à une fibrose interstitielle, une atrophie des tubules et une raréfaction des capillaires qui les entourent. ^[36]

Le premier mécanisme qui se met en place est la réduction du nombre des néphrons, ce qui provoque une modification fonctionnelle et morphologique des néphrons sains restants. Cela est initialement adaptatif mais secondairement deviendra délétère. ^[35]

La réduction néphronique entraine une HTA sévère donc hyperfiltration et augmentation de la pression capillaire due à une vasoconstriction d'artéioles efférentes sous l'effet de l'Ang II ainsi qu'une perte de l'autorégulation glomérulaire, menant à une augmentation du DFG et une élévation de la pression sur les parois entraînant une sclérose progressive et une destruction complète. ^[36]

En plus de son effet hémodynamique, l'Ang II contribue à l'augmentation de la perméabilité capillaire envers les macromolécules et major la protéinurie. ^[36]

Le second mécanisme qui intervient est le résultat du mécanisme précédent. En effet, les modifications hémodynamiques vont altérer le glomérule (augmentation de perméabilité aux macromolécules) ce qui va aggraver la protéinurie. ^[35]

Les protéines filtrées sont réabsorbées et sont responsables d'une activation tubulaire proximale. Ceci résulte en la fabrication en excès de substances vasoactives et pro-inflammatoires, qui elles-mêmes sont sécrétées vers l'interstitium rénal et responsables de lésions inflammatoires. [37]

Tous les phénomènes de la glomérulosclérose associés à une fibrose interstitielle extensive vont progresser vers la destruction progressive du parenchyme rénal et mènent à l'IRT. [35]

6- Facteurs de progression de l'IRC

Il est important de noter qu'une proportion importante de l'ordre de 20 % des malades atteignant le stade final de l'IRC n'ont pas de maladie rénale causale clairement identifiée. Par contraste, les facteurs responsables du développement et de la progression de l'IRC sont mieux connus. Ils peuvent être répartis en trois classes :

- La première inclut les facteurs non modifiables tels que : l'âge, le sexe, les facteurs génétiques et ethniques.
- La deuxième comprend les facteurs de progression intrinsèques comme les anomalies immunologiques et inflammatoires présentes au cours des glomérulonéphrites, les modifications hémodynamiques consécutives à l'HTA ou encore les modifications métaboliques du diabète et des dyslipidémies.
- Enfin, la troisième est constituée des facteurs modifiables généraux sur lesquels il est possible d'agir pour limiter la progression de l'insuffisance rénale (pression artérielle, protéinurie, hyperglycémie, dyslipidémie). [22]

7- Les causes de l'IRC

Les causes de l'IRC chez les enfants sont significativement différentes de celles observées chez les adultes. Ainsi si l'hypertension et la néphropathie diabétique prédominent chez les adultes, elles ne constituent pas des causes fréquentes chez les enfants chez lesquels prédominent plutôt des anomalies urologiques congénitales. [38]

7.1. La néphropathie vasculaire

Elle regroupe l'ensemble des pathologies aiguës ou chroniques ayant pour cible la vascularisation rénale macro et/ou microscopique. [39]

- **Néphropathie hypertensive**

Elle est considérée comme responsable d'environ 20% des IRT traitées par dialyse dans la plupart des pays européens. Elle comporte des lésions artériolaires aboutissant au rétrécissement de leurs lumières. À un stade avancé de la néphro-angiosclérose, l'atteinte de tous les éléments du parenchyme rénal est observée. ^[40]

- **Sténose des artères rénales (atteinte des gros vaisseaux des reins)**

Correspond au rétrécissement d'une ou des deux artères rénales. Elle peut être congénitale ou secondaire à une plaque d'athérome (le plus fréquent). Ce rétrécissement est à l'origine d'une mauvaise perfusion rénale, qui a pour conséquence une augmentation de la pression artérielle générale et à terme, une IRC. ^[41]

7.2. La néphropathie diabétique (ND)

Elle représente 15% à 40 % des cas en Europe. ^[42]

De point de vue physiopathologique, elle semble être le résultat d'interactions entre des facteurs métaboliques et hémodynamiques, ces deux facteurs vont contribuer à la constitution de la néphropathie. L'hyperglycémie mène à la formation des produits de glycation avancés (Advanced Glycation End-products (AGEs)) qui vont se fixer sur le collagène de la membrane basale glomérulaire (MBG), sur les cellules mésangiales, endothéliales et les podocytes. Les conséquences de la génération des AGEs sont une production de diverses cytokines, facteurs inflammatoires et de facteurs de croissances cellulaires avec comme résultante une expansion de la matrice mésangiale et une glomérulosclérose. ^[43]

L'hyperglycémie entraîne aussi une vasodilatation rénale et une augmentation de la réabsorption sodée proximale par le biais des co-transporteurs sodium-glucose (SGLT 1 et 2). Tout ceci favorise l'augmentation du DFG. Cette hyper-filtration est associée à une augmentation de la pression capillaire glomérulaire. ^[18]

L'augmentation de la pression intra-glomérulaire se traduit par une dilatation des glomérules ce qui entraîne un épaissement progressif de leurs membranes. La qualité fonctionnelle du filtre glomérulaire va s'altérer et le glomérule va laisser passer de plus en plus d'albumine, elle-même toxique pour les segments distaux du néphron. Les glomérules vont se scléroser. ^[44]

7.3. Les glomérulonéphrites (GN) chroniques

Représentent une cause importante de l'IRT. Elles diffèrent par leur histologie dont on distingue :

- **La Néphropathie à l'immunoglobuline A (NIGA) « ou maladie de Berger »**

Elle reste la principale cause de l'IRT chez le jeune adulte. [45]

Cette glomérulonéphrite est caractérisée par le dépôts d'IgA dans le mésangium glomérulaire et la face interne de la MBG (figure 09). Sur le plan histologique, elle se manifeste par une prolifération mésangiale et une hypertrophie de cette dernière, associée à des lésions d'atrophie tubulaire ainsi qu'une fibrose ou une inflammation interstitielle.

[40]

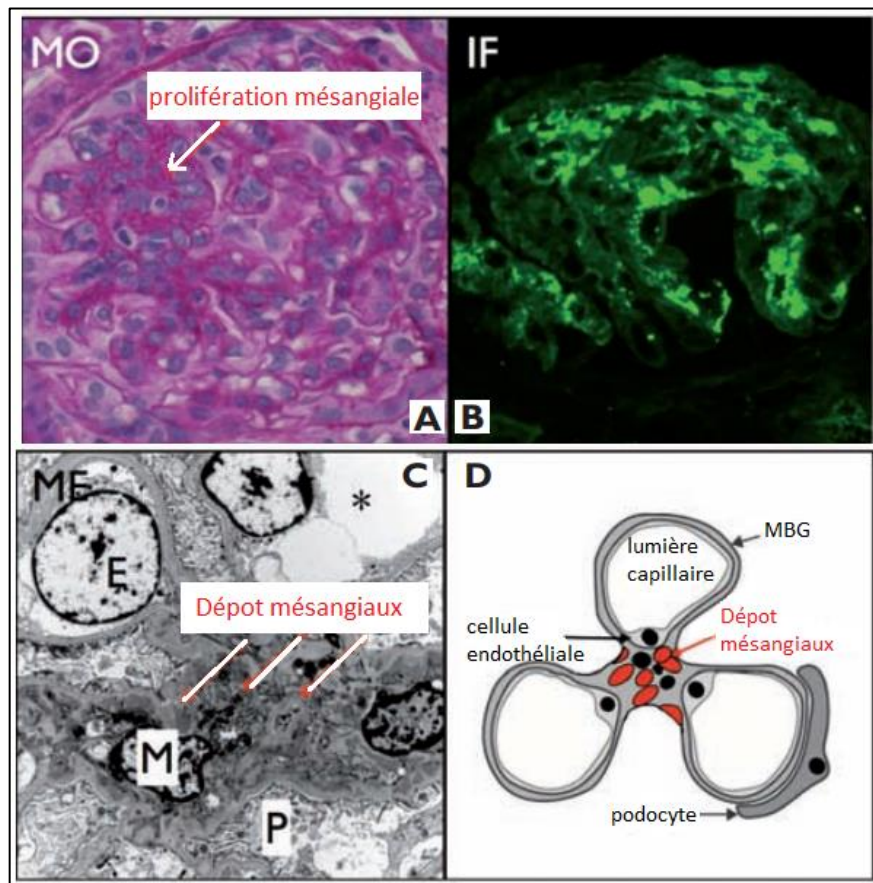


Figure 09: Néphropathie à IgA. [45]

- **La glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM)**

Elle est définie par le dépôts d'immunoglobuline G (IgG) sur le versant externe de la MBG secondaire à une maladie systémique (infection auto-immune, lupus érythémateux ...) (figure 10).^[45]

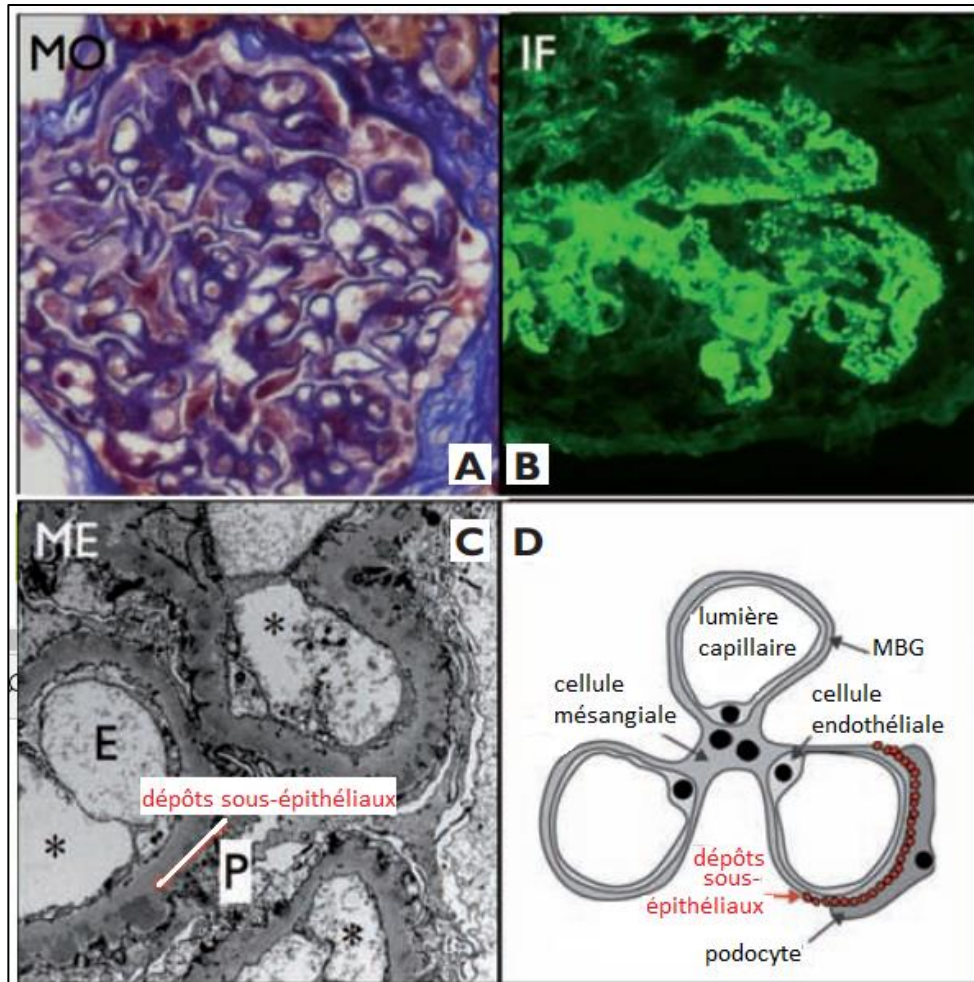


Figure 10 : Glomérulonéphrite extra-membraneuse.^[45]

- **Lésions glomérulaires et hyalinose segmentaire et focale (HSF)**

La maladie à lésions glomérulaires et l'HSF sont regroupées sous le terme de syndrome néphrotique idiopathique (SNI). La pathogénie de ce dernier comprend des atteintes de l'intégrité structurale et fonctionnelle des podocytes, altérant la barrière de filtration glomérulaire.

Comme il existe d'autres pathologies qui sont à l'origine de cette glomérulonéphrite (GN membrano-proliférative ...). Quel que soit le type de GN, les principaux facteurs de progression sont la protéinurie et l'HTA.^[45]

7.4. Les néphropathies interstitielles chroniques

Elles constituent 30% des IRC et sont caractérisées par des lésions du tissu interstitiel. ^[46]

7.5. Les pyélonéphrites

Elles sont dues à des infections urinaires récurrentes, surtout chez la femme. La bactérie en cause est dans 85% des cas l'*Escherichia Coli, colibacille* provenant de la flore intestinale. Si la bactérie atteint des voies urinaires qui se vident mal, soit du fait d'un obstacle (calcul, rétrécissement, grosse prostate), soit du fait d'une gêne fonctionnelle (reflux vésico-urétéral, malformation), elle se multiplie et remonte dans le rein. C'est la répétition de ces infections qui provoquent une inflammation du tissu interstitiel rénal. L'évolution vers IRT est lente (10 à 40 ans). ^[46]

7.6. Les intoxications chimiques

Elles peuvent être professionnelles ou médicamenteuses (néphrotoxiques) ^[46], tels que les agriculteurs exposés à des épisodes répétés de pesticides et des engrais à base des produits néphrotoxiques et les intoxications médicamenteuses dues aux plantes médicinales traditionnelles qui sont potentiellement néphrotoxique. Ces dernières contiennent l'acide aristolochique. Ces intoxications sont généralement observées en Chine. ^[47]

7.7. Les maladies congénitales et héréditaires

- **La maladie polykystique ou polykystose rénale**

Cette maladie représente 8% des IRC. C'est une maladie héréditaire qui touche les deux sexes. Elle est caractérisée par le développement de nombreux kystes dans les deux reins. Elle peut évoluer à l'âge adulte vers l'IRC, mais de façon très lente. ^[46]

- **Le Syndrome d'Alport**

Une maladie héréditaire définie par l'association d'une néphropathie glomérulaire avec hématurie évoluant vers l'IRT et d'une surdité de perception. Elle est caractérisée par des anomalies de la composition biochimique de la MBG entraînant un défaut de filtration. ^[46]

8- Les complications de l'IRC

L'IRC entraîne de multiples troubles biologiques et cliniques.

8.1. Défaut d'excrétion des déchets azotés

Les déchets qui proviennent du catabolisme des protéines telles que l'urée et la créatinine sont excrétés par filtration glomérulaire. Leurs accumulations du fait de la réduction néphronique entraîne des effets délétères « syndrome urémique ». [36]

8.2. Les troubles de l'équilibre acide-base

L'élimination des ions H^+ est perturbée au cours de l'IRC. L'ammoniogenèse et l'excrétion urinaire d'ammonium (NH_4^+) sont réduites par suite de la diminution de la masse tubulaire. En effet, les ions H^+ en excès sont neutralisés par des tampons tissulaires, en particulier osseux, ce qui induit l'augmentation de la phosphatémie. Il est très vraisemblable que l'acidose métabolique de l'IRC, même modérée, contribue à la progression de la maladie. [40]

Parmi les conséquences de l'acidose métabolique une dégradation protéique musculaire excessive, une aggravation des lésions d'ostéodystrophie et une majoration du risque d'hyperkaliémie. [18]

8.3. Les troubles hydro-électrolytiques

Les troubles du sodium, de l'eau, et du potassium sont généralement tardifs car les néphrons restants sont capables d'augmenter leurs fonction d'excrétion. [48]

- **Hyperkaliémie**

Elle représente le taux du potassium plasmatique qui est supérieur à 5,5 mmol/l. Chez un sujet en bonne santé, elle est rare car le mécanisme d'adaptation notamment la sécrétion tubulaire est efficace [48], mais en cas d'IRC, l'hyperkaliémie est favorisée par l'acidose métabolique, la prise de certains médicaments tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et par le diabète associé à un syndrome d'hyporéninisme - hypoaldostéronisme. [18]

- **Hypernatrémie**

Une rétention hydrosodée contribuant à l'HTA est présente dès les stades précoces de l'IRC mais cette rétention reste très modérée jusqu'au stade préterminal. En cas de

déplétion ou de surcharge hydrosodée aiguë, la capacité des reins à adapter le bilan hydrosodé pour maintenir la stabilité de la composition corporelle est réduite. ^[18]

8.4. Troubles hématologiques

- **Altération de la fonction endocrine**

Les recommandations européennes sur l'anémie de l'IRC proposent de porter le diagnostic d'anémie pour un taux d'hémoglobine (Hb) inférieur à 13,5 g/dl chez l'homme au-dessous de 70 ans, inférieur à 12 g/dl chez l'homme au-dessus de 70 ans et inférieur à 11,5 g/dl chez la femme. L'anémie de l'IRC est généralement normochrome normocytaire arégénérative. ^[49]

Cette anémie peut être liée soit à un déficit en EPO (diminution de sa synthèse due à une apoptose des cellules myofibroblastiques qui sont à l'origine de sa production), une inhibition de l'érythropoïèse induite par l'urémie ou une diminution de la durée de vie des globules rouges et un déséquilibre de l'homéostasie du fer.

Elle peut être due à un déficit martial lié aux pertes sanguines dans les circuits d'HD ou une perturbation de l'absorption intestinale du fer par plusieurs traitements (inhibiteurs de la pompe à protons, chélateurs du phosphate...). ^[50]

8.5. Trouble du métabolisme phosphocalcique

La réduction néphronique entraîne une diminution de la synthèse du calcitriol responsable d'une tendance à l'hypocalcémie. Cette diminution de synthèse est également favorisée par l'acidose métabolique et par l'accumulation du phosphate dans les cellules tubulaires rénales. ^[40]

La diminution du calcitriol induit aussi une augmentation de la sécrétion de la PTH par rétrocontrôle des parathyroïdes (hyperparathyroïdie secondaire), entraînant une augmentation du remodelage osseux. Cliniquement, ces troubles du métabolisme phosphocalcique se manifestent par deux grands types de lésions osseuses qui peuvent s'associer pour constituer la maladie osseuse rénale :

- L'ostéite fibreuse correspondant à une destruction osseuse accélérée, consécutive à l'hyperparathyroïdie secondaire.
- L'ostéomalacie correspondant à une diminution de la formation osseuse, consécutive à une carence en vitamine D. ^[51]

8.6. Autres complications liées à l'IRC

➤ HTA et maladies cardiovasculaires (MCV)

L'HTA est un facteur traditionnel majeur de l'IRC. Elle représente à la fois une cause et une conséquence. Sa prévalence augmente avec la sévérité de l'IRC chez 90% des sujets. L'augmentation de cette pression est induite par plusieurs mécanismes dont le plus important est la rétention hydrosodée qui entraîne une élévation de la volémie et de la pression sanguine. Cette dernière va induire une dysfonction endothéliale précoce qui constitue un élément fondateur de l'athérosclérose. [52]

L'hypertension favorise aussi l'atteinte cardiaque et entraîne une hypertrophie myocardique surtout chez les sujets dialysés. [40]

➤ Conséquences digestives

Nausées voire vomissements reflètent une intoxication urémique importante. Une gastrite et un ulcère majorent l'anémie secondaire à l'IRC.

➤ Les conséquences neurologiques

- Les crampes sont fréquentes. Elles peuvent être liées à des problèmes d'hydratations, ou à des anomalies électrolytiques comme l'acidose métabolique, l'hypocalcémie ou l'hypomagnésémie.
- L'encéphalopathie urémique survient en cas d'IRC majeure.
- L'encéphalopathie hypertensive est en règle régressive avec le contrôle tensionnel. [53]

9- Diagnostic de l'IRC

Le diagnostic précoce a pour but d'éviter la progression de la maladie vers le stade terminal, ainsi que la mise en place d'un traitement bien adapté et le respect des règles d'hygiéno-diététiques qui peuvent notablement en ralentir la progression. [54]

La mise en évidence d'une MRC comprend les étapes suivantes :

9.1. Affirmé la présence d'une maladie rénale chronique (MRC)

Pour s'assurer si une pathologie rénale existe réellement, il faut dans tous les cas connaître :

- Le DFG.
- S'il existe une protéinurie (albuminurie).
- S'il existe une anomalie du sédiment urinaire (hématurie ou leucocyturie) et savoir s'il existe une anomalie morphologique des reins ou des voies excrétrices. ^[55]

9.2. Affirmé le caractère chronique de la maladie rénale

Le caractère chronique se définit par l'ancienneté de l'insuffisance rénale (plus de trois mois) et/ou une anémie normochrome normocytaire arégenerative et/ou une hypocalcémie associée et/ou une atrophie rénale à l'échographie. Cependant la taille des reins peut être conservée et parfois même augmentée dans certaines situations (amylose, diabète, polykystose rénale...). ^[55]

9.3. Diagnostic étiologique

Il est recommandé de rechercher systématiquement l'étiologie de l'insuffisance rénale car sa découverte peut conduire à la mise en œuvre d'un traitement spécifique qui aura d'autant plus de chance d'être efficace s'il sera instauré précocement (Tableau III). ^[56]

Revue bibliographique

Tableau III : Bilan initial à faire devant la découverte d'une IRC. [56]

Interrogatoire	Examen clinique	Examens paracliniques
<p>Rechercher à l'interrogatoire :</p> <p>Des antécédents familiaux de néphropathie, des antécédents personnels :</p> <ul style="list-style-type: none"> - de diabète, d'hypertension artérielle, de maladie athéromateuse. - d'infections urinaires hautes récidivantes, d'uropathie, de lithiase. - de maladie systémique ou de maladie auto-immune. - de goutte. - de protéinurie, d'hématurie. <p>La prise chronique ou intermittente de médicaments potentiellement néphrotoxiques:</p> <p>Anti-inflammatoires non stéroïdiens, antalgiques, lithium, anti-calcineurines (ciclosporine, tacrolimus), sels d'or, D-pénicillamine, certaines chimiothérapies, certains antiviraux...</p> <p>L'exposition à des toxiques professionnels :plomb, cadmium.</p>	<p>Rechercher à l'examen clinique :</p> <ul style="list-style-type: none"> - une hypertension artérielle, un souffle vasculaire sur les axes artériels, la disparition de pouls périphérique. - des œdèmes, des reins palpables, un obstacle urologique (globe vésical...). - des signes extrarénaux de maladie systémique. <p>Bandelette urinaire lors de la consultation à la recherche:</p> <ul style="list-style-type: none"> - d'une hématurie. - d'une protéinurie. - d'une leucocyturie. - de nitrites, en faveur d'une infection des urines à germes à Gram négatif. 	<p>Examens biologiques sanguins :</p> <p>- Électrophorèse des protéines sériques</p> <p>Glycémie à jeûn : le diabète est défini par une glycémie à jeun (au moins 8 h de jeûne)³ 1,26 g/l (7 mmol/l) vérifiée sur un deuxième prélèvement.</p> <p>Examens biologiques urinaires :</p> <p>Protéinurie des 24 h (associée à un dosage de la créatininurie des 24 h, qui permet de valider la qualité du recueil urinaire des 24 h) ou rapport protéinurie/créatininurie sur un échantillon d'urine si le recueil des urines de 24 h n'est pas possible.</p> <p>Cytologie urinaire quantitative sur urines fraîches:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pour rechercher et quantifier une hématurie (numération des globules rouges par ml), une leucocyturie (numération des leucocytes par ml) ; <p>Imagerie :</p> <p>L'échographie rénale : taille des reins, asymétrie, des contours bosselés, gros reins polykystiques, néphrocalcinose, calculs, hydronéphrose, kyste(s), tumeur(s).</p> <p>L'échographie vésicale : pathologie du bas appareil, résidu post-mictionnel.</p> <p>L'abdomen sans préparation : calculs, calcifications artérielles.</p>

9.4. Identifier les facteurs de progression

Les maladies rénales sont progressives, quoique la vitesse d'évolution soit variable d'une maladie à une autre. Cette progression est conditionnée par de nombreux facteurs (tableau IV).^[57]

L'ensemble de ces facteurs joue un rôle prépondérant dans la progression de maladie rénale, seule l'hypertension et la protéinurie sont modifiables et font l'objet d'un impact thérapeutique.^[57]

Tableau IV: Principaux facteurs de risque de progression des maladies rénales.^[57]

<ul style="list-style-type: none"> • Facteurs génétiques : les polymorphismes des différents gènes des divers composants du système rénine-angiotensine. • Facteurs ethniques : progression plus rapide chez les sujets noirs que caucasiens. • Type de la néphropathie : progression plus rapide des néphropathies glomérulaires et vasculaires. • Protéinurie abondante
<ul style="list-style-type: none"> • Facteurs environnementaux : <ul style="list-style-type: none"> - Exposition au tabac - Exposition à des néphrotoxiques médicamenteux, industriels ou environnementaux.

10- Traitement de l'IRT

Lorsque la valeur du DFG est inférieure à 15 ml/min et les conséquences cliniques et métaboliques commencent à apparaître. À ce moment un traitement substitutif s'impose dans le but de corriger les complications induites par le déficit quasi total des fonctions d'excrétions.

On distingue trois méthodes substitutives de la fonction rénale qui sont :

- Hémodialyse (HD).
- Dialyse péritonéale.
- Transplantation rénale.

Il est nécessaire de connaître que ces traitements sont complémentaires et non plus concurrentiels. Parfois, il est nécessaire de les proposer successivement. ^[7]

➤ L'Hémodialyse (HD)

Le terme « hémodialyse » recouvre l'ensemble des méthodes EER qui ont en commun une circulation sanguine extracorporelle, un module d'échange entre le milieu intérieur et le milieu extérieur (hémodialyseur) et une solution électrolytique vectrice des échanges. ^[58]

L'hémodialyse permet d'épurer le sang des déchets qui sont normalement éliminés dans les urines (créatinine, urée), de corriger un éventuel déséquilibre électrolytique sanguin (taux normale de sodium, de potassium, de bicarbonates, ...) et de rééquilibrer le pH du sang en cas d'acidose (acidité sanguine excessive) (figure 11). ^[59]

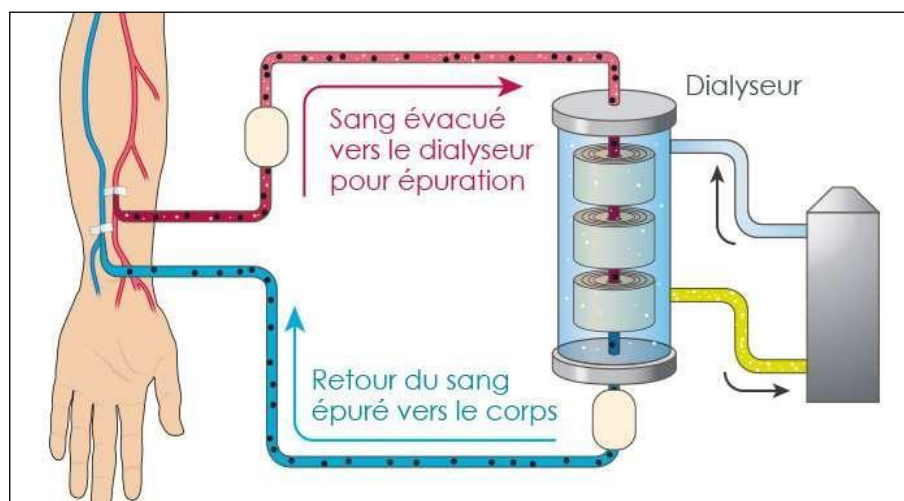


Figure 11 : Hémodialyse. ^[60]

➤ La dialyse péritonéale

Constitue un traitement de première intention de l'IRT. Il s'agit d'une technique endo-corporelle (figure 12), douce qui s'effectue à domicile. Elle utilise le péritoine comme une membrane naturelle, très vascularisée et semi perméable qui permet les échanges entre le sang et le dialysat ^[61], (c'est-à-dire à travers ce filtre naturel la diffusion des déchets et d'eau en excès du sang de patient vers le dialysat). Ce dernier est introduit dans la cavité péritonéale grâce à un cathéter préalablement implanté (chirurgicalement) dans l'abdomen ^[1]. Les échanges effectués permettent d'assurer l'épuration extrarénale et de maintenir l'équilibre hydro-sodé et acido-basique. ^[62]

Il existe deux formes de dialyse péritonéale :

- La dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA) : le patient remplace lui-même la solution de dialyse quatre à cinq fois par jours. L'échange de la poche ne nécessite aucun appareil.
- La dialyse péritonéale automatisée (DPA) : cette technique requiert l'utilisation d'un appareil programmable appelé cycleur qui assure les échanges lui-même grâce à l'automatisation de la dialyse. Le patient peut être dialysé la nuit durant son sommeil. [63]

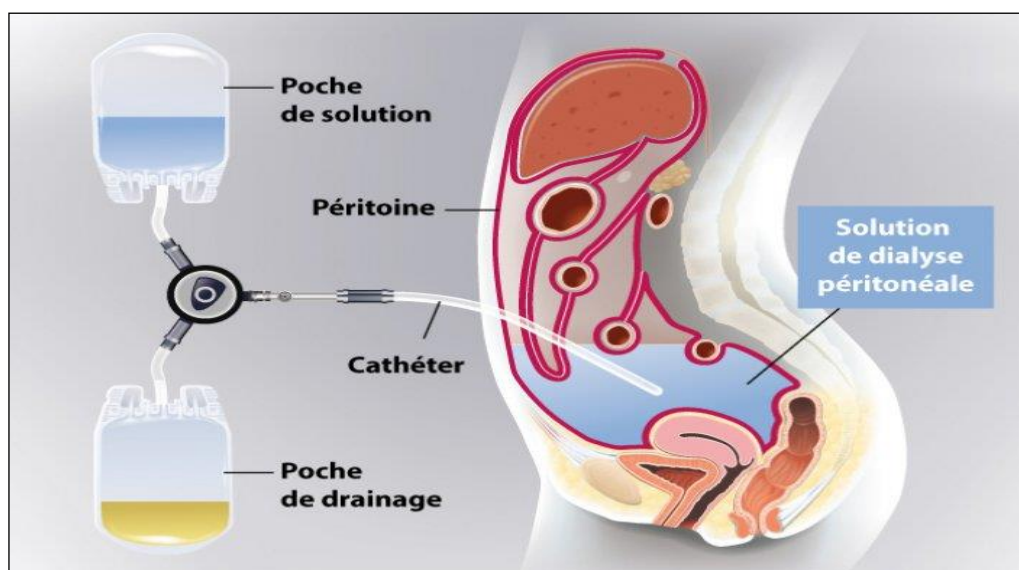


Figure 12 : Dialyse péritonéale. [64]

➤ La transplantation rénale

Représente de nos jours le traitement idéal de l'IRC. Elle permet non seulement de prolonger la vie mais aussi d'assurer une meilleure qualité de vie. [65]

Il s'agit d'une technique chirurgicale qui consiste à prélever le rein sain d'un donneur et de le réimplanter sur le malade au niveau de la fosse iliaque dans le but de remplacer le rein défectueux. [66]

Le prélèvement rénal provient soit d'un donneur vivant ou d'un donneur en état de mort cérébrale. La greffe des reins est soumise à des règles immunologiques. Il faut assurer une compatibilité optimale entre les données immunologiques du rein appartenant au sujet donneur et celles du receveur de façon à limiter le risque de rejet de la greffe. En plus, des traitements lourds « les immunosuppresseurs » sont nécessaires à prendre toute la vie afin de réduire les risques du rejet. [67]

Chapitre 01

Enzyme de conversation de l'angiotensine
(ACE)

I. Rappel sur système rénine angiotensine (SRA)

SRA a été décrit comme un système endocrine par *H.Goldblatt* en 1934, il consiste en une cascade d'interactions biochimiques aboutissant à la production de l'Ang II (figure 13).^[68]

Il est constitué des enzymes protéolytiques telle que la rénine et ACE mais également de peptides ayant ou non un potentiel vasoactif (angiotensinogène, Ang I et Ang II) ainsi que deux types de récepteurs à sept domaines transmembranaires, le récepteur 1 de l'angiotensine II (AT1R) et le récepteur 2 de l'angiotensine II (AT2R) jouant le rôle de protéines fonctionnelles de ce système.^[69]

La mobilisation de ce système commence par la synthèse de la rénine, cette dernière représente une enzyme limitante, sa synthèse est déclenchée par la baisse de la pression hydrostatique détectée au niveau des artérioles afférentes glomérulaires, les niveaux d'Ang II et la quantité du sodium délivrée à la macula densa ainsi que la concentration plasmatique du potassium.^[70]

La rénine agit pour cliver l'angiotensinogène synthétisé par le foie formant l'Ang I. L'ACE convertit par la suite l'Ang I en Ang II.^[70] Cette enzyme protéolytique se trouve dans les cellules endothéliales des poumons, l'endothélium vasculaire et les membranes cellulaires des reins, du cœur et du cerveau. L'ACE dégrade également la bradykinine en fragments inactifs ; réduisant le niveau sérique des vasodilatateurs endogènes. Les composants de cette voie sont connus sous le nom du SRA circulant, cette même cascade est présente également dans les tissus où elle est connue sous le nom du SRA tissulaire.^[70]

Enfin, l'Ang II est distribué aux organes où il exerce ses différents effets physiologiques.^[71]

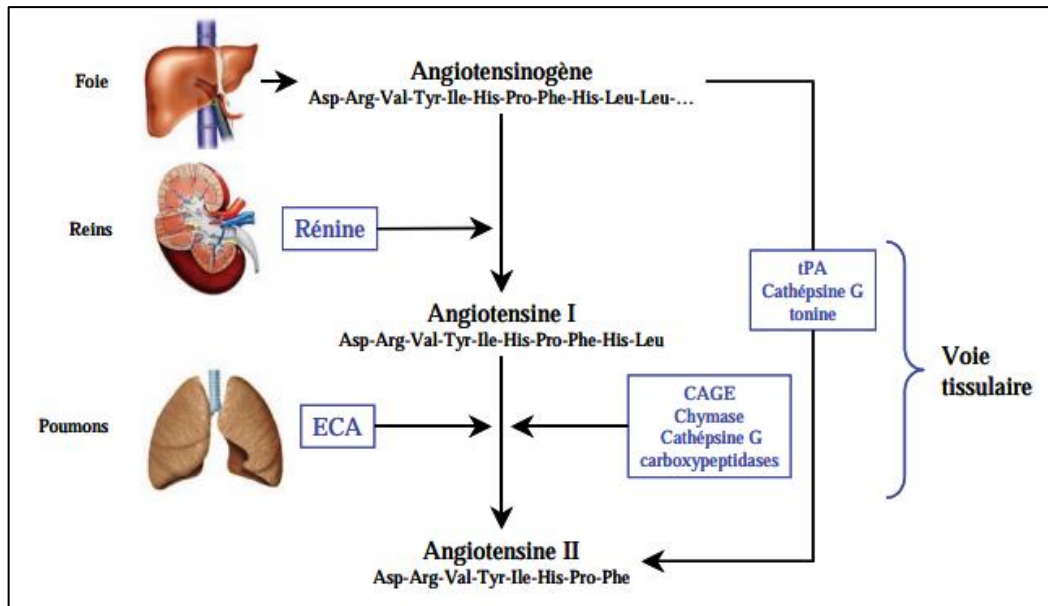


Figure 13 : La cascade du système rénine angiotensine (SRA).^[72]

Il exerce son action par l'intermédiaire des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétéro-trimériques (RCPG). Les effets physiologiques de l'Ang II sont majoritairement attribués à AT1R et AT2R ; Par exemple, AT1R assure la médiation des actions hémodynamiques, des fonctions endocriniennes et des effets mitogéniques d'Ang II au niveau du rein, tandis que l'AT2R régule le développement des organes fœtaux et possède des effets vasodilatateurs et antiprolifératifs (figure 14).^[68]

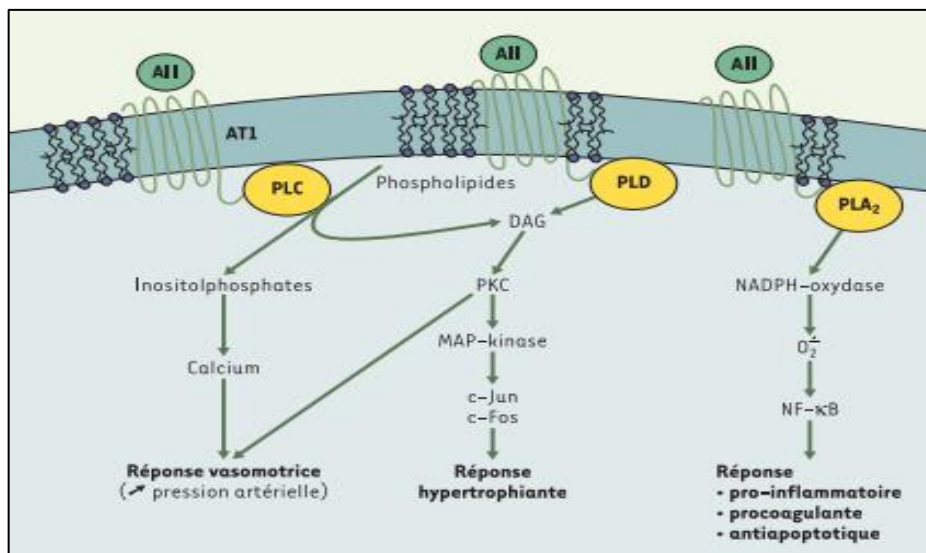


Figure 14 : Signalisation intracellulaire par l'Ang II.^[68]

L'Ang II a de nombreuses cellules cibles parmi lesquelles : les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses des vaisseaux et de nombreux autres organes (Tableau V).^[68]

Tableau V: Localisation des deux types de récepteurs de l'Ang II (AT1R et AT2R).^[68]

	AT1R	AT2R
Localisation	<ul style="list-style-type: none"> - le système vasculaire. -les reins. -le cœur. -le foie. - le cerveau. 	<ul style="list-style-type: none"> -la médullosurrénale. -l'utérus. -les ovaires. -l'endothélium vasculaire. -les zones cérébrales.

Via la fixation aux AT1R, l'Ang II peptide avant tout vasoconstricteur, a plusieurs effets :

- La vasoconstriction des artérioles : augmentation de la pression artérielle.
- La Sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales : réabsorption tubulaire de Na et donc l'augmentation de la rétention hydrosodée et de la pression artérielle.
- Activation du système sympathique.

Enfin, l'angiotensine II est un médiateur important de la sensation de soif, la libération des catécholamines et de la vasopressine.^[73]

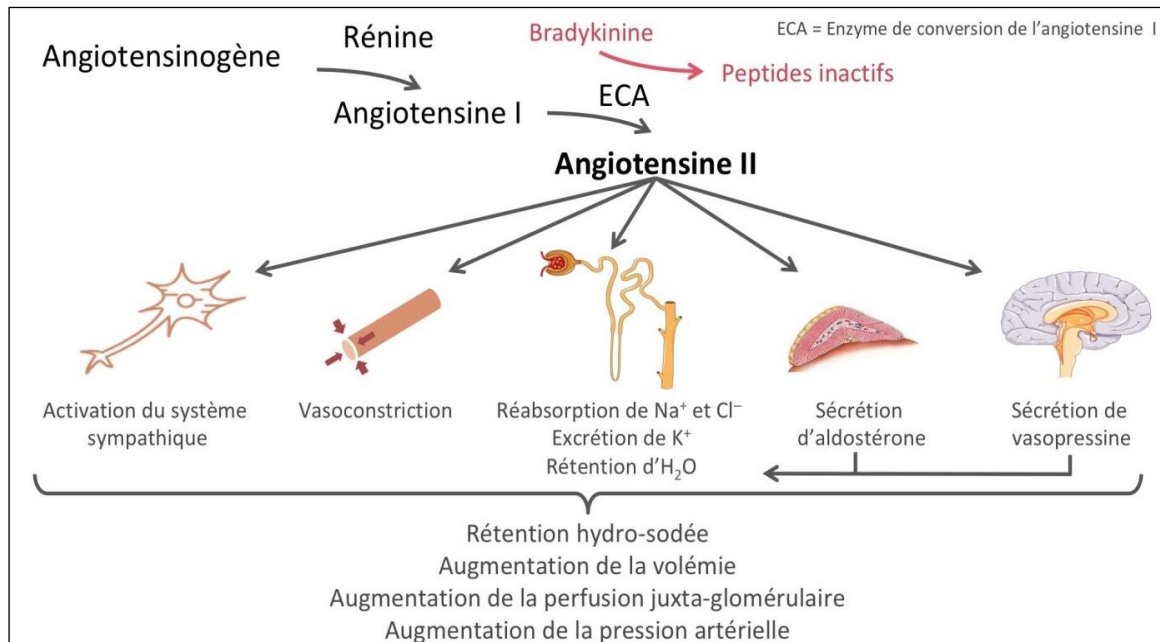


Figure 15 : Les différents rôles de l'Ang II. [74]

Il intervient aussi dans la croissance et la prolifération des cellules en stimulant diverses cytokines et facteurs de croissance. [70]

II -Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)

1- Définition

Une enzyme ubiquitaire de distribution très large. Elle est connue sous différentes dénominations « La dipeptide carboxypeptidase » ou « la peptidyl peptide hydrolase » ou « kininase II ». Elle possède de nombreux substrats comme l'angiotensine I, la bradykinine, l'enképhaline. [5]

2- Forme

Chez l'être humain, il existe deux formes ; une forme somatique (sACE) avec une masse moléculaire de 170 kilodalton (kDa), qui est exprimée dans les tissus somatiques et une forme testiculaire (tACE) également appelée forme germinale (gACE) avec une masse moléculaire plus faible de 100 kDa, exprimés dans des cellules germinales dans les testicules. [75] Ces deux enzymes généralement présentes à la surface des cellules peuvent également apparaître sous une forme soluble dans la circulation suite au clivage de l'ACE membranaire par l'enzyme ACE-sécrétase. [69] Le clivage protéolytique de la partie transmembranaire et intracellulaire peut se faire d'une manière spécifique ou

aléatoire, les deux formes circulantes « soluble » et « membranaire » sont pratiquement identiques.^[76]

L'ACE se trouve liée à la membrane dans les cellules endothéliales et différents types de cellules épithéliales et neuro-épithéliales ainsi que sous une forme circulante dans les fluides biologiques, tel que le plasma, le liquide céphalorachidien, le liquide amniotique et le liquide séminal.^[76]

3- Structure

L'ACE a une forme globale elliptique, creusée d'un sillon central, situé sous un couvercle formé par trois hélices alpha et qui est le siège de l'activité catalytique.^[77]

C'est une protéine hautement glycosylée (les sucres représentent selon les formes 20 à 30% du poids moléculaire de l'enzyme).^[5] Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur avec un peptide signal qui est clivé pour donner la molécule mature.^[5]

L'étude de la séquence de l'ACE membranaire a mis en évidence une structure protéique comportant quatre domaines distincts : un court domaine intracellulaire carboxy-terminal de 24 acides aminés (aa), un domaine transmembranaire hydrophobe de 20 aa servant d'ancrage de la protéine dans la membrane cellulaire, deux domaines extracellulaires montés en séries, ayant entre eux une forte homologie 60% et possédant chacun un site actif pouvant lier le zinc (un seul atome de zinc est lié par molécule d'ACE),^[5] suggérant que la molécule résulte d'une duplication du gène. Chacun de ces deux domaines contient de courtes séquences d'aa identiques situées autour des résidus critiques du site actif des métallo-peptidases (figure16).^[78]

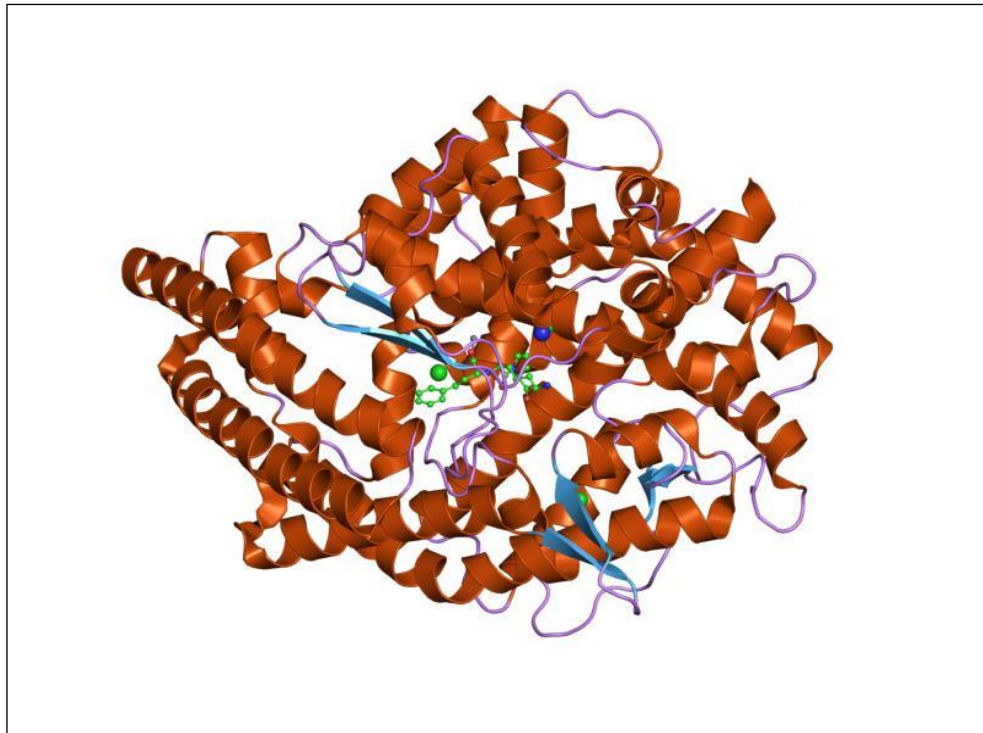


Figure 16 : Structure de l'ACE. ^[79]

4- Fonction

L'ACE est une métallo-enzyme à zinc dont l'activité enzymatique est dépendante de la présence d'anions. Elle appartient à la famille des carboxypeptidases et c'est la présence de l'atome de zinc et du chlore qui modifient la conformation allostérique du site actif, lui donnant sa spécificité pour les substrats dipeptidiques. ^[5]

Sa fonction habituelle est d'hydrolyser les deux derniers aa de l'extrémité carboxy-terminale des peptides. ^[5]

Elle convertit le décapeptide inactif (Ang I) en octapeptide actif (Ang II) qui est un puissant vasoconstricteur et le produit principale du SRA. ^[80]

L'ACE joue également un rôle important dans d'autres systèmes hormonaux tel que la cascade kinine kallikréine, elle métabolise la bradykinine qui est un puissant vasodilatateur formant des métabolites inactifs. ^[80]

Elle a un rôle également dans la dégénérescence des neurokinines mais le rôle de l'ACE ne se limite pas à ces neurotransmetteurs, il a été également démontré que cette enzyme dégrade le peptide amyloïde impliqué dans la maladie d'Alzheimer, comme elle peut empêcher ou diminuer la formation de plaques séniles. ^[80]

5- Gène

Le gène *ACE* est localisé sur le bras long du chromosome 17q23. Il mesure environ 21 Kb (kilo base), il est constitué de 26 exons et 25 introns (figure 17). Il comporte deux promoteurs donnant lieu à une sACE largement distribué dans l'organisme, en utilisant les exons de 1 à 26 sauf l'exon 13, et par épissage alternatif à une tACE, utilisant les exons de 13 à 26 qui est requise pour la fertilité masculine. [80]

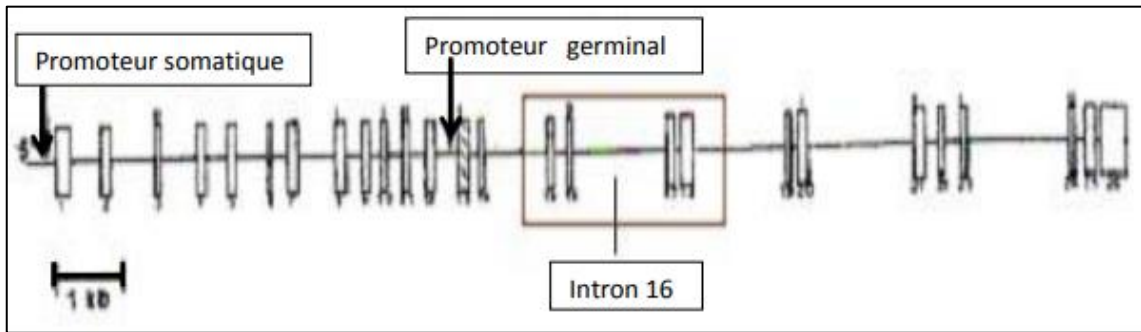


Figure 17 : Organisation du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine humaine. [81]

La longueur des exons varie de 88 pb (exon 16) à 481 pb (exon 26), la taille des introns varie de 150 pb (introns 17 et 25) à 2000 pb (intron 20). [5]

L'analyse par Southern-Blot de l'acide désoxyribonucléique (ADN) génomique indique qu'un seul gène de l'ACE existe aussi bien chez l'homme que chez la souris. [5]

L'analyse de l'ADN génomique avec la sonde de l'ADNc est cohérente avec la présence d'un seul gène *ACE* dans le génome humain, alors que le gène *ACE* est transcrit en acide ribonucléique messager (ARNm) de 4.3 Kb dans les cellules endothéliales vasculaires. [78] Puis il est traduit en un peptide de 1340 aa. [5] Une transcription de 3.0 kb a été détectée dans les testicules ou une forme courte est synthétisée. [78]

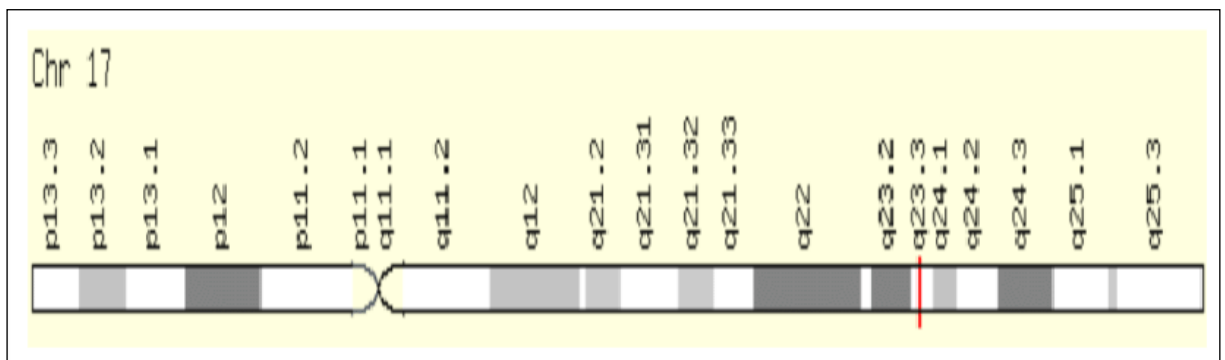


Figure 18 : Le locus du gène *ACE*. [82]

III- Association du polymorphisme I/D du gène *ACE* et l'IRT

1- Polymorphismes génétiques du gène *ACE*

Selon le National Center for Biotechnology Information (NCBI), il a été répertorié plus de 160 polymorphismes génétiques de ce gène, dont la plupart sont des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP : single nucléotide polymorphism) ; seulement 34 de ces polymorphismes sont situés dans les régions codantes, 18 d'entre eux sont des mutations faux-sens. ^[80]

Le polymorphisme du gène *ACE* a d'abord été rapporté par *Rigat* et ses collaborateurs en 1990 par analyse RFLP et hybridation de Southern blot dans une étude qui a abordé le rôle du gène *ACE* dans le contrôle génétique des niveaux plasmatiques de l'enzyme ACE. ^[4]

Le clonage de l'ADNc de l'ACE a permis d'identifier un polymorphisme I/D d'un fragment intronique de 287 pb riche en séquence *Alu* au sein de l'intron 16. L'insertion correspond à une séquence *Alu* répétitive de 287pb, cette séquence appartient à une famille d'ADN modérément répétitive possédant en général un site de restriction pour l'enzyme, elle comporte 300 000 copies de 300 pb retrouvées tout au long du génome, même dans les introns des gènes comme pour l'ACE. La fonction de ces séquences *Alu* est actuellement inconnue et un rôle éventuel dans la réplication a été suggéré. ^[5]

La présence singulière de formes délétées ou insérées pour une séquence de 190 pb reflète l'existence de deux allèles; I (Inséré) de 490 pb et D (Délété) de 190 pb, définit le polymorphisme I/D du gène *ACE*. Trois génotypes sont possibles, deux homozygotes (II et DD) et un hétérozygote (ID). ^[5]

2- Contrôle génétique du niveau d'ACE plasmatique

Le polymorphisme I/D du gène *ACE* affecte fortement le taux plasmatique de la protéine ACE ce qui explique 40% de la variabilité interindividuelle de l'activité sérique ou tissulaire de cette dernière. Les patients homozygotes pour la délétion ont le taux sérique de la protéine « ACE » le plus élevé, tandis que ceux homozygotes pour l'insertion ont le niveau le plus bas et les hétérozygotes ont des taux intermédiaires. ^[83]

3- Relation entre le polymorphisme I/D du gène *ACE* et l'IRT

L'IRC est un problème de santé publique largement répandu dans le monde. Elle représente un trouble complexe qui résulte des interactions gène-gène et gène-environnement. ^[84]

L'augmentation de l'incidence de l'obésité, des maladies cardiovasculaires, du diabète, ainsi que le vieillissement de la population entraînent l'accroissement exponentiel du nombre de patients atteints de MRC évoluant plus ou moins à long terme vers l'IRT. ^[85] Par ailleurs, la pathogenèse de cette maladie est extrêmement corrélée à la variabilité génétique. ^[84]

Un polymorphisme du gène *ACE* qui se caractérise par une variation I/D d'un fragment de 287 pb semble être lié à la variabilité interpersonnelle des niveaux d'enzyme *ACE* dans le sang où les individus homozygotes pour la délétion (génotype DD) ont des niveaux d'*ACE* sériques les plus élevés et donc le taux d'Ang II est environ 1000 fois plus élevé au niveau des reins par rapport au sang périphériques chez ces personnes, ceux qui sont hétérozygotes (génotype ID) ont des niveaux intermédiaires, tandis que les personnes homozygotes pour l'insertion (II génotype) ont les niveaux les plus bas. ^[86] Par conséquent l'allèle D est responsable d'une activité accrue de l'*ACE*. ^[84] Cette activation accrue du SRA est liée à la progression de l'IRC de différentes étiologies, en particulier la ND médiée par une lésion hypertensive et une fibrose rénale accélérée. ^[87]

Selon des études récentes, les variations d'*ACE* et des niveaux d'Ang II causés par ce polymorphisme constituent un facteur prédisposant de la progression de la MRC vers des stades beaucoup plus avancés. ^[84]

Un nombre croissant d'études a été publié pour examiner les associations entre ce polymorphisme et le risque d'IRC, cependant les résultats restent contradictoires. D'après les résultats d'une méta-analyse de 34 études cas-témoins comprenant 4446 patients atteints de MRC et 7647 témoins, une association significative entre l'allèle D et le génotype DD et le risque d'IRT a été observée dans l'ensemble des populations. Une autre méta-analyse de 13 études cas-témoins a été réalisée sur 609 patients et 1268 témoins, elle a également montré une association significative entre l'allèle D et le génotype homozygote DD et la survenue de l'IRT. Le même résultat a été confirmé par une autre étude menée au nord de l'Inde réalisé par *Gaurav Tripathi* et al en 2006. ^[88]

Par ailleurs d'autres études n'ont pas pu trouver cette corrélation positive où le polymorphisme I/D du gène *ACE* n'était pas en association avec l'IRT. [89]

4- Mécanisme d'action de l'Ang II sur la détérioration de la fonction rénale

L'Ang II est un vasoconstricteur relativement sélectif des artéριοles efférentes qui conduit à l'augmentation de la pression capillaire glomérulaire via ses actions hémodynamiques intra rénales médiées par AT1R. [70] Cette augmentation de la pression résulte de la réabsorption excessive du sodium par la pompe sodium/potassium située dans les tubules collecteurs corticaux. Toutes ces variations hémodynamiques intra rénales sont responsables de l'apparition de nombreuses lésions telle que la glomérulosclérose. [70] Outre ces effets hémodynamiques, l'Ang II favorise d'autres processus au niveau du rein comme la production d'espèces réactives d'oxygènes néphrotoxiques et stimule la prolifération cellulaire par l'augmentation de la synthèse des cytokines profibrotiques et de facteurs de croissance. Tous ces processus vont contribuer au développement de la glomérulosclérose et de la fibrose tubulo-interstitielle (FTI). [90] Hormis l'Ang II, l'aldostérone peut aussi contribuer à endommager les reins via ces actions mitogènes et profibrotiques, il augmente directement l'expression et la production de facteurs de croissance transformateur des cytokines profibrotiques, ces dernières sont responsables de la transformation des cellules épithéliales tubulaires qui sont des fibroblastes en myofibroblastes (figure18). [70]

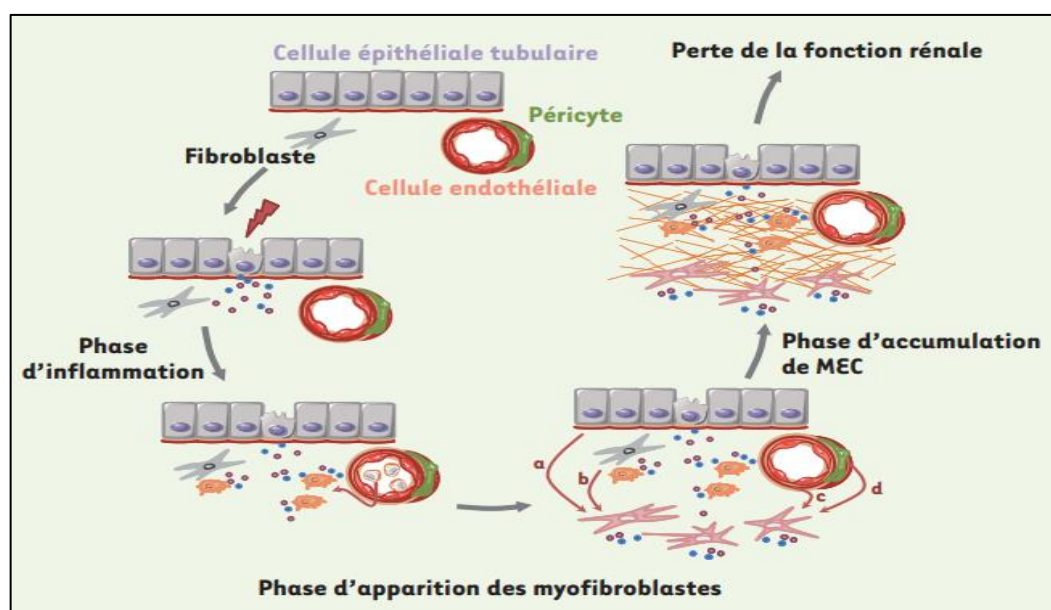


Figure 19 : Les étapes de perte de la fonction rénale. [85]

*Partie
pratique*

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Cette étude décrit une revue systématique et une analyse d'articles (méta-analyse) pour examiner les rapports de données publiées sur le polymorphisme I/D du gène *ACE* et l'IRT, afin d'établir une éventuelle association entre ce polymorphisme et cette pathologie.

1- Stratégie de la recherche

Les études pertinentes sur le sujet ont été sélectionnées après l'interrogation des différentes bases de données; Pub Med, Google-Scholar et PMC free article, le 11 juin 2020. Les termes suivants ont été utilisés en anglais et en français afin de compléter la recherche: « ESRD », « end-stage renal disease », « ESRF », « end stage renal failure », « angiotensin-converting enzyme », « ACE » et « polymorphisme I/D du gène *ACE* ». La recherche dans les différentes bases de données était limitée aux humains adultes. Nous avons également étendu le spectre de notre recherche aux articles connexes et aux bibliographies de toutes les études récupérées. Cette dernière a indiqué vingt-cinq articles accessibles mais la sélection des travaux a été limitée aux cinq articles les plus récents. Si plusieurs publications des mêmes données et du même groupe d'étude ont été retrouvées, seul le dernier article a été retenu pour l'analyse.

2- Critères d'inclusions et d'exclusions

➤ Critères d'inclusions, nous avons inclus :

- Toutes les études de type cas-témoins.
- Les patients doivent être en IRT (stade 5 de la maladie sous dialyse).

➤ Critères d'exclusions, nous avons exclus les études:

- Non cas-témoins.
- Réalisées chez des enfants.
- Qui n'ont pas fourni des données détaillées sur les différents génotypes.
- Ayant portées sur l'association d'autres gènes avec l'IRT.
- Où les patients étaient sous traitement « inhibiteur de l'ACE ».
- Dont les témoins étaient non sains.

3- Extraction et synthèse de données

Les informations suivantes ont été extraites de chaque étude de manière indépendante, le nom du premier auteur, l'année de publication, l'origine ethnique de la population étudiée, le nombre de cas et de témoins, les fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme I/D du gène *ACE* si elles étaient disponibles. Ces dernières ont été calculées pour la population irakienne mais pour les autres études ils étaient déjà disponibles au niveau des articles pour chaque groupe de cas et de témoins.

Les fréquences alléliques de la population « irakienne » de la région d'Anbar et d'Al Najaf ont été calculées à partir des fréquences génotypiques.

Les résultats ont été comparés et les désaccords ont été résolus par discussion (Tableau VI).

Matériels et méthodes

Tableau VI : Les données extraites à partir des différentes études.

Premier auteur et année de publication	Origine ethnique	Nombre des patients	Nombre des témoins	Fréquences génotypiques chez les patients N(%)			Fréquences génotypiques chez les témoins N (%)			Fréquence de l'allèle D N (%)		Fréquence de l'allèle I N(%)	
				DD	II	ID	DD	II	ID	Patients	Témoins	Patients	Témoins
A.F Abdel-Aziz 2014	Egypte	147	140	91 (61,9%)	4 (2,7 %)	52 (35,4%)	66 (47,1%)	07 (5%)	67 (47,9%)	234 (79,6%)	199 (71,1%)	60 (20,4%)	81 (28,9%)
Aisyah Ali 2015	Malaisie	190	190	18 (9,50%)	47 (24,70%)	125 (65,80%)	14 (7,37%)	86 (45,26%)	90 (47,37%)	161 (42,40%)	118 (31,05%)	219 (57,60%)	262 (68,95%)
Karrar Saleem Zayed 2017	Irak (Al-Najaf)	58	52	18 (31,03%)	21 (36,21%)	19 (32,76%)	04 (7,69%)	35 (67,31%)	13 (25,00%)	55 (47,41%)	21 (20,19%)	61 (52,59%)	83 (79,81%)
Huda Rafea Sabbar 2018	Irak(Anbar)	100	50	56 (56%)	16 (16%)	28 (28%)	17 (34%)	15 (30%)	18 (36%)	140 (70%)	52 (52%)	60 (30%)	48 (48%)
Maysaa A Hadi 2019	Irak (Babylone)	60	30	10 (16,67%)	11 (18,33%)	39 (65,0%)	9 (30,0%)	10 (33,33%)	11 (36,67%)	59 (49,17%)	29 (48,33%)	61 (50,83%)	31 (51,67%)
Total		555	462	193	99	263	110	153	199	649	419	461	505

4- Analyse statistique

Les données disponibles ont été saisies sur Excel (2016). Les résultats ainsi obtenus ont été analysés en utilisant les **Odds ratios** (OR) et les intervalles de confiance (IC) à 95%, ces OR ont été calculés par le logiciel « **Epi Info 7.0** ». Une valeur de $p < 0,05$ était nécessaire pour que l'OR global soit jugé statistiquement significatif.

Nous avons classé les enquêtes en études malaisienne, égyptienne, les études irakiennes ont été classées en fonction des régions où elles ont été menées parce que les fréquences génotypiques et la prévalence de l'IRT étaient différentes parmi les groupes ethniques.

Afin d'éviter des comparaisons excessives, les OR ont été calculés selon trois méthodes:

- Méthode 1 : comparaison des allèles (D vs I).
- Méthode 2 : comparaison du génotype homozygote DD avec les deux autres combinaisons (DD vs ID + II).
- Méthode 3 : comparaison du génotype homozygote II avec les deux autres combinaisons (II vs ID + DD).

Résultats

Résultats

1- Caractéristiques de l'étude

La recherche a donné 25 références, 15 dans Google scholar, 5 dans Pub Med et 5 dans PMC free article. Selon les critères d'inclusions et d'exclusions, 5 articles ont été identifiés pour l'analyse de l'association entre le polymorphisme I/D du gène *ACE* et la survenue d'IRT. Trois enquêtes ont été menées chez la population irakienne mais dans trois régions différentes qui étaient respectivement Al-Najaf, Anbar et Babylone et les deux autres ont été réalisées chez une population égyptienne et une population malaisienne. Ces 5 études comptaient un total de 555 patients et 462 témoins. Les données de notre intérêt ont été extraites et sont présentées dans la (figure 20). Des OR ont été calculés à partir de ses données.

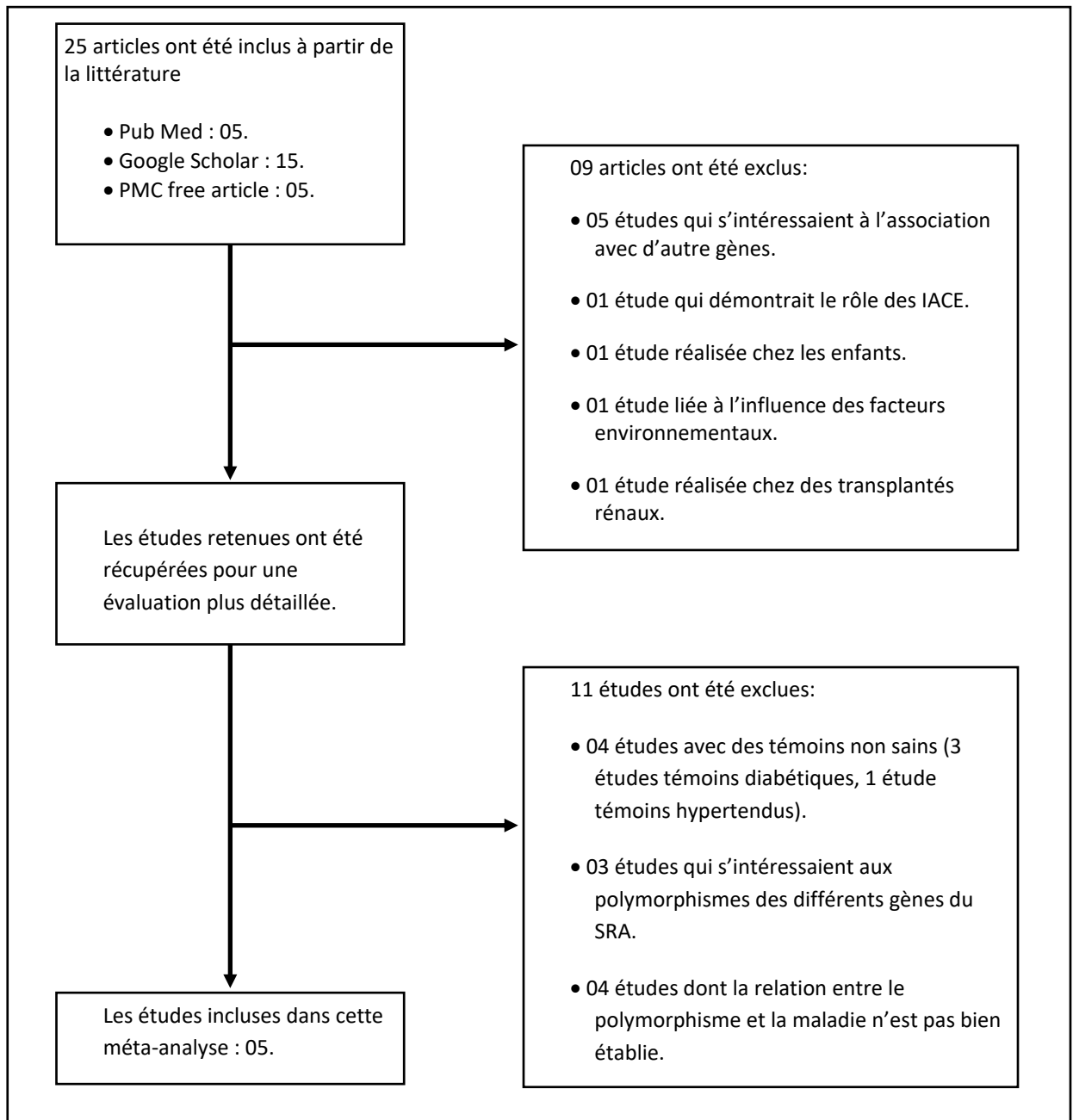


Figure 20: Organigramme de la recherche documentaire et du processus de sélection.

2- Association du polymorphisme I/D du gène *ACE* avec le risque de l'IRT

L'analyse globale de différentes populations a montré une très forte association entre l'allèle D et le risque de la détérioration de la fonction rénale et l'évolution vers le stade terminal de la pathologie « IRT », (D versus I OR=1,70 IC 95% [1,42-2,03] P<0,001) (figure 21).

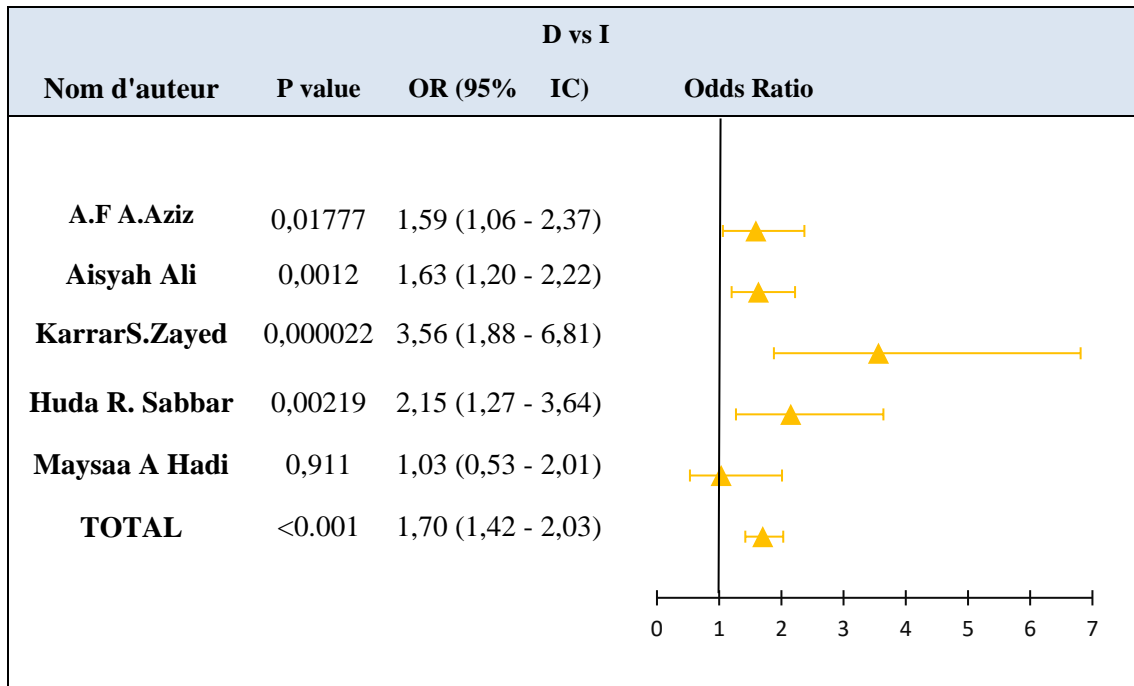


Figure 21 : Association de l’allèle D avec le risque d’IRT dans l’ensemble des populations (D vs I).

La présence du génotype DD a triplé le risque d’IRT (OR 3,16, IC 95% [2,40-4,17] P< 0,001) (figure 22) donc le génotype DD est fortement associé à l’IRT.

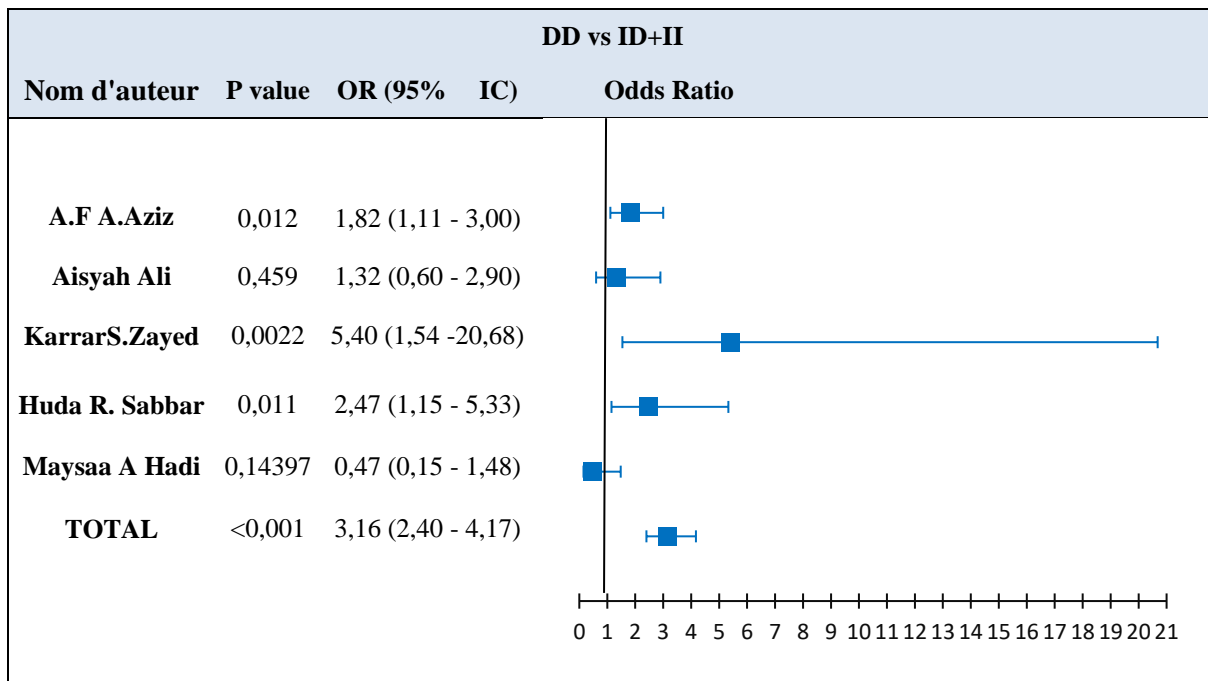


Figure 22: Association du génotype DD avec le risque d’IRT dans l’ensemble des populations (DD vs ID+II).

Cependant, le génotype II semble avoir un rôle protecteur contre le développement de l'IRT (II versus DD+ID OR= 0.43 IC 95% [0.32, 0.59] P < 0.001) (figure 23).

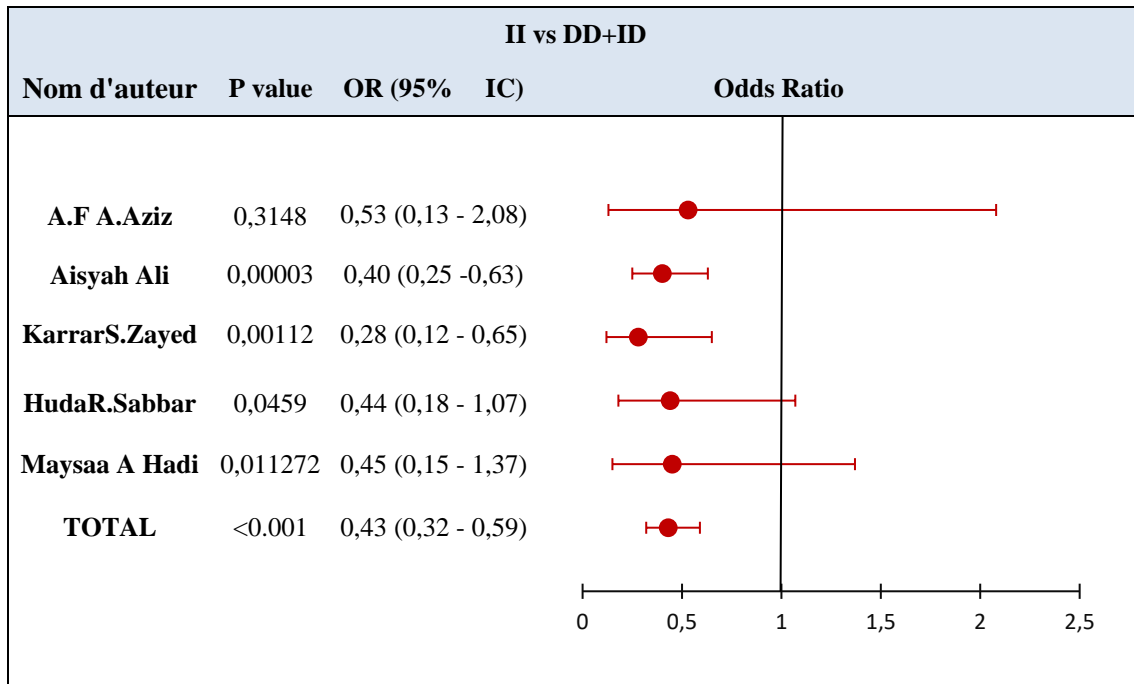


Figure 23: Association du génotype II avec le risque d'IRT dans l'ensemble des populations (II vs DD+ID).

Les différences ethniques et géographiques peuvent affecter les résultats de notre analyse pour l'association du polymorphisme I/D du gène *ACE* avec la susceptibilité à l'IRT. A cet effet, nous avons divisé la population par origine ethnique. L'Allèle D/ génotype DD étaient associé au risque d'IRT dans la population égyptienne et les populations irakienne d'Al Najaf et Anbar (figure 21,22). De plus, une association entre l'allèle D et la survenue de l'IRT a été observée chez la population malaisienne (figure 21). Cependant, l'association de l'allèle D/génotype DD avec le risque de l'IRT chez la population irakienne de Babylone n'a pas été retrouvée (figure 21,22). De même que le génotype DD dans la population malaisienne (figure 22).

Le génotype II pourrait être un facteur protecteur contre le risque de l'IRT chez toutes les populations étudiées à l'exception de la population égyptienne (figure 23).

Discussion

Discussion

Au cours de ces dernières décennies plusieurs études ont suspecté une relation entre le polymorphisme I/D du gène *ACE*, l'IRC et les MCV. L'association entre SRA et l'IRC reste controversée contrairement à la relation entre SRA et l'hypertension qui est bien documentée. ^[85] Cette méta-analyse a été réalisée pour rechercher une éventuelle association entre le polymorphisme I/D du gène *ACE* et l'IRT. A cet effet, cinq études approuvées ont été retenues et analysées dont trois sur des populations irakiennes de différentes régions (Al-Najaf, Anbar, Babylone), une étude sur la population égyptienne et une autre sur la population malaisienne. Notre méta-analyse a dévoilé que l'allèle D et le génotype homozygote DD étaient associés à la survenue de l'IRT dans le résultat global de différentes populations mais pas le génotype II.

Selon plusieurs travaux, l'origine géographique et ethnique pourrait affecter l'association de ce polymorphisme avec le risque d'apparition de la maladie rénale. En effet, il a été constaté chez la population égyptienne et les populations irakiennes (Al Najaf et Anbar) de notre étude que l'allèle D/génotype homozygote DD étaient associés au risque d'IRT. ^[84]

En effet, l'allèle D et le génotype homozygote DD sont responsable d'une augmentation des taux sériques d'ACE par augmentation de l'expression de son gène qui se traduira par une élévation des niveaux sérique d'Ang II. Ce dernier va agir via ses deux effets hémodynamiques et non-hémodynamiques sur la perte de la fonction rénale. ^[70]

L'hyperactivation du SRA résultant de l'augmentation d'Ang II est également corrélée au vieillissement rénal. ^[84]

Par plusieurs mécanismes, il contribue à l'activation de l'inhibiteur du plasminogène (PAI-1) endothélial, comme il stimule la production de TGF- β (transforming growth factor beta). Ces deux effets jouent un rôle vraisemblable dans la formation de la fibrose rénale. ^[91]

Deux autres actions reliées au SRA seraient impliquées dans le vieillissement rénal: la production de dérivés radicalaires de l'oxygène mitochondriaux. ^[91] La production de ces dérivés pourrait être à l'origine d'une mutation dans l'ADN mitochondrial contribuant elle-même au processus du vieillissement ^[92] et une action

contre régulatrice sur la protéine Klotho, qui est connue pour prévenir le vieillissement prématuré. ^[91]

La participation des facteurs moléculaires, cellulaires, l'agrégation des biomolécules « protéines, lipides » oxydées au cours du vieillissement et la croissance de la fibrose rénale sont étroitement associées à la progression des lésions rénales. ^[84]

En ce qui concerne la population malaisienne, seul l'allèle D était en forte corrélation avec l'IRT mais pas le génotype homozygote DD. Selon les constats de cette étude, le polymorphisme I/D du gène *ACE* pourrait agir d'une manière indirecte sur le développement de l'IRT par différents mécanismes ; le premier est lié aux variations génétiques observées dans les gènes du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) qui influenceraient l'activité de ce dernier et pourraient prédisposer au développement de l'HTA et de l'insuffisance rénale étant donné que le SRAA est responsable de la régulation de la tension artérielle, des électrolytes et de l'homéostasie hydrosodée. ^[3]

Le second mécanisme pourrait être lié à la forte association entre l'allèle D et le risque accru de diabète et de ces complications mais pas le génotype DD. ^[3]

L'apparition du diabète est favorisée par l'hyperactivation du SRA qui a comme conséquence : une hyperproduction d'insuline étant donné que l'Ang II est un régulateur important de sa sécrétion, les cellules deviennent insensibles à ce dernier ce qui donne lieu à une hyperinsulinémie et donc l'hyperglycémie « instauration du diabète type 2 ». Une production accrue d'espèces oxygène-réactifs qui conduit à un stress oxydant dans les cellules bêta du pancréas et participe donc par cette voie aux dysfonctions bêta-cellulaire. Ce dysfonctionnement cellulaire est également favorisé par l'hyperactivation du SRA. ^[93]

Cependant, l'association de l'allèle D/génotype DD avec le risque de l'IRT chez la population irakienne de Babylone n'a pas été observée. Dans cette population, il a été constaté que le polymorphisme I/D du gène *ACE* agit d'une manière indirecte par l'hyperactivation du SRA provoquant une élévation de la pression artérielle glomérulaire et systémique qui entraîne à son tour une fibrose et une défaillance progressive de la fonction rénale. D'autre part ce polymorphisme pourrait être responsable à la survenue d'autres pathologies comme le diabète et les MCV. Ce désaccord serait dû à la taille réduite de l'échantillon utilisé et l'origine ethnique de la population. ^[94]

Le génotype II pourrait être un facteur de protection contre le risque de l'IRT dans l'ensemble de la population étudié mais les différences ethniques et géographiques pourraient affecter ces résultats surtout chez la population égyptienne où le génotype II n'a pas un effet protecteur contre la survenue de cette pathologie.

En conclusion, les résultats de notre méta analyse confirment que l'allèle D ou le génotype DD était associé à la survenue de l'IRT dans l'ensemble des populations étudiées, mais dans la population irakienne « Babylone » l'allèle D et le génotype homozygote DD n'ont montré aucune association avec l'IRT. Le génotype II semble avoir un rôle protecteur envers l'IRT chez toutes les populations à l'exception de la population égyptienne. Cependant, d'autres études cas-témoins sur plusieurs populations d'origine ethnique différente serait souhaitable afin de clarifier l'existence ou non d'une association entre le polymorphisme I/D du gène *ACE* et le risque d'IRT, étant donné que ce polymorphisme pourrait être un marqueur pronostic d'évolution de la maladie rénale vers l'IRT.

Conclusion
et
perspectives

Conclusion et perspectives

L'IRC est un problème de santé publique largement répandu dans le monde. Elle représente un trouble complexe qui résulte des interactions gène-gène et gène-environnement. Sa progression rapide, silencieuse et indépendante de la maladie causale peut aboutir à l'IRT.

L'association entre l'hyperactivation du SRA et le développement de l'IRC et sa progression vers l'IRT est connue depuis longtemps. Malgré le grand nombre d'études génétiques à la recherche de gènes candidats, le polymorphisme I/D du gène *ACE* reste le locus le mieux caractérisé, clairement associé au développement de l'IRC et sa progression vers l'IRT dans plusieurs études mais pas dans d'autres où aucune association positive n'a été prouvée.

L'analyse globale des populations étudiées a montré que :

- L'allèle D était en très forte association avec l'IRT (D versus I OR=1,70 IC 95% [1,42 - 2,03] P < 0,001), le génotype homozygote DD a triplé le risque d'IRT (OR 3,16, IC 95% [2,40 - 4,17] P < 0,001) par rapport aux autres génotypes II et ID.
- Le génotype II aurait un rôle protecteur contre le développement de l'IRT (II versus DD+ID OR= 0,43 IC 95% [0,32- 0,59] P < 0.001) chez toutes les populations à l'exception de la population égyptienne.

Selon les différentes populations étudiées, l'allèle D/génotype DD étaient associés au risque d'IRT dans la population égyptienne et les populations irakienne d'Al Najaf et d'Anbar. Cependant l'association de l'allèle D/génotype DD avec le risque de l'IRT chez la population irakienne de Babylone n'a pas été observée. De même que le génotype DD dans la population malaisienne.

La poursuite du présent travail sur plusieurs populations d'origine ethnique différente en vue d'améliorer la puissance des résultats s'avère nécessaire car la démonstration du rôle des facteurs génétiques et environnementaux dans le développement de l'IRC et sa progression vers l'IRT peut ouvrir de nouvelles perspectives dans le diagnostic prédictif et la mise en place d'un traitement précoce pour limiter la progression de cette pathologie et améliorer le pronostic vital des patients à risque.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1]. **Esther.B.** La diététique de l'insuffisance rénale chronique : thèse de doctorat. Université de Nante science pharmaceutique et biologique France .2015.
- [2]. **Global Burden of Disease Chronic Kidney Disease Collaboration.** Global, regional, and national burden of chronic Kidney Disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study .2017, 2020.395 :709-33.
- [3]. **Aishah.A, Ramachandran.V, Patimah.I, Christoer Lim Thiam.S, SriKumar.C.** Analysis of insertion / deletion polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in Malaysian end-stage renal disease patients. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2015 ,16(4) ,1337–1343.
- [4]. **Brigitte.R, Christine.H, Francois.A, Franmois.C, Pierre.C, Florent.S.** Insertion / deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme accounting for half the variance of serum enzyme levels. The American Society for Clinical investigation.1990,86,1343-1346.
- [5]. **Abdelilah.L.** Etude des facteurs métaboliques et polymorphismes génétiques prédisposant à la survenue de l'athérosclérose coronaire. Thèse de doctorat. Biologie spécialité : Biochimie. Université Mohamed V-ADGAL. Maroc. 2006 ,46.
- [6]. **Tian-Biao.Z, Sheng-Sheng.Y, Yuan-Han.Q.** Association between angiotensin converting enzyme insertion / deletion gene polymorphism and end-stage renal disease susceptibility .Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System.2014, 15(1), 22–31.
- [7]. **Anne-Marie.C.** L'infirmière en néphrologie. 3^{ème} édition. Elsevier Masson.2009 ,5p.
- [8]. **christoph. P.** Le corps humain anatomie et physiologie. Edition Moelle.2013,264p.
- [9]. **Anthony.A .** Le rein série l'apprentissage. Abbott. 2017,10p.
- [10]. **Pierre.k, Jean-pierre.R.** Atlas d'anatomie humaine. 6^{ème} édition.2015,312p.
- [11]. **Elaine N.M,** Anatomie et physiologie humaines .6^{ème} Edition.2005,1026p.
- [12]. **Encyclopédie Larousse.** Tubule rénal ou tube urinifère. Disponible sur : www.larousse.fr/encyclopedie/medical/tubule_renal/16745. Consulté (le 08/8/2020).

- [13]. **Elaine.M, Katga.H, Linda.M.** Anatomie et physiologie humaines .5^{ème} éditions .2017, 1136p.
- [14]. **Alain.R, Sylvie.T.** Anatomie et physiologie humaine pour les AS et AP. 3^{ème} édition. Elsevier Masson. 2015 ,274p.
- [15]. **Victor.G, Gilbert.D, Corinne. I.** Physiologie rénale. Elsevier Masson. 2012, 237-249.
- [16]. **Philippe.D.** Equilibre hydro électrolytique physiologie et physiopathologie pratique clinique. Édition Lavoisier.2011,4-7p.
- [17]. **Bernard.L.** Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales.Elsevier Masson. 2013 ,451.
- [18]. **Bruno.M, Marie-Noëlle.P.** Néphrologie.8^{ème} édition .2018,8p.
- [19]. **André.G.** Physiologie des reins et des liquides corporels. Éditions Multimodes. 2005, 297p.
- [20]. Fonction endocrine du rein. Disponible sur : www.embryology.ch.Consulté le (11/08/2020).
- [21]. **Bertrand.D,** Différents stades de l'insuffisance rénale chronique. Elsevier Masson. 2011, 26,55-59.
- [22]. **Nicolas.R, Maurice.L.** La prise en charge thérapeutique de l'insuffisance rénale chronique terminale. Médecine thérapeutique .2011,17 ,103-112.
- [23]. **Frimat.L, Loos-Ayav.C, Briançon.S, Kessler.M.** Épidémiologie des maladies rénales chroniques. Elsevier Masson. 2005, 18-025-A-10.
- [24]. **Bernard.L, Ziad.M.** Diagnostic, suivi biologique de l'insuffisance rénale chronique et prise en charge de l'insuffisance rénale chronique terminale. Elsevier Masson.2013, 451.
- [25]. **Médina.A.** Sémiologie des marqueurs cardiaques dans la morbi-mortalité cardiovasculaire des urémiques chroniques traités par hémodialyse. Thèse de doctorat discipline de biochimie. Université Alger 1. 2018, 20.
- [26]. **Bénédicte.S.** L'insuffisance rénale chronique : une épidémie, Presse Med. 2011, 40, 1020.

- [27]. **Angela.C, Evi. V, Rachael. L, Philip.M.** Chronic kidney disease. 2017, 389:1238–52.
- [28]. **Bouhdou.S, Choudar. S.** Hypertension artérielle au cours de la maladie rénale chronique. Mémoire de docteur en Médecine Générale. Université Abderrahmane Mira. Algérie. 2018, 16.
- [29]. Société algérienne de néphrologie, dialyse et transplantation. Registre national des dialysés disponible sur : <http://www.aps.dz/sante-science-technologie/98260-registre-national-des-dialyses-plus-de-23-500-cas-recenses-a-fin-2018>. Consulté le (24/07/2020).
- [30]. **Emmanuelle.P, Martin.F.** Mesure et estimation du débit de filtration glomérulaire. Elsevier Masson. 2017, 1769-7255.
- [31]. **La Société de Néphrologie.** Évaluation de la fonction rénale et de la protéinurie pour le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte. Elsevier Masson.2009,5302-305.
- [32]. **Nancy.A, Pharm.B.** Estimation de la fonction rénale : quelle formule doit-on utiliser ? Québec Pharmacie Novembre .2014.
- [33]. **HAS.**évaluation du rapport albuminurie / créatininurie dans le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte .2011,13.
- [34]. Les symptômes de l'insuffisance rénale chronique. Disponible sur : eureka.sante.vidal.fr/maladies/reins-voies-urinaires/insuffisance-renale-chronique.html?pb=symptomes-complications-diagnostic. Consulté le (08//04/2020).
- [35]. **Thierry.K, Dorothée.B, Thierry.H.** Physiopathologie de la progression des maladies rénales.Elsevier Masson. 2007, 36: 1835–41.
- [36]. **Jungers., Joly.D, Man N.K, Legendre.C.** Insuffisance rénale chronique prévention et traitement 4^{ème} édition Lavoisier.2011, 33p.
- [37]. **Izzedine.H.** Manuel de généraliste néphrologie-urologie. Édition de tsunami.123.5-0475.
- [38]. **Amal.B.** Guide africain de néphrologie pédiatrique .1^{ère} édition.2014, 337p.
- [39]. Néphropathie vasculaire. disponible sur : www.larevuedupraticien.fr/article/nephropathies-vasculaires. Consulté le (17/03/2020).

- [40]. **Alain.K, Olivier.K, Marie.N, Peraldi.C.** Les trouble hydro-électrolytique .3^{ème} édition Elsevier Masson. 2014, 121p.
- [41]. Néphropathie vasculaire. Disponible sur : www.chu-lyon.fr/fr/nephropathies-vasculaires. Consulté le (17/03/2020).
- [42]. **Luis.M.** Diabétologie 55 démarche cliniques. Elsevier Masson.2017, 371p.
- [43]. **Gariani.K, seigneux.S , Pechère.B , Philippe.J , Mrtin.P-Y.** Néphropathie diabétique. Revue Médicale Suisse. 2012, 8 : 473-9.
- [44]. Néphropathie. Disponible sur : www.pourquoidocteur.fr/MaladiesPkoidoc/1121-Diabete-et-rein-la-nephropathie-diabetique-signe-le-tournant-du-diabe. Consulté le (17/03/2020).
- [45]. **Bourquin.V, ponte.B , zellweger.M , Levy.M , Moll.S.** Les glomérulonéphrites primitives en bref. Revue Médicale Suisse. 2013, 9 : 764-9.
- [46]. Les maladies rénales. Disponible sur : www.francerein.org/article/les-differentes-maladies-renales. Consulté le (19/03/2020).
- [47]. **Ji-Cheng.L, Lu-Xia.Z.** Prevalence and Disease Burden of Chronic Kidney Disease. Springer. 2019, 1165.
- [48]. **Fumeaux.Z.** Hyperkaliémie. Rev Med Suisse .2007,3,32093.
- [49]. **Kara.H.** Hypertrophie ventriculaire gauche au cours de l'insuffisance rénale chronique : prévalence et facteurs de risque. Thèse de doctorat en science médicales néphrologie. Université Abou Bakr Belkaid, Algérie.2013.
- [50]. **Pietro.G, Pierre Yves. M ,Fabien.** Prise en charge de l'anémie rénale. Revue Médicale Suiss. 2013, 9 : 462-7.
- [51]. **Oulyana.B.** Le rôle du pharmacien d'officine dans la prise en charge de l'insuffisance rénale chronique : ses nouvelles missions. Thèse du doctorat en pharmacie. Université de lorraine, France .2015.21.
- [52]. **Charrier.S, Rognant.N, Chiche.F, Cremerd.A, Deraye.G, Priou.M.** Insuffisance rénale chronique et maladie cardiovasculaire. Elsevier Masson. 2009, 58 40-52.
- [53]. **Abdelkrim.F, Asma.Y.** Trouble phosphocalcique au cours de l'insuffisance rénale. Mémoire du doctorat en médecine. Université Abderrahmane Mira Bejaia.2018, 37.

- [54]. Réseau National de la Métrologie Française. Diagnostic de l'insuffisance rénale. 2015.
- [55]. **Benkaddour.N.** L'insuffisance rénale chronique préterminale chez l'adulte en milieu hospitalier. Thèse de doctorat Faculté de médecine et pharmacie. Université sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 2011, 21.
- [56]. Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé Septembre. 2002.
- [57]. **Hannedouche.T, Krummel.T, Parvès-Braun.L.** Néphro-protection comment ralentir l'évolution de l'insuffisance rénale chronique. Elsevier Masson.2004, 10.004.
- [58]. **Canaud.B.** Principes et modalités d'application de l'hémodialyse au traitement de l'insuffisance rénale chronique Elsevier Masson. 2009, 18-063-B-10.
- [59]. **Encyclopédie Larousse.**Hémodialyse. Disponible sur : [/www.larousse.fr/encyclopedie/medical/hemodialyse/13504](http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/hemodialyse/13504). Consulté le (21/03/2020).
- [60]. **Monique.C .** Néphrologie hémodialys. Disponible sur : <http://tzanck.info/nephrologie/>. Consulté le (28/03/2020).
- [61]. **Haddiya.Z, Slingeneyer.A, Rhou.H, Ouzeddoun.N, Bayahia.R, Benamar.L.** La dialyse péritonéale: principes, indications et limites, Maroc Médical. 2009, 31 ,4.
- [62]. **EL Bardai.G.** Mise en place d'une dialyse péritonéale : Implantation et mise en œuvre. Mémoire d'un spécialiste en néphrologie. Faculté médecine et pharmacie. Université Mohamed Ben Abdellah, 2015, 18.
- [63]. Comprendre la dialyse péritonéale. Disponible sur : <https://www.nephrocare.fr> consulté le (23/03/2020).
- [64]. Dialyse péritonéale. Disponible sur : <https://hopital-prive-saint-martin-caen.ramsaygds.fr/vous-etes-patient-pourquoi-choisir-notre-etablissement-services-de-soins/dialyse-peritoneale>. Consulté le (23/03/2020).
- [65]. **Béfa.K, Kossi.A , Ghislain.L , Mays.H et al.** Transplantation rénale au Maroc: L'hémodialysé et son entourage sont-ils suffisamment informés? Pan Africain Médical Journal.2014,19 :365.

- [66]. **Gaillet.C.** Prise en charge du patient insuffisant rénal chronique : Organisation d'un parcours de soins à la sortie d'hospitalisation. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de Bijon. Université de Bourgogne France. 2017,34.
- [67]. Transplantation rénale - Qu'est-ce que c'est ? disponible sur : <https://sante.lefigaro.fr/sante/traitement>. Consulté le (23/03/2020).
- [68]. **Jean Baptiste.M.** Système rénine-angiotensine et remodelage vasculaire M/S : médecine sciences. 2004, 20 :409-13.
- [69]. **Abdell.k.** Régulation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et caractérisation du récepteur B des kinines au niveau des cellules vasculaires. Thèse de doctorat en Médecin présentée à la Faculté de Université Laval .2010.
- [70]. **Steven.A.** The Renin Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. Journal of Managed Care Pharmacy.2007, 13, No. 8, S-b.
- [71]. **Chaullet.F.** Traitement de l'insuffisance cardiaque : Place de la thérapie cellulaire. Thèse de doctorat. Université de Poitiers faculté de médecine et pharmacie France.2019,26.
- [72]. **François.D.** Implication du système rénine angiotensine aldostérone dans les altérations de la circulation cérébrale au cours de l'hypertension artérielle chronique. Thèse de doctorat: Biologie Santé Environnement, Université Henri Poincaré Nancy1, France.2005, 20.
- [73]. **Bruno.H, Marie-Noëlle.P.** Les troubles hydro-électrolytiques faciles. Elsevier Masson,.2019,11p.
- [74]. Médicament du système rénine angiotensine. Disponible sur : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/medicaments-du-systeme-renine-angiotensine>. Consulté le (28/06/2020).
- [75]. **El-Dorry.H.A, Pickett.C.B, MacGregor, Soffer.J.S.** Tissue-specific expression of mRNAs for Dipeptidyl Carboxypeptidase Iso-enzymes. Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A.1982 79: 4295–4297.
- [76]. **Sung-Kyu. H.** Insertion / Deletion Polymorphism and Diabetic Nephropathy: Clinical Implications of Genetic Information .Journal of Diabetes Research.2014.

- [77]. **Guillaume.R.** L'enzyme de conversion de l'angiotensine une protéine au cours de l'évolution. *Journal de la Société de Biologie.* 2009,203(4) ,281-293.
- [78]. **Florent.S, François.A, Christine.H, Jacqueline.A, Marie.J, Geoferey.T, Pierre.C.** Two putative active centers in human angiotensin I - converting enzyme revealed by molecular cloning, 1988, 85, 9386-9390.
- [79]. Angiotensin-converting enzyme. Disponible sur: https://en.wikipedia.org/wiki/Angiotensin-converting_enzyme. Consulté le (24/08/2020).
- [80]. **Sayed.T, Oostra.A, Isaacs.C et al .** *ACE* polymorphisms.2006, 98:1123-1133.
- [81]. **Cambien.F, Soubrier.F .**The angiotensin-converting enzyme: molecular biology and implication of the gene polymorphism in cardiovascular diseases. *Hypertension: Pathophysiology, Dignosis, and Management, Second Edition .*1995.
- [82]. **Methaq.H , Lamees.M , et al.** Angiotensine converting enzyme (ACE) gene polymorphism and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes.journal of Dental and Medical Sciences.2015,pp 62-67.
- [83]. **Zoltán.K, Csaba.A, Imre.K, János.S, István. K.** Effect of angiotensin-converting enzyme gene insertion / deletion polymorphism and angiotensin-converting enzyme inhibition on erythropoiesis in patients on hemodialysis. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System.*2015 ,16(4),1021-1027.
- [84]. **Karrar.S.** Determination of I/D genetic variation of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene in Iraqi patients with Renal Failure *Journal for Biology.*2017,9 ,3.
- [85]. **Julie.k, Mathieu .M, Bénédicte.B.P, Schanstra, Jean-Loup.B.** La fibrose tubulo interstitielle rénale Menace fantôme ou dernière croisade? *Médecine et sciences.*2011, 27 :55-61.
- [86]. **István.K, Zoltán.K, Lóránt.K, András.P, Csaba.A.** Smoking has no impact on survival and it is not associated with *ACE* gene I/D polymorphism in hemodialysis patients. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System.*2017, 1-6.
- [87]. **Laura.J, Marisa.C, Ruaidhri.C , Alexander.M, Amy.M .** Genetic associations between genes in the renin-angiotensin-aldosterone system and renal disease: A systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal.* 2019.

- [88]. **Gaurav.T, Poonam.D, Harmani.D, Vinod.P, Suraksha.A** . High prevalence of ACE DD genotype among north India nondiabetic general disease patients. *BioMed Central*. 2006, 7:15
- [89]. **Monika.B, Piotr.K, Andrzej. D, Danuta.S, Andrzej.K**. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006, 21: 979–983.
- [90]. **Ursula.C, Brewster.M, Perazella.A**. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Kidney: Effects on Kidney Disease. *The American journal of medicine*. 2004, 116:263–272.
- [91]. **Maurice.L, Nicolas.R**. Le vieillissement rénal : Une fragilité prévisible et en partie évitable. *BULLETIN DE L'ACADEMIE NATIONALE DE MEDECINE*.2014, 198,4-5,673-688.
- [92]. **Dominique.B**. Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biologie*. 2007,157.
- [93]. **Roméo.C**. Glucolipotoxicité dans les cellules bêta pancréatiques. Thèse de doctorat. Discipline : Métabolisme, nutrition, diabète. Université Claude Bernard. 1. France. 2014, 54.
- [94]. **Maysaa.A, Ali. H, Saadi.Al, Wisam.A, Rady.A**. The association of angiotensin-converting enzyme (*ACE*) Gene polymorphism and Some Biomarkers in Hemodialysis Patients.*International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*.2019, 10(3):121-130.

Annexes

Annexe 1

- Génotypage de l'ACE

Après extraction de l'ADN par la méthode au NaCl selon *Miller* sur du sang frais prélevé sur tube EDTA stérile.

La recherche du polymorphisme I/D du gène *ACE* se réalise par PCR (Polymérase Chain Réaction) (protocole du laboratoire de biologie et génétique moléculaire de la faculté de médecine, université Salah Boubnider Constantine 3).

Un milieu réactionnel de PCR ou mix d'un volume final de 25 μ l est préparé. Ce mix comprend des desoxyribonucleotides triphosphates (dNTP à 2mM), une enzyme d'amplification in vitro (Taq polymérase à 5U/ μ l), un environnement réactionnel (tampon 10X, MgCl₂ 50 mM, H₂O) et deux amorces oligonucléotidiques à 20 pmol / μ l chacune dont les séquences sont les suivantes :

- ECA 1F (Forward): 5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3'
- ECA 1R (Reverse): 5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3'

Les conditions d'amplification sont comme suivies : Une dénaturation initiale à 94°C pendant 1 minute, suivie de 30 cycles de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 68°C pendant 1 minute, une élongation à 72°C pendant 1 minute et enfin une élongation finale à 72°C pendant 8 minutes.

Le contrôle des fragments amplifiés se fait par électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose à 2 %.

La détermination des différents génotypes par la visualisation sous UV de différentes bandes d'amplification. La présence d'une bande de 490pb correspond au génotype homozygote inséré I/I ; la bande de 190pb correspond au génotype homozygote délété D/D et le génotype hétérozygote I/D est représenté par deux bandes de 190 pb et 490 pb (figure).

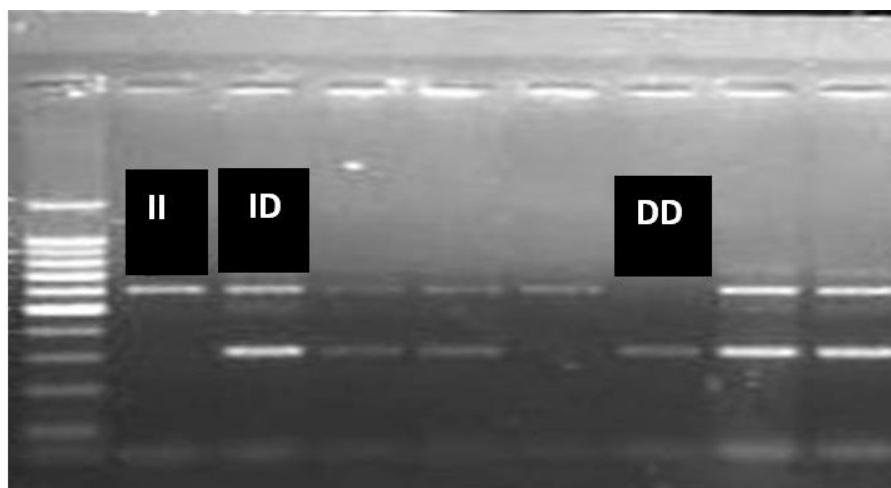


Figure : profil électrophorétique des différents génotypes du polymorphisme I/D du gène *ACE*.



Association of Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Insertion/Deletion Gene Polymorphism with End Stage Renal Disease in Egyptian Patients

A. F. AbdeL-Aziz¹, Afaf EL-Saeed², Khaled EL-Dahshan³
and Basma AL-Sayed Ebead^{1*}

¹Division of Biochemistry, Chemistry Department, Faculty of Science, Mansoura University, Mansoura, Egypt.

²Genetics Unit, Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt.

³Nephrology and Urology Hospital, Faculty of Medicine, Mansoura University, Egypt.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Original Research Article

Received 8th April 2013
Accepted 5th December 2013
Published 2nd January 2014

ABSTRACT

Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism has been associated with the genetic susceptibility to end stage renal disease (ESRD) in different populations. ACE DD genotype and D allele are associated with ESRD as risk factors in several studies. In this study, we investigated the association between ACE I/D gene polymorphism and ESRD in the Egyptian patients. Frequencies of D allele and DD genotype were significantly increased, while frequencies of I allele and ID genotype were significantly decreased in the ESRD patients when compared with the control subjects ($P = .012$, OR = 1.82, 95% CI = 1.139-2.915 for DD) and ($P = .018$, OR = 1.6, 95% CI = 1.082-2.33 for D). In conclusion, ACE DD genotype and D allele are associated with ESRD as risk factors for ESRD in the Egyptian population.

Keywords: Angiotensin-I-converting enzyme (I/D) polymorphism; end stage renal disease.

1. INTRODUCTION

End stage renal disease (ESRD) represents a clinical condition in which there has been an irreversible loss of endogenous renal function. ESRD is an increasing problem worldwide and is a major health problem associated with very high morbidity and mortality [1]. ESRD is an advanced form of chronic renal failure where renal function has declined to approximately 10% of normal prior to initiation of dialysis or transplantation [2]. The main causes of ESRD in Egypt, other than diabetic nephropathy, included hypertensive kidney disease, chronic glomerulonephritis, unknown etiology, chronic pyelonephritis, schistosomal obstructive uropathy and schistosomal nephropathy [3]. Abnormal calcium (Ca), phosphorus (P) and vitamin D metabolism are very common in patients with ESRD [4].

The impact of genetic variability on the development of renal failure is becoming clearer and emphasizes the need to elucidate the genetic basis for renal diseases and its complications. The Renin-angiotensin system (RAS) is a key regulator of both blood pressure and kidney functions and may play a role in their interaction [2]. Renin is a proteolytic enzyme that is produced in the juxtaglomerular cells of kidney. When renin is released to the circulation it metabolizes its only substrate, angiotensinogen (AGT), which is primarily synthesized in and released from the liver to the blood stream. The action of renin on AGT results in the production of a decapeptide, angiotensin I (Ang I) [5]. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) gene is one of the most intensely studied genes because of the key role it plays in the renin-angiotensin system (RAS) [6]. Mostly in pulmonary circulation, Ang I is converted into the octapeptide Ang II by the angiotensin converting enzyme type 1 (ACE1 or ACE) which is nearly ubiquitously bound to vascular endothelial cells. ACE also inactivates the potent vasodilators bradykinin and kallidin [5]. The gene encoding ACE is located on the long arm of chromosome 17 (17q23) in humans and contains 26 exons and 25 introns. A common insertion/deletion (I/D) polymorphism in the non-coding region of the ACE gene was identified in 1990. The I allele results from the presence of a 287bp DNA fragment in intron 16 and the D allele results from the absence of this DNA sequence [7]. The ACE gene consists of either an insertion (I) allele or a deletion (D) allele that form three possible genotypes: II, ID or DD [1]. Numerous studies have been done to evaluate the relationship between development and progression of ESRD, and ACE I/D gene polymorphism [1,8,9]. This work aims to study the effect of ACE I/D gene polymorphism in ESRD in the Egyptian population.

2. SUBJECTS AND METHODS

2.1 Subjects

The present study was carried out on the ESRD patients (n = 147; 86 men and 61 women), with a mean age of 44 ± 14.8 years. All the patients were undergoing dialysis treatment following diagnosis of ESRD by nephrologists. The control subjects (n = 140; 84 men and 56 women), with a mean age of 39.7 ± 14.1 years. The control subjects were collected from donor blood bank; the serum creatinine, uric acid, BUN, routine urine test and other biochemical parameters were tested. The control subjects had normal kidney functions and they were free from any Kidney diseases, also they were free from any other diseases. This study was approved by Ethical Board of the Mansoura University. Informed written consent was obtained from all participants, (patients and control subjects), in this study.

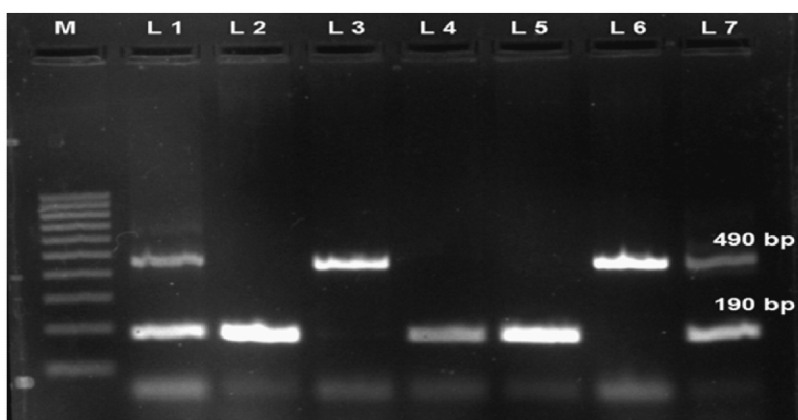
Four milliliters (4ml) of peripheral blood samples were collected and divided into (1ml) in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant for DNA extraction and then the PCR technique on these DNA samples was applied and (3ml) in tubes without EDTA allowed to clot for 10-15 minutes, centrifuged and the separated serum is used to analyze the biochemical parameters in the ESRD patients as well as in the control subjects.

2.2 Determination of Genotypes

Genomic DNA was isolated and purified from whole blood using a DNA purification kit (Fermentas spin columns, Canada). The ACE genotypes (DD, ID and II) were determined by polymerase chain reaction (PCR) method [10]. The sense primer: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' and anti-sense primer: 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'. The PCR was carried out in 10 µl of 10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l KCl, 2 mmol/l MgCl₂, 200 µmol/l of each of the four deoxynucleotides, 1 µmol/l each of the primers, and 0.4 units *Taq* polymerase. After an initial denaturation at 94°C for 3 min, the DNA was amplified by 30 PCR cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 45 s, and extension at 68°C for 45 s, followed by a final extension at 68°C for 7 min. The amplified PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose gel and the DNA was visualized under ultra violet (UV) transilluminator after staining with ethidium bromide. The insertion (I) allele was detected as band of 490 bp fragment and deletion (D) allele was identified as a band of 190 bp fragment. Therefore, there were three genotypes after electrophoresis: A 490 bp band (genotype II), 190 bp band (genotype DD), or both 490 and 190 bp band (genotype ID). All of the samples were genotyped twice independently in the Genetic Unit of Faculty of Medicine in Mansoura University. Genotyping was conducted twice, and the concordance rate of the two independent genotyping assays was 99%, see (Fig. 1).

2.3 Statistical Analysis

Data were obtained using SPSS version 19. Data were expressed as means ± standard deviation (SD). Results of ESRD patients and control subjects were performed using Hardy-Weinberg equilibrium, chi-square 2x2 analysis and independent t-test. Chi square and odds ratio were calculated with 95% confidence interval. A *p* value less than .05 was considered statistically significant.



(A)

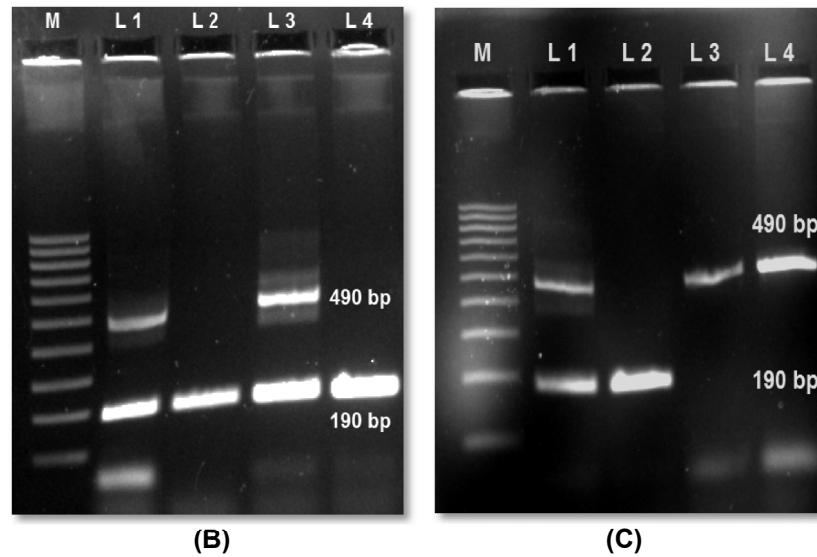


Fig. 1. Ethidium bromide-stained 2% agarose gel of representative PCR products of ACE gene I/D polymorphism. Lane (M) is 100 bp DNA Ladder. (A): The DD genotype (190 bp, Lanes 2, 4 and 5), the ID genotype (490 bp, 190 bp, Lanes 1 and 7), the II genotype (490 bp, Lane 3 and 6). (B): The DD genotype (190 bp, Lanes 2 and 4), the ID genotype (490 bp, 190 bp, Lanes 1 and 3). (C): The DD genotype (190 bp, Lane 2), the ID genotype (490 bp, 190 bp, Lane 1), the II genotype (490 bp, Lanes 3 and 4).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Results

Table 1 shows the clinical characteristics of ESRD patients ($n = 147$) and control subjects ($n = 140$). The renal functional parameters showed highly significant differences, ($P < .0001$), between two groups.

Table 2 shows the distribution of angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) genotypes and alleles frequency in the ESRD patients ($n = 147$) and in the control subjects ($n = 140$).

The frequencies of ACE DD genotype and D allele were significantly higher in the ESRD patients, (61.9% and 79.6%, respectively), as compared with the control subjects (47.1% and 71.1%, respectively), ($P = .012$, OR = 1.82, 95% CI = 1.139-2.915 for DD) and ($P = .018$, OR = 1.6, 95% CI = 1.082-2.33 for D). In contrast, the frequencies of ACE ID genotype and I allele were significantly lower in the ESRD patients as compared with the control subjects. The frequency of II genotype was no significantly decreased in the ESRD patients as compared with the control subjects.

Table 1. Clinical characteristics of ESRD patients and control subjects

Parameters	ESRD patients (Mean ± SD)	Control subjects (Mean ± SD)	P-value
Hemoglobin (g/dL)	7.8 ± 1.2	14.1 ± .8	< .0001**
Creatinine (mg/dL)	9.5 ± .3	.5 ± .1	< .0001**
BUN (mg/dL)	88.8 ± 8.2	7.2 ± .5	< .0001**
Uric Acid (mg/dL)	6.6 ± .2	4.3 ± .3	< .0001**
Sodium (mmol/L)	131.9 ± 3.3	144.9 ± 2.2	< .0001**
Potassium (mmol/L)	5.3 ± .2	4.1 ± .1	< .0001**
Calcium (mg/dL)	9 ± .2	10.1 ± .1	< .0001**
Phosphorus (mg/dL)	5.5 ± .2	3.2 ± .2	< .0001**
Total Protein (g/dL)	7.2 ± .1	8.4 ± .1	< .0001**
Albumin (g/dL)	3.2 ± .1	4.5 ± .1	< .0001**
Total Bilirubin (mg/dL)	.7 ± .1	.6 ± .1	< .0001**
ALT (U/L)	20.7 ± 6.4	14 ± .7	< .0001**
AST (U/L)	22.2 ± 3.6	15.6 ± .7	< .0001**
Alkaline Phosphatase (U/L)	139.7 ± 63.1	80 ± 4.4	< .0001**
Total Cholesterol (mg/dL)	186.5 ± 46.5	143.2 ± 11.4	< .0001**
Triglyceride (mg/dL)	205 ± 62.2	88.9 ± 12.2	< .0001**
HDL (mg/dL)	27.9 ± 1.6	49.2 ± 4	< .0001**
LDL (mg/dL)	126.9 ± 36.2	82.9 ± 16.4	< .0001**
Systolic BP (mm Hg)	144.6 ± 10.5	116.2 ± 2.3	< .0001**
Diastolic BP (mm Hg)	90 ± 3.2	72.9 ± 4	< .0001**
Dialysis Duration (years)	7.94 ± 4.05	0	< .0001**
Age (years)	44 ± 14.8	39.7 ± 14.1	.01*
Gender (Men / Women)	86 / 61	84 / 56	.79

*significant value ($P < .05$). Results were expressed as mean ± SD. SD: standard deviation. ESRD: end stage renal disease.

Table 2. ACE genotypes and alleles frequency in ESRD patients and control subjects

ESRD Patients Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE)				
	Observed Frequency N(%)	Expected Frequency N(%)	X²	P-value
Genotypes				
DD	91 (61.9 %)	93.1 (63.3 %)		
ID	52 (35.4 %)	47.8 (32.5 %)		
II	4 (2.7 %)	6.1 (4.2 %)		
Alleles				
D	234 (79.6 %)	-	1.2	.28
I	60 (20.4 %)	-		
Control Subjects Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE)				
	Observed Frequency N (%)	Expected Frequency N(%)	X²	P-value
Genotypes				
DD	66 (47.1 %)	70.7 (50.5 %)		
ID	67 (47.9 %)	57.6 (41.1 %)		
II	7 (5 %)	11.7 (8.4 %)		
Alleles				
D	199 (71.1 %)	-	3.76	.1
I	81 (28.9 %)	-		
Comparison of different genotypic and allelic states				
	X²	P-value	OR (95% CI)	
D v/s I	5.6	.018*	1.6 (1.082-2.33)	
DD v/s ID+II	6.3	.012*	1.82 (1.139-2.915)	
ID v/s DD+II	4.6	.032*	1.67 (1.044-2.692)	
II v/s DD+ID	1.01	.32	1.88 (.539-6.574)	

*Significant value ($P < .05$). Results obtained using Hardy-Weinberg equilibrium and chi-square 2x2 analysis. I: insertion polymorphism. D: deletion polymorphism. ID: insertion-deletion polymorphism. OR: odds ratio. CI: confidence interval.

3.2 Discussion

End stage renal disease (ESRD) is a multifactorial disease. Clinically, ESRD is an advanced form of chronic renal failure where renal function has declined to ~10% of the normal prior to initiation of dialysis or transplantation. The genetic variability in the number of genes affecting the pathogenesis of ESRD is postulated to contribute in a variable manner [11]. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is an important circulation endocrine system in human body, which can adjust blood pressure by action on vascular tension, kidney blood flow dynamics and electrolyte balance and is closely related with vascular endothelial proliferation and interactions of many cytokines [12].

Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) is a zinc metallopeptidase widely distributed on the surface of endothelial and epithelial cells. By stimulation of renin, angiotensinogen is converted to angiotensin I. ACE then converts angiotensin I to angiotensin II, the main active product of the RAAS [13]. Angiotensin II has several actions, including vasoconstriction, stimulation of the central nervous system, release of vasopressin and aldosterone, stimulation of protein synthesis, growth and cellular migration, pro-inflammatory genes and oxidative stress [14]. The ACE is as a part of RAAS has a key role in both cardiovascular and renal pathophysiology [13]. The ACE gene spans 21 kilo bases is located on the 17th chromosome q23 and consists of 26 exons and 25 introns. The polymorphism exists in

intron 16. The genotype is classified into three types: deletion homozygotes, DD; insertion homozygotes II and heterozygotes, ID [15].

In the present study, we have observed that there were highly significant differences in the biochemical parameters between ESRD patients and control subjects ($P < .0001$).

The present study showed that there were highly association between ACE I/D gene polymorphism and ESRD. The distribution of ACE DD genotype and D allele frequency were significantly increased in the ESRD patients as compared with the control subjects. They were considered as risk factors for ESRD; while the distribution of ACE ID genotype and I allele frequency were significantly decreased in the ESRD patients as compared with the control subjects ($P < .05$).

These results were in agreement with studies [1,9,11] who observed that there was a strong association of ACE DD genotype with ESRD as a risk factor for ESRD. Our results were in agreement with a study [16] who found that the allelic frequency of D allele of ACE I/D gene polymorphism was higher in the Malaysian ESRD patients than in the control subjects. In contrast to those studies, there was a study [17] failed to support the hypothesis that ACE I/D gene polymorphism plays a major role in the risk of ESRD. Also, the study [8] showed that there was no association between ACE genotypes and/or D allele and ESRD.

The current investigation could provide new evidence regarding the role of the ACE gene in the pathogenesis of ESRD, which may have significant clinical implications. The ACE (DD) genotype and D allele can be used as predicting and prognostic factors to avoid any complications lead to ESRD in the Egyptian population.

4. CONCLUSION

This study investigates that there is an association between ACE DD genotype and D allele, and ESRD as risk factors, while I allele are highly associated with ESRD, as protective factor, in the Egyptian population.

CONSENT

Informed written consent was obtained from all participants, (patients and control subjects), in this study.

ETHICAL APPROVAL

This study was approved by Ethical Board of the Mansoura University.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Zhou T, Yin S, Qin Y. Association between angiotensin converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and end-stage renal disease susceptibility. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2012;1-10.

2. Elshamaa MF, Sabry SM, Bazaraa HM, Koura HM, Elghoroury EA, Kantoush NA, et al. Genetic polymorphism of ACE and the angiotensin II type1 receptor genes in children with chronic kidney disease. *Journal of Inflammation*. 2011;8:20.
3. El-Minshawy O. End stage renal disease in El-Minia governorate, Egypt: data of year. *Nephrol-Urol Mon*. 2011;3(2):118-121.
4. Sisman Y, Gokce C, Sipahioglu M, Ertas ET, Unal A, Oymak O, et al. Torus palatinus in end-stage renal disease patients receiving peritoneal dialysis: does renal osteodystrophy play a role. *Journal of Dental Sciences*. 2012;154-158.
5. Marcus Y, Shefer G, Stern N. Adipose tissue renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;1-14.
6. Eleni S, Dimitrios K, Vaya P, Areti M, Norma V, Magdalini G. Angiotensin-I converting enzyme gene and I/D polymorphism distribution in the Greek population and a comparison with other European populations. *Journal of Genetics*. 2008;87(1):91-93.
7. Li Z, Pan X, Han B, Han H, Zhang Z, Gao L. No association between ACE polymorphism and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2011;13(1):210-215.
8. Buraczynska M, Ksiazek P, Drop A, Zaluska W, Spasiewicz D, Ksiazek A. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):979-983.
9. Tripathi G, Dharmani P, Khan F, Sharma RK, Pandirikkal V, Agrawal S. High prevalence of ACE DD genotype among north Indian end stage renal disease patients. *BMC Nephrology*. 2006;7:15.
10. Feng Y, Niu T, Xu X, Chen C, Li Q, Qian R, et al. Insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:1986-1988.
11. Tripathi G, Sharma RK, Baburaj VP, Sankhwar SN, Jafar T, Agrawal S. Genetic risk factors for renal failure among North Indian ESRD patients. *Clinical Biochemistry*. 2008;41:525-531.
12. Han JG, Jin H, Gao LB, Zhang J, Deng XK, Li LJ, et al. Relationship between polymorphisms of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion, endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 VNTR and risk for cervical cancer. *Life Science Journal*. 2012;9(2):100-104.
13. Kumar PS, Jaganmohan P, Subbarao M. Studies on association of ACE insertion/deletion polymorphism in smokeless tobacco-induced renal failures in coastal belt of Andhra Pradesh, India. *Am-Euras. J. Sci. Res*. 2012;7(5):220-225.
14. Fyhrquist F, Eriksson A, Saijonmaa O, Nordestgaard BG, Kontula K, De Faire U, et al. Telomere length is associated with ACE I/D polymorphism in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2012;1-8.
15. Nikzamir A, Nakhjavani M, Golmohammadi T, Dibai L, Saffary R. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and ACE activity in type 2 diabetic patients. *Acta Medica Iranica*. 2008;46(4):277-282.
16. Ali A, Vasudevan R, Ismail P, Seong CLT, Chakravarthi S. Analysis of insertion/deletion polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in Malaysian end stage renal disease patients. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2011;1-7.

17. Pereira TV, Nunes CF, Rudnicki M, Magistrone R, Albertazzi A, Pereira AC, et al. Influence of ACE I/D gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis. 2006;21(11):3155-63.

© 2014 AbdeL-Aziz et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=380&id=12&aid=2935>

Analysis of insertion/deletion polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in Malaysian end-stage renal disease patients

Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System
2015, Vol. 16(4) 1337–1343
© The Author(s) 2011
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1470320310392096
jra.sagepub.com
SAGE

Aisyah Ali¹, Ramachandran Vasudevan¹, Patimah Ismail¹,
Christopher Lim Thiam Seong² and Srikumar Chakravarthi³

Abstract

Introduction: Insertion/deletion (I/D) polymorphisms found in the angiotensin converting enzyme (ACE) gene have been associated with hypertension, diabetes and renal disease. The present study sought to determine the association of I/D polymorphisms of the ACE gene with end-stage renal disease (ESRD) patients in Malaysia.

Materials and methods: A total of 380 subjects were recruited to determine the genotypes of I/D polymorphisms of the ACE gene. Genotyping was performed using a PCR method. Statistical analyses were carried out using statistical software, and a level of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The frequencies for II, ID and DD genotypes of the ACE gene were 24.7%, 65.80% and 9.47%, respectively, in ESRD patients, and in control subjects were 45.26%, 47.37% and 7.37% respectively. The frequency for the D allele was found to be higher (42.40%) in ESRD patients compared to control subjects (31.05%). The genotypic and allelic frequencies of I/D polymorphisms of the ACE gene differed significantly ($p < 0.05$) between ESRD patients and control subjects in the Malaysian population.

Conclusion: The findings of this study indicate that I/D polymorphisms of the ACE gene are a useful marker and are likely to play a major role in determining genetic susceptibility to ESRD in the Malaysian population.

Keywords

Angiotensin converting enzyme, end-stage renal disease, insertion/deletion, PCR, polymorphism, Malaysia

Introduction

End-stage renal disease (ESRD) is a multifactorial disease and an advanced form of chronic renal failure. ESRD is a complex phenotypic structure of renal diseases affected by different etiologies.¹ Although ethnic, social and environmental factors play a part in development of the disease, to a large extent the cause of the disease is determined by genetic factors.² The genes responsible for the development and rate of progression to ESRD have not been identified. However, several studies have shown that renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) gene polymorphisms are highly associated with renal complications.³ The RAAS plays an important role in regulating blood pressure, electrolyte balance and renal haemodynamics.⁴ RAAS gene polymorphisms have been extensively studied to determine the genetic susceptibility to essential hypertension,⁵ type 2 diabetes mellitus,⁶ cardiovascular disease⁷ and renal disease.³ Among the RAAS genes, angiotensin-converting enzyme (ACE) is said to be a major component and it has been

extensively studied as a candidate gene for various disorders. ACE polymorphisms appear to have significant impact on the progression of ESRD.⁸ ACE plays an important role in modulating the vascular tone, catalysing generation of angiotensin II, a potent vasoconstrictor.⁹ A 287-bp Alu insertion/deletion (I/D) polymorphism at intron 16 of ACE was found to be susceptible to essential hypertension,¹⁰ type 2

¹ Molecular Biology and Bioinformatics Lab, Department of Biomedical Sciences, Universiti Putra Malaysia, Malaysia

² Department of Medicine, Universiti Putra Malaysia, Malaysia

³ Faculty of Medicine and Health Sciences, Department of Pathology, International Medical University, Malaysia

Corresponding author:

Patimah Ismail, Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medical and Health Science, Universiti Putra Malaysia, Serdang 43400, Selangor DE, Malaysia.

Email: patimahismail@gmail.com

diabetes mellitus,¹¹ diabetic complications¹² and ESRD¹³ in various populations.

Several studies have reported that the DD homozygote of I/D polymorphism of the ACE gene is associated with an increased risk of developing ESRD,¹³ diabetic nephropathy¹⁴ and polycystic kidney disease.¹⁵ However, in contrast to those studies, some reports have shown a negative association with the D allele in ESRD¹ and hypertension¹⁶ in various populations.¹⁷ The conflicting results for I/D polymorphisms of the ACE gene might be due to consideration of different ethnic groups.¹⁸ Taking this into account, we sought to determine the association of I/D polymorphisms of the ACE gene in the Malaysian ESRD population.

Materials and methodology

Subjects

Following ethical approval from the Faculty of Medicine and Health Science, Universiti Putra Malaysia (UPM) and given permission from National Kidney Foundation of Malaysia, 190 ESRD patients and 190 control subjects were recruited. All the patients were undergoing dialysis treatment following diagnosis of stage 5 chronic kidney disease by nephrologists. Decisive factors such as age, gender, race, body mass index (BMI), systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), urea level, lipid profiles and serum electrolytes were identified from the patients' medical records. Using a cytology brush, buccal cells were collected from the ESRD patients. For the control subjects, SBP and DBP were measured using a sphygmomanometer. All the control subjects were recruited based on the absence of any history of kidney disease and the presence of normal serum creatinine level. To determine the serum creatinine and blood glucose levels, and the lipid profiles, 4–5 ml of blood were collected from the subjects by a qualified phlebotomist. All biochemical analyses were carried out using the Hitachi-912 Autoanalyser (Hitachi, Germany) using kits supplied by Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Written consent was obtained from all the subjects who participated in this study.

Genotyping

For the patients, genomic DNA was extracted from buccal cells using a Puregene Buccal cell core kit (Qiagen, Germany), whereas for the control subjects, genomic DNA was extracted from peripheral blood using an Accuprep Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea). The extracted DNA from both sources was quantified and qualified. PCR was carried out to determine the genotypes of ACE I/D using specific flanking primers, which has been described elsewhere.¹⁰ The amplified PCR fragments show

three different genotypes on gel electrophoresis; however, DD genotypes were confirmed using an insertion-specific primer pair to identify the I allele of the ACE gene. All the amplified products were separated using 2% agarose gel electrophoresis and the gel was stained using Gel Red (Biotium, USA). The stained gel was visualised under UV light using an Alpha Imager (Alpha Innotech, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis for continuous data variables and other analyses, such as *t*-test, ANOVA were carried out using SPSS (SPSS, USA) software version 14.0 for Microsoft Windows. Allelic frequencies were calculated using the gene counting method, and the genotype distribution with Hardy–Weinberg expectations by a chi-square test. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were estimated for the effects of high-risk alleles. A level of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

A total of 400 subjects were approached to participate in this study; 20 of the subjects were excluded due to inconsistent results and extreme values, leaving a final study group of 380 subjects. Within the study group, 190 ESRD patients were recruited from the various National Kidney Foundation Dialysis centres in Malaysia, whereas 190 control subjects were collected randomly by conducting a health screening programme at various places in and around UPM.

The clinical parameters of the ESRD patients and control subjects are shown in table 1. The majority of the total subjects were female; however, there were more male ESRD patients (54.7%) than female (45.3%). The age of the ESRD patients ranged from 31 to 75 years old, with a mean age of 54.68 ± 12.20 years, whereas the age of the control subjects ranged from 25 to 74 years old, with a mean age of 45.82 ± 13.39 years. There were significant differences observed between the ESRD patients and control subjects in age, SBP, BMI, creatinine levels, triglyceride and total cholesterol levels ($p < 0.05$), but not in DBP, low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels.

Genotypes of I/D polymorphism of the ACE gene were determined using a conventional PCR method, and calculated based on the pattern of bands on gel electrophoresis (figure 1). The absence/presence of a 287-bp Alu repeated sequence I/D polymorphism represents the DD genotype (190 bp), whereas II indicates the homozygous (490 bp) and ID heterozygote genotypes (490 and 190 bp). Figure 2 shows the mistyping of ID heterozygotes of I/D polymorphism of the ACE gene. Random blind samples were

Table 1. Clinical characteristics of ESRD patients and control subjects

Parameter	ESRD patients (190)	Control subjects (190)	p-value
Gender, M/F	104/86	75/115	-
H/D/ H+D	77/30/83	-	-
Age (years)	54.68 ± 12.20	45.60 ± 13.62	0.001*
SBP (mm Hg)	149.14 ± 27.95	132.16 ± 19.1	0.001*
DBP (mm Hg)	77.59 ± 16.64	78.08 ± 10.81	0.737
BMI (kg/m ²)	24.71 ± 3.59	27.91 ± 4.01	0.001*
Creatinine (mg/dL)	13.26 ± 5.09	0.62 ± 0.23	0.001*
LDL (mmol/L)	2.99 ± 1.12	3.10 ± 1.08	0.323
HDL (mmol/L)	1.09 ± 0.33	1.16 ± 0.45	0.138
Triglycerides (mmol/L)	2.34 ± 1.21	1.16 ± 0.81	0.001*
T. Cholesterol (mmol/L)	5.08 ± 1.28	4.72 ± 1.31	0.007*

ESRD, end-stage renal disease; H, hypertension; D, type 2 diabetes mellitus. *Significant $p < 0.05$. Values shown are mean ± SD.

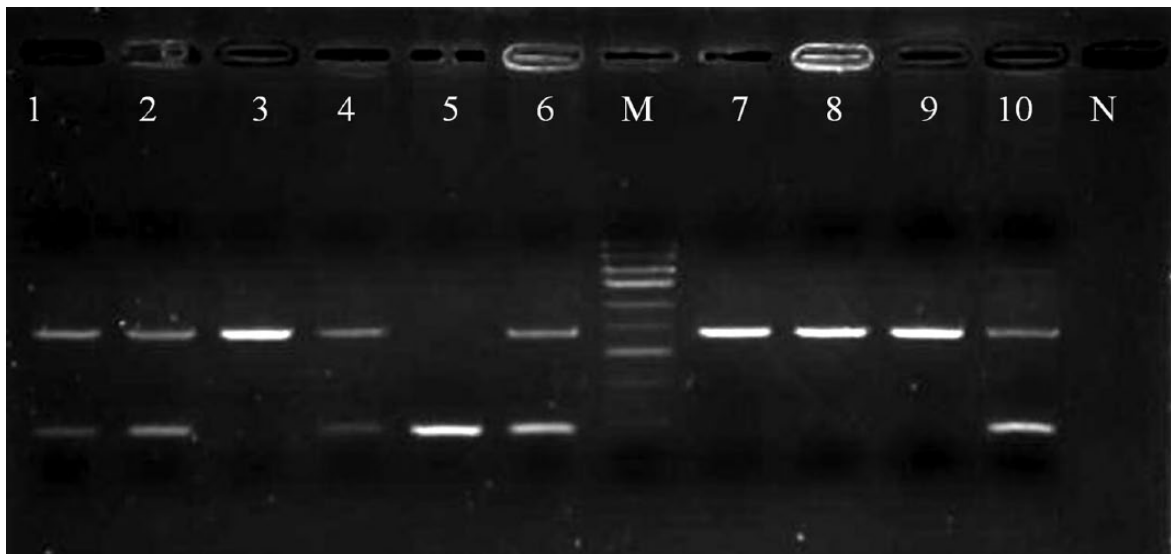


Figure 1. Detection of I/D polymorphism of the ACE gene in 2% agarose gel electrophoresis. Lanes 3, 7, 8 and 9 show homozygous II genotypes; lanes 1, 2, 4, 6 and 10 show heterozygous ID genotypes; lane 5 shows homozygous DD genotypes of I/D polymorphism. M represents a 100-bp DNA ladder plus (Bioline) and N represents a negative control.

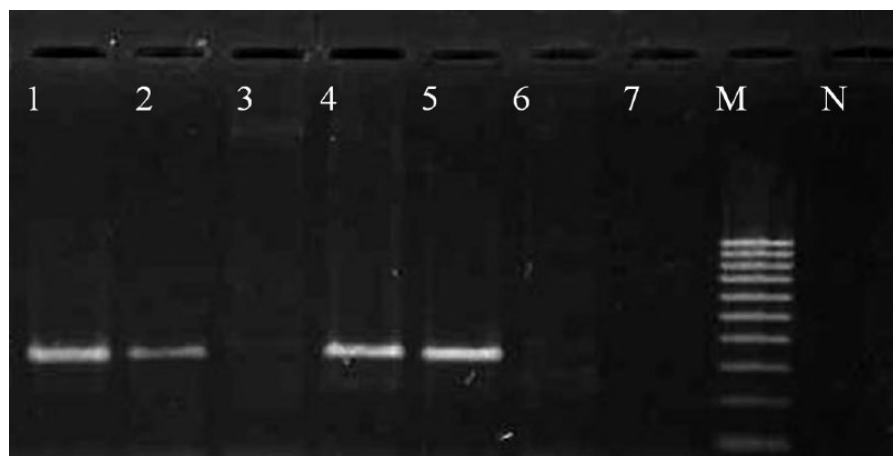


Figure 2. Detection of mistyping of ID heterozygotes in 2% agarose gel electrophoresis. Lanes 1, 2, 4 and 5 show mistyping of ID heterozygotes as D homozygotes, which show the presence of the I allele (335 bp), whereas lanes 3, 6 and 7 show no products, which means there are confirmed homozygous DD genotypes of I/D polymorphism. M represents a 100-bp DNA ladder plus (Bioline) and N represents a negative control.

Table 2. Distribution of genotypes and allele frequencies between ESRD patients and control subjects

	ESRD patients (n = 190) n (%)	Control subjects (n = 190) n (%)
Genotypes		
II	47 (24.70%)	86 (45.26%)
ID	125 (65.80%)	90 (47.37%)
DD	18 (9.50%)	14 (7.37%)
p-value	0.000*	
Alleles		
I	219 (57.60%)	262 (68.95%)
D	161 (42.40%)	118 (31.05%)
p-value	0.001*	
Odds ratio (95% confidence interval)	0.613 (0.455–0.825)	

*Significant value ($p < 0.05$) obtained using chi-square test as compared with controls. Data are reported as number of subjects with per cent in parentheses. ESRD, end-stage renal disease.

chosen and genotyped twice under similar conditions, and the results were identical to the previous results.

The findings of this study showed that the D allele is highly associated with Malaysian ESRD patients as compared to control subjects ($p < 0.05$). Table 2 shows the distribution of I/D polymorphic genotypes of the ACE gene between the ESRD patients and control subjects. The genotypic frequencies of I/D polymorphism of the ACE gene found in ESRD patients were 24.7%, 65.80% and 9.47%, and in the control subjects 45.26%, 47.37% and 7.37% for the II, ID and DD genotypes respectively. The D allele was found to be higher (42.40%) in the ESRD patients as compared to the control subjects (31.05%), and statistically significant ($p < 0.05$)

Discussion

According to the 16th Report of the Malaysian Dialysis and Transplant Registry 2008, the intake of new dialysis patients increased rapidly from 1559 in 1999 to 3874 in 2007.¹⁹ The prevalence of dialysis patients increased from 244 per million population in 1999 to more than 626 per million at year end 2007. However, in the last 2 years the transplant numbers and rates have decreased. This drastic change is predominantly due to the unhealthy lifestyle of Malaysians, with increased prevalence of obesity, hypertension and diabetes.^{20,21} This is reflected in the present study as the control subjects are in the obesity category as compared to the ESRD patients who are in the overweight category (Clinical Practice Guidelines on Management of Obesity 2004).²² Moreover, significant differences were observed in triglycerides and total cholesterol between the groups, showing that an elevation in triglycerides and a reduction in the HDL-C increased chances of development

of early occurrence of the disease.²³ Hence, there is a need to know the etiological factors in relation to renal disease among the Malaysian population.

Genetic variations can be used as a marker to identify the individuals at risk. Many association studies have been carried out to identify genetic risk factors that predispose to various diseases. The RAAS regulates blood pressure, electrolyte and fluid homeostasis.²⁴ Genetic variations found in RAAS genes influence the activity of the system and may predispose to development of hypertension and renal failure. The role of genetic polymorphisms has been intensively studied in development or progression of renal diseases, with conflicting results in various population.^{25–29} Among the RAAS genes, the ACE gene is involved in the conversion of angiotensin I to angiotensin II and the degradation of bradykinin.¹⁰ The ACE gene is located on chromosome 17q23 and consists of 26 exons in a 21-kb section. The presence or absence of a 287-bp repeat sequence at intron 16 has been used as a common marker in susceptibility to various disorders.²⁹

Various studies have been carried out to determine the susceptibility gene that predisposes to ESRD and other diseases.³⁰ To determine the candidate gene, association studies have been carried out in various populations with contradictory findings.^{31–33} The present association study was undertaken to determine the association of I/D polymorphisms of the ACE gene in Malaysian ESRD patients as compared with control subjects. To the best of the authors' knowledge, there are no previous reports based on I/D polymorphisms in Malaysian ESRD subjects; this is the first comprehensive report.

According to the third National Health Morbidity Survey 2004 in Malaysia, among adults the prevalence of hypertension was found to be 42.5% and the prevalence of type 2 diabetes mellitus 11.6%.¹⁹ In this study, the prevalence of hypertension with diabetes was higher (43.70%) than of hypertension (40.50%) and type 2 diabetes mellitus (15.7%) alone. This indicates that cholesterol and other environmental factors influence the development of ESRD.¹²

As all the patients having dialysis were not advised to give blood samples, buccal cells were collected and the genomic DNA extracted, whereas peripheral blood was collected from the healthy individuals to measure the biochemical parameters as well as for downstream applications. Moreover, the yields of genomic DNA extracted from both sources were similar, as measured using a biophotometer. Increased plasma and serum ACE levels were genetically determined by a 287-bp fragment of I/D polymorphism in the 16th intron of the ACE gene at chromosome 17.¹⁰ The I/D polymorphism of the ACE gene was amplified and analysed using PCR and electrophoresis. However, there is a chance of mistyping of ID heterozygotes as D homozygotes may occur. To increase the specificity of DD genotyping, PCR amplifications were also performed with an insertion-specific primer to identify the presence of the I allele (335

Table 3. Genotypes and allele frequency distribution of insertion/deletion polymorphism of the ACE gene in Asian populations

Population	Disease	No.	Genotypes n (%)				Allele n (%)			Study
			II	ID	DD	P	I	D	p	
Malaysia	ESRD	190	47 (24.7)	125 (65.8)	18 (9.5)	***	219 (57.6)	161 (42.4)	***	Present study
Malaysia	HPT	65	24 (36.9)	34 (52.3)	7 (10.8)	*	82 (63.1)	48 (36.9)	**	Ramachandran et al. ¹⁰
Malaysia	T2DM	60	24 (40.0)	25 (41.7)	11 (18.3)	**	73 (60.8)	47 (39.2)	**	Ramachandran et al. ¹⁰
North Indian	ESRD	184	56 (30.4)	74 (40.2)	54 (29.4)	***	182 (49.5)	186 (50.5)	***	Gaurav et al. ¹³
Chinese	ESRD+ Cardiovascular	153	28 (18.3)	44 (28.8)	81 (52.9)	*	100 (32.7)	206 (67.3)	**	Feng et al. ³⁸
Chinese	ESRD+T2DM	129	56 (43.4)	60 (46.5)	13 (10.1)	NS	172 (66.7)	86 (33.3)	NS	Hung et al. ³⁵
South Indian	CKD	118	27 (23.0)	58 (49.0)	33 (28.0)	NS	112 (47.5)	124 (52.5)	NS	Kolandaswamy et al. ³⁶
South Indian	DN	86	45 (52.3)	24 (27.9)	17 (19.8)	*	114 (66.3)	58 (33.7)	*	Vijay et al. ³⁷

ESRD, end-stage renal disease; CKD, chronic kidney disease; DN, diabetic nephropathy; HPT, hypertension; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, at 5% level of significance, NS: Not significant ($p > 0.05$).

bp), whereas there were no products in samples that were homozygous for the DD genotype.

The ACE gene plays an important role both biologically and clinically in development of ESRD.¹ Several studies have shown the association of the D allele with an increased risk of essential hypertension,⁸ diabetes and its complications;³¹ however, DD genotypes failed to show an association with essential hypertension³² and type 2 diabetes³³ in various populations. These controversial findings compelled us to determine I/D polymorphisms of the ACE gene in Malaysian ESRD patients.

In this study, the allelic frequency of the D allele of I/D polymorphisms of the ACE gene was found to be higher in ESRD patients (42.40%) than in control subjects (31.05%), and was similar to the frequency reported in North Indian¹³ and Switzerland³⁴ populations. To support our findings, we searched databases to find details of the genotypic and allelic frequencies among Asian populations in reaction with I/D polymorphisms of the ACE gene with ESRD and its complications. We compiled the search results in table 3. From the table, it can be clearly seen that I/D polymorphisms of the ACE gene were not consistently associated with ESRD and its complications among and within the populations. From the findings of Ramachandran et al.,¹⁰ I/D polymorphism of the ACE gene is a risk factor for hypertension and type 2 diabetes mellitus in Malaysian subjects. Our study showed a significant relationship for the D allele of I/D polymorphism of the ACE gene in ESRD patients and supports the previous findings of Ramachandran et al.¹⁰ However, our results are contradictory to some reports.³⁵⁻³⁷ This discrepancy might be due to genetic heterogeneity, environmental background or different study designs.

Limitations

The present study has provided only a genetic association for I/D polymorphism of the ACE gene among Malaysian ESRD patients as compared to control subjects. However, we failed to analyse the renal ACE mRNA levels in both ESRD patients and control subjects. The control subjects were not age- and sex-matched with the ESRD patients. Moreover, our population is not homogenous as compared to the populations studied by Feng et al.³⁸ and Monika et al.¹ Other than I/D polymorphisms of ACE, we are analysing other polymorphisms such as rs4331, rs4334 and rs4341 found in the ACE gene. Also, we are studying other RAAS gene polymorphisms, such as M235T and T174M polymorphisms of the angiotensinogen gene, A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene, T344C polymorphism of the aldosterone synthase gene and Gly460Trp polymorphism of the adducin gene to investigate the role of genetic polymorphisms involved in development of ESRD among Malaysian subjects. However, replication studies with larger number of samples on a homogenous study population are strongly recommended to confirm the association and to avoid population stratification.

Conclusions

I/D polymorphisms of the ACE gene are strongly associated with ESRD in Malaysian patients, and these can be used as a genetic marker for susceptibility to ESRD in this population.

Acknowledgements

The authors would like to extend their gratitude to National Kidney Foundation Dialysis centres and all the volunteers involved in this

study. We also appreciate the assistance of Miss Mimi Soraya Binti Mansor and Miss Rusni Mohd Jas in collecting the samples.

Funding

This study was supported by the RUGS project number 91104.

References

1. Monika B, Piotr K, Andrzej D, Wojciech Z, Danuta S and Andrzej K. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 979–983.
2. Michael E, Joris AA, Klaas K, Hans JB, Emile DH and Jan AB. Genetic factors in progressive renal disease: the good ones, the bad ones and the ugly ducklings. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 257–260.
3. Gumprecht J, Zychma MJ, Grzeszczak W and Zukowska SE. Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion and angiotensinogen M235T polymorphisms: risk of chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 513–519.
4. Kim S and Iwao W. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 11–34.
5. Vasudevan R, Patimah I, Johnson S and Norashikin S. Analysis of renin-angiotensin aldosterone system gene polymorphisms in Malaysian essential hypertensive and type 2 diabetic subjects. *Cardiovasc Diabetol* 2009; 8: 11.
6. Ittersum FJ, Man AM, Thijssen S, Knijff P, Slagboom E, Smulders Y, et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1000–1007.
7. Buraczynska M, Pijanowski Z, Spasiewicz D, Nowicka T, Sodolski T, Widomska CT, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms: assessment of the risk of coronary heart disease. *Kardiol Pol* 2003; 58: 1–9.
8. Gaurav T, Poonam D, Faisal K, Raj KS, Vinod P and Suraksha A. High prevalence of ACE DD genotype among north Indian end stage renal disease patients. *BMC Nephrology* 2006; 7: 15.
9. Erdos E and Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 1987; 56: 345–348.
10. Ramachandran V, Patimah I, Johnson S, Norashikin S, Saidi M and Rusni MJ. Association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus in Malaysian subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2008; 9: 208.
11. Tseng CH. Effect of parental hypertension and/or parental diabetes on hypertension in Taiwanese diabetic patients. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 870–877.
12. Hsieh MC, Lin SR and Hsieh TJ. Increased frequency of angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1008–1013.
13. Gaurav T, Raj KS, Vinod PB, Satya NS, Tabrez J and Suraksha A. Genetic risk factors for renal failure among North Indian ESRD patients. *Clin Biochem* 2008; 41: 525–531.
14. Mitch WE. Is the inherited ACE genotype a trump or a joker? *J Clin Invest* 1995; 96: 2100–2101.
15. Perez OL, Torra R, Badenas C, Mila M and Darnall A. Influence of the ACE gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney diseases. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 273–278.
16. Zaman MM, Yoshiike N, Date C, Yokoyama T, Matsumura Y, Ikemoto S, Tanaka H. Angiotensin converting enzyme genetic polymorphism is not associated with hypertension in a cross-sectional sample of a Japanese population: the Shibata study. *J Hypertens* 2001; 19: 47–53.
17. Anna V, Miroslav S, Vladimir Z, Ivan R, Svatava T, Lenka S, et al. Angiotensin-I-Converting enzyme and angiotensinogen gene interaction and prediction of essential hypertension. *Kidney Int* 1998; 53: 1479–1482.
18. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Savendra AP, Soubrier F, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997; 15: 1579–1592.
19. Rampal L, Rampal S, Azharc MZ and Rahmand AR. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Malaysia: a national study of 16,440 subjects. *Public Health* 2007; 122: 11–18.
20. Sidik SM and Rampal L. The prevalence and factors associated with obesity among adult women in Selangor, Malaysia. *Asia Pac Fam Med*. 2009; 8: 2.
21. Corvol P, Soubrier F and Jeunemaitre X. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. *Pathol Biol* 1997; 45: 229–239.
22. Malaysian Clinical Practice Guidelines on Management of Obesity 2004. Available at www.infosihat.gov.my/.../CPG%20Management%20of%20obesity/CPG%20Management%20of%20obesity.pdf
23. Sowers JR. Metabolic risk factors and renal disease. *Kidney Int* 2007; 71: 719–720.
24. Yoshida H, Kon V and Ichikawa I. Polymorphisms of the renin angiotensin system genes in progressive renal disease. *Kidney Int* 1996; 50: 732–744.
25. Schmidt S and Ritz E. The role of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 5: 552–555.
26. Schmidt S and Ritz E. Genetics of the renin-angiotensin system and renal disease: A progress report. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 6: 146–151.
27. Sung-Kyu HA and Jung-Kun SEO. Insertion/deletion polymorphism in ACE gene as a predictor for progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997; 52: S28–S32.
28. Kunz R, Bork JP, Fritsche L, Ringel J and Sharma AM. Association between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion for other cardiovascular phenotypes, in which increased polymorphism and diabetic nephropathy: A methodological appraisal and systematic review. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1653–1663.
29. Sonoo M, Hiromichi H, Haruko K, Masateru I, Moriatsu M, Ken S, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int* 2001; 60: 1124–1130.
30. Nordfors L, Lindholm B and Stenvinkel P. End-stage renal disease – not an equal opportunity disease: the role of genetic polymorphisms. *J Int Med* 2005; 258: 1–12.
31. Marre M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene TT, Hallab M, et al. Relationship between angiotensin

- I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complication. *Diabetes* 1994; 43:384–388.
32. Chiang FT, Lai ZP, Chern TH, Tseng CD, Hsu KL, Lo HM, et al. Lack of association of the angiotensin converting enzyme gene polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. *Am J Hypertens* 1997; 10: 197–201.
 33. Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H, et al. The D allele of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (I/D) polymorphism is a risk factor for type 2 diabetes in a population based Japanese sample. *Endocr J* 2003; 50: 393–398.
 34. Emanuela L, Alain R, Brigitte MF, Felix JF and Paolo F. Genetic polymorphisms of the renin–angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2001; 60: 46–54.
 35. Hung RC, Chi HC, Kuo HS, Chen HC, Jong DL and Ming YW. Study of the polymorphism of angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptor in type II diabetes with end-stage renal disease in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2003; 66: 51–56.
 36. Kolandaswamy A, Krishnaswamy S, Muthiah R, Paneerselvam G, Sivasamy G and Govindan SS. Analysis of polymorphism in renin angiotensin system and other related genes in South Indian chronic kidney disease patients. *Clinica Chimica Acta* 2009; 406: 108–112.
 37. Vijay V, Yanqing Z, Karthik B, Stephen D, Chamukuttan S, Ambady R, et al. Association between ACE Gene Polymorphism and Diabetic Nephropathy in South Indian Patients. *JOP J Pancreas* 2001; 2: 83–87.
 38. Feng YT, Fu YL and Xiong WX. Association of angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with vascular disease in ESRD patients in a Chinese population. *Mol Cell Biochem* 2008; 319: 33–39.



Determination of I/D genetic variation of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene in Iraqi patients with Renal Failure

Karrar Saleem Zayed

Department of Laboratory Investigations, Faculty of Science, University of Kufa, Iraq

Abstract

This study was proposed to investigate genetic polymorphism in angiotensin-converting enzyme (ACE) gene as a risk factor for renal failure disease incidence. Fifty-eight Iraqi patients (37 men and 21 women) with renal failure undergoing dialysis treatment (hemodialysis and peritoneal dialysis) consulting at Al-Sadr dialysis center were enlisted into this study; the mean age of these patients was (54.25 ± 11.35) years as the first group. A second group was fifty two healthy control subjects collected from donor blood bank (33 men and 18 women) with the mean age of (50.95 ± 12.8) years. The collection of blood samples from renal failure patients and healthy control persons takes place for detection of serum Creatinine, Urea and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) as biochemical diagnostic markers. Then, DNA was extracted from the blood of two groups for detection of Insertion/Deletion (I/D) polymorphism in ACE gene in intron 16 as a prognostic marker for detection of renal failure disease.

The result of this study appears that the levels of Creatinine, Urea and ACE enzyme in renal failure patients increased significantly when compared with control. On the other hand, the genetic polymorphism I/D in ACE gene concluded that the DD and II genotypes differences were highly significant between patients and control ($P = 0.021$) especially in patients with DD genotype OR = 3.49 (95% CI = 1.56-7.93). Also, The DD v/s ID+II and DD+ID v/s II genotypes comparison between patients and control group showed a significantly different ($P = 0.001$) with OR=5.874 (95% CI = 3.71-8.80), OR= 3.58 (95% CI = 2.01-6.81) respectively which revealed that the patients with DD genotype have a high risk for renal failure occurrence. In addition, it was detected that serum ACE level was higher in patients with DD genotype in ACE gene than in patients with II+ DI genotypes ($p = 0.015$). The present study concluded that there is a higher prevalence of (DD) polymorphism genotype in ACE gene in renal failure patients which may be responsible for renal failure pathogenesis.

Introduction

Chronic Kidney Disease (CKD) or renal failure is a global prevalent health problem regarded as polyphonic and complex disorder results from interactions between gene-gene and gene-environmental. The pathogenesis of this disease is extremely correlated with genetic variability [1]. The Renin-Angiotensin System (RAS) is an important regulator of kidney function and blood pressure. The correlations between RAS and CKD still unclear on contrary of contributions between RAS and hypertension which is well documented. However, several types of RAS blockers such as angiotensin receptor blockers and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors have been advising to patients with CDK to prevent renal damage [2]. The individuals differ in their response to treatment with RAS inhibitors depend on pathophysiological characteristics. Thus, several polymorphisms in RAS components are the main factors to contribute to its heterogeneous association between renal failure patients [3]. Angiotensin converting enzyme (ACE) is a main component of the Renin-angiotensin system and has a crucial function in hydrolyzing angiotensin I into a potent vasopressor called angiotensin II that causes regulation of blood pressure, this enzyme has other important functions like degrading a strong vasodilator (Bradykinin), at the same time, this enzyme able to inactivate these two



vasodilators (Bradykinin and angiotensin II) and it has been a role in hydrolyzing Angiotensin and inducing synthesis of the aldosterone-stimulating peptide which causes electrolyte balance [4].

The ACE gene is contained 25 introns and 26 exons and the length of this gene is 21 kilo base, As well the location of the gene on the long arm of chromosome 17. ACE gene has more than 160 gene polymorphisms; the vast majority of them are single nucleotide polymorphisms (SNP). The SNP in this gene involves either a deletion (D) allele or an insertion (I) allele that forms three probable genotypes: DD, II or ID [5]. The deletion (D) or insertion (I) of a 287 base pair Alu repetitive sequence appears in intron 16, this polymorphism is seemed to be related to the interpersonal variability of ACE enzyme levels in circulating blood, the increasing activity of the ACE enzyme in plasma is correlated with the deletion allele at this gene which causes elevation of angiotensin II level that stimulates the expression of other growth factors, leading to kidney problems like glomerulosclerosis [6]. Numerous studies have been done to evaluate the relationship between the progress of renal failure and ACE I/D polymorphism (3, 5, 7). In recent years, there has been a marked increase in kidney disease in Iraq, and for now, the reasons for this are unknown. So, this study focused on the genetic side for this disease as an important aspect of the disease by evaluating the role of ACE I/D in renal failure patients and healthy subjects as a prognostic marker for early detection of this disease. Then, detect the contribution of this polymorphism to serum ACE level.

Subjects & Methods

Subjects

This study conducted through the period from September 2016 to March 2017. The collection of samples was performed in Specialist Centre for Nephrology (Al-Sadr dialysis center) in Al-Sadr Teaching Hospital in Al-Najaf province while the molecular study performed in the laboratory of molecular biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Kufa.

The renal failure patients were (n = 58; 37 men and 21 women), with a mean age (54.25±11.35) years. All the patients were undergoing dialysis treatment (haemodialysis and peritoneal dialysis) following diagnosis of renal failure by nephrologists and taken from Specialist Centre for Nephrology (Al-Sadr dialysis center) in Al-Najaf Province. Diabetic nephropathy patients were excluded from this study; the inclusion criteria for these patients involved a continually increased Creatinine level more than the normal range (from 3.5 to 15.5). Some information was collected for each of the renal failure patients which included gender, age, creatinine, protein uria level. The control group collected from donor blood bank (n=52; 33 men and 18 women) with mean age (50.95 ± 12.8) years, the control subjects had normal kidney functions and they were free from any Kidney diseases, also they were free from any other diseases.

Methods

The collection of venous blood samples were occurred in the morning after the overnight fasting before the dialysis session on a midweek dialysis day. (4 ml) of peripheral blood samples were collected and divided into two groups, the first group includes (1 ml) of blood in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes which considered as an anticoagulant used for DNA extraction then, the polymerase chain reaction (PCR) technique on these DNA samples was applied for detection of ACE genotype I/D polymorphisms and second group includes (3 ml) in tubes without EDTA allowed to clot for 10-15 minutes, centrifuged and the separated serum is used to analyze the biochemical parameters (Creatinine, Urea and ACE) using Mini vidas technique in renal failure patients as well as in the control subjects.



Determination of ACE Genotypes

Genomic DNA purification kit, (Promega) used for DNA extraction from the blood samples depending on the protocol of Isolating Genomic DNA from whole blood. 100 μ l of the extracted DNA solution were stored at -20 °C. The specific segment of ACE gene was amplified for detection of (I/D) ACE polymorphism by PCR using the specific primers:

Forward: 5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTCT 3' ;

Reverse: 3' GATGTGGCCATCACATTCGTCACGAT 5' [8]

PCR amplification was conducted in a total volume of 25 μ l including: 5 μ l DNA (concentration 20 ng), 2.5 μ l of ACE forward primer, 2.5 μ l of ACE reverse primer, 12.5 μ l of 2X Taq green master mix and 2.5 μ l of D. W. PCR tube were closed and transferred into the thermal-cycler when reach temperature reach 95°C and start the amplification program that includes, the reaction were performed in: 4 minute of initial denaturation at 94°C, 32 cycles of 30 second at 94°C, 30 second at 57°C and 1 minute at 72°C and one cycle of 10 minute at 72°C as a final extension. Analysis of PCR results is based on the presence of specific bands of DD, ID and II alleles. The DD homozygous genotype diagnosed by the presence of a single 190 bp PCR product. The II homozygous genotype were distinguished by detecting a single 490 bp PCR product while the ID heterozygous individuals were distinguished by detecting both 190bp and 490bp PCR products as shown in gel electrophoresis [9].

Statistical analysis

All the statistical calculation of the molecular and biochemical parameters were done using statistical software SPSS (version 18). The values are expressed as mean \pm SD for each variable. One-Way Analysis of Variance (ANOVA) used for evaluation of data followed by a test of Tukey's multiple comparisons. Odd ratio with 95 % confidence interval test used for estimation of the gene polymorphism risk. P value < 0.05 was considered a significant.

Results:

Biochemical parameters in renal failure patients and control:

The renal functional parameters were investigated in the current study. The Creatinine level was highly significant increased (P=0.001) in patients group (13.12 \pm 4.98) mg/dL when compared with control (0.71 \pm 0.25) mg/dL. In addition, the level of blood Urea was increased significantly (P= 0.001) in patients (62.22 \pm 10.91) mg/dL than healthy control group (9.65 \pm 2.73) mg/dL. On the other hand, the serum ACE level was seen to be higher significantly (P= 0.01) in patients with renal failure (75.87 \pm 30.11) IU/l than control (28.12 \pm 7.74) IU/l as shown in table 1.

Table1. Biochemical characteristics of renal failure patients and control:

Parameters value	Renal failure patients (Mean \pm SD)	Control subjects (Mean \pm SD)	P-value
Creatinine (mg/dL)	12.91 \pm 4.98	0.71 \pm 0.25	0.001
Urea (mg/dL)	62.22 \pm 10.91	9.65 \pm 2.73	0.001
ACE activity IU/l	75.87 \pm 30.11	28.12 \pm 7.74	0.01

SD: Standard deviation , P: Probability



Distributions of I/D ACE polymorphism in renal failure patients and control:

The percentage of DD, II and ID genotypes in patients group (n = 58) was 18 (31.03%), 21 (36.84%) and 19 (32.75%) patients respectively, whereas among the control group (n = 52) was 4 (7.6%), 35 (67.30%) and 13 (23.07%) respectively as observed in (table 2), (figure 1). The difference of D and I allele genotypes in ACE gene was highly significant between patients and control (P = 0.021). This intensely showed that DD genotype patients have a high chance of renal failure progressing OR = 3.49 (95%CI = 1.56-7.93). Moreover, the pooling of ID with II genotypes v/s DD genotype showed the genotypes comparison were significantly different between patients and control (P = 0.001) with high-risk in patients with DD genotype OR 5.874 (95%CI = 3.71- 8.80). Also, when pooling ID with DD genotypes v/s II genotype, the (P=0.001) and OR continued high OR= 3.58 (95%CI = 2.01-6.81). So, the difference between D and I allele between two groups was significant (P =0.021) with high OR =3.49 (95%CI 1.56-7.93) as shown in table 2.

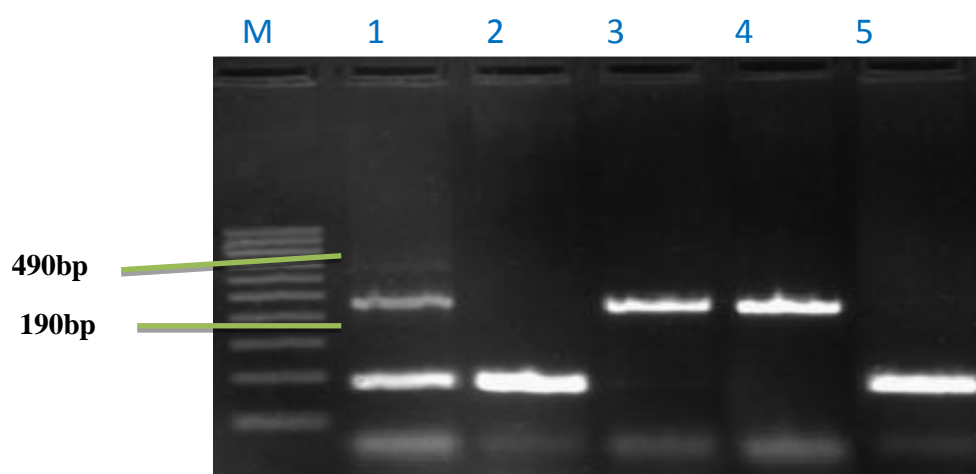


Figure 1: PCR products of ACE gene I/D polymorphism. Lane (M) is 100 bp DNA Ladder. (A): The DD genotype (190 bp, Lanes 2 and 5), the ID genotype (490 bp, 190 bp, Lane 1), the II genotype (490 bp, Lane 3 and 4).

Table 2: Distribution of ACE I/D genotypes among renal failure patients and controls

		Patients (n=58)	Control (n=52)
Genotypes	DD	18(31.03%)	4 (7.6%)
	II	21(36.84%)	35(67.30%)
	ID	19(32.75%)	13(23.07%)
Comparison of different ACE gene polymorphism			
		P-value	OR(95% CI)
	D v/s I	=0.021	3.49(1.56-7.93)
	DD v/s ID+II	=0.001	5.87(3.71-8.80)
	DD+ID v/s II	=0.001	3.58(2.01-6.81)



4-3 Correlation between serum ACE level with (I/D) ACE polymorphism:

Remarkably, the level of ACE enzyme in serum was well associated with I/D polymorphism in ACE, with a prominent effect of the DD alleles. ACE level was observed to be higher in patients with DD alleles than in patients with the II+ DI alleles ($p=0.015$) as illustrated in table 3.

Table 3: Correlation between serum ACE level with (I/D) ACE polymorphism

	DD (n=18)	II+ID (n=40)	P-value
ACE activity (IU/I)	79.11 \pm 25.07	41.23 \pm 20.91	0.015

Discussion

Progression of renal disease resulted from the interplay of multiple genetic and environmental factors, so, it regarded as a multifactorial disease. Genetic variations can be utilized as a marker to distinguish the people at risk level. Numerous studies have been achieved to distinguish genetic risk causes that stimulate different diseases [10]. The ACE has a vital role in both renal and cardiovascular pathophysiology. The ACE gene variations occur in intron 16. This variation is divided into three kinds: insertion homozygotes II, deletion homozygotes DD and heterozygotes ID [11].

The result of this study revealed that the difference in DD and II genotypes in ACE gene was significant between renal failure patients and control with a high Odd ratio (Risk ratio) in patients with DD genotype. So, the frequencies of DD genotype were significantly increased in patients than control when compared with other genotypes. This result is agreement with several studies like the result of Ali *et al.* that concluded that the repetition of the D allele was higher (42.40%) in end-stage renal disease (ESRD) patients than healthy control persons (31.05%) in the Malaysian population [12]. Other study conducted on Egyptian population showed that the frequencies of DD genotype were increased significantly, while incidences of ID genotype were decreased significantly in the ESRD patients than control with high Odd ratio in patients with DD genotype in ACE gene. So, in the Egyptian population, ACE DD genotype considered as a risk factor for ESRD occurrence [13].

In another studies conducted on Asian population by Tripathi *et al.* [3], Palomo-Pinon *et al.* [14] and Nagamani *et al.* [15], they observed that the DD genotype in ACE gene is the risk factor for the progress of renal failure in Asian people with this disease than healthy individuals with highly significant differences and high Odd ratio in patients with this genotype. Also, The result of this study was accordance to other study demonstrated in Asian and Caucasian individuals [16]. In contrast to those studies, there was a study by Pereira *et al.* failed to confirm the hypothesis that I/D gene variation in ACE has a considerable role in the renal failure risk [17]. Also, the study by Beige *et al.* recorded that there was no correlation between DD genotype in ACE and ESRD, nephropathy respectively [18].

The current study showed that the level of ACE enzyme in serum was increased significantly in renal failure patients than control. This result accordance with the result of Settin *et al.* who documented that the physiological value of I/D variation in the ACE gene is correlated with the activity of ACE enzyme in serum [19]. The DD polymorphism in a person is related with two-fold elevated ACE activity in serum, while the ACE enzyme expression in serum lowest in individuals with II genotype. Furthermore, Elshamaa *et al.* showed a high level of ACE in patients with chronic kidney disease who have DD genotype in ACE gene [20].



The mechanism valuing for the increase of serum ACE level in DD homozygote individuals is unknown. Because the ACE polymorphism is existing in an intron, it may be attributed to disequilibrium with a functional variant of the ACE gene or suppress transcription of ACE gene [21]. DD genotype has been revealed to be associated with the elevation of serum ACE level because elevated ACE protein expression, as a result, the plasma angiotensin II level is increased that stimulates podocyte injury and loss of it which considered as a hallmark of advancing kidney disease [22].

The RAS has been linked with different types of renal diseases. Individuals have DD alleles of ACE gene show increased serum ACE level, therefore may have higher RAS activation. So, carriers of D allele are exposed to a higher level of angiotensin II than carriers of other alleles. As known, angiotensin II participates directly in accelerating kidney damage by supporting cell growth, fibrosis, and inflammation. Hence, when a person has D allele in its ACE gene, more rapid deterioration in renal function is determined than in its absence [23]. Changes in RAS activity is correlated with aging. The participation of molecular and cellular factors and consequent aggregation extracellular matrix compounds with the upgrowth of kidney fibrosis are tightly associated with the renal damage progression as a result of aging [24]. In addition, elevation of ACE activity causes increasing of Angiotensin II levels that enhance growth factors expression and proliferation of mesangial cells and matrix leading to glomerulosclerosis [25]. D allele in the homozygous state of the ACE gene might accord high risk of renal diseases progress. Also, D allele in heterozygous ID state has a high risk of renal failures because of intermediate levels of ACE production in this state. Consequently, the DD genotype and D allele in ACE was correlated with renal ESRD [26].

Obviously, ACE polymorphism is correlated with renal and also cardiovascular diseases; this polymorphism changed the activity of serum ACE and supposed to occur via the pro-inflammatory mechanism. DD genotype Individuals have a twice of serum and tissue ACE levels as individuals with II genotype while ID individuals have intermediate levels. The harmful effect of the deletion polymorphism in this gene on kidney may be an explained by increasing of intra-renal angiotensin II formation and/or insufficient ACE in DD genotype individuals. Consequently, the absence or presence of a 287-bp repeat sequence at intron 16 regarded as a prevalent marker in susceptibility to renal failure occurrence [27].

The present study exposed that the II genotype was increased in healthy controls individuals than in renal failure patients. The lower level of ACE enzyme in this genotype promotes the reduction in glomerular pressure, tubular damage and scarring, and proteinuria that causes a delay of disease progression to a renal failure at the end stage. Another mechanism which interpreted less end stage renal failure outcome in patients with II genotype may be in the control of TGF- β level [28].

Conclusions:

The present study concluded that the meeting of the DD alleles in the ACE gene in the same renal failure patients may lead to this disease, while the assembly of II alleles in the same person may save him against the disease, this revealed ACE gene has greater role in genetic variation as well as prognostic marker for detection of CKD. So, the molecular study could be considered as a reliable technique for early detection and prediction of this disease because it depends on gene level.

References:

- 1-Agrawal S, Khan S, Pandey A, Tripathi M, Herrera RJ. Signature of an African-Middle Eastern migration into northern India. *Curr Sci* 2005; 88:1977-1980.
- 2-Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphism of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new finding and meta-analysis of data. *BMC Nephrol* 2005;6:1.



- 3-Tripathi G**, Dharmani P, Khan F, Sharma RK, Pandirikkal V, Agrawal S. High prevalence of ACE-DD genotype among North Indian end stage renal disease patients. *BMC Nephrol* 2006;7:15.
- 4-Ozaki R**. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in type 2, diabetic patients interaction with ACE insertion/deletion polymorphism. *Kidney Int* 2006; 69: 1438-1443.
- 5-Zhou T**, Yin S, Qin Y. Association between angiotensin converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and end-stage renal disease susceptibility. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2012;1-10.
- 6-Frank C**. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 2008; 9 (4): 245-254.
- 7-Buraczynska M**, Ksiazek P, Drop A, Zaluska W, Spasiewicz D, Ksiazek A. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(4):979-983.
- 8-Manikandan T**, Madar I, Priyadarshan K, Shyam K, Kumar A. Polymorphism of Angiotensin I converting enzyme become an innate property in renal failure. *Int J Pharma & Bio Sci* 2010;1(2):1-6.
- 9-Losito A**, Kalidas K, Santoni S, Ceccarelli L, Jeffery S. Polymorphism of renin-angiotensin system genes in dialysis patients–association with cerebrovascular disease. *Nephro Dial Transplant* 2002, 17:2184-2188.
- 10-Nakayama Y**, Nonoguchi H, Kohda Y, Inoue H, Memetimin H, Izumi Y, Nikzamir A, Nakhjavani M, Golmohammadi T, Dibai L, Saffary R. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and ACE activity in type 2 diabetic patients. *Acta Medica Iranica* 2008; 46(4):277-282.
- 11-Nikzamir A**, Nakhjavani M, Golmohammadi T, Dibai L, Saffary R. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and ACE activity in type 2 diabetic patients. *Acta Medica Iranica* 2008; 46(4):277-282.
- 12-Ali A**, Vasudevan R, Ismail P, Thiam Seong C L & Chakravarthi S. Analysis of insertion/deletion polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in Malaysian end-stage renal disease patients. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2015; 16(4), 1337-1343.
- 13-Abdel-Aziz A F**, Afaf E S, Khaled E D & Basma A L. Association of Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Insertion/Deletion Gene Polymorphism with End Stage Renal Disease in Egyptian Patients. *British Journal of Medicine and Medical Research* 2014; 4(8): 1763.
- 14-Palomo-Pinon S**, Gutierrez-Rodriguez ME, Diaz-Flores M, Sanchez- Barrera R, Valladares-Salgado A, Utrera-Barillas D. DD genotype of angiotensin-converting enzyme in type 2 diabetes mellitus with renal disease in Mexican Mestizos. *Nephrology (Carlton)* 2009; 2:235–239.
- 15-Nagamani S**, Perumal M S, Perumal R L, Kesavan C & Muthusamy K. ACE DD genotype associated with the female Chronic Kidney Disease patients of Tamilnadu population. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2015; 16(1):29-33.
- 16-Lin C**, Yang HY, Wu CC, Lee HS, Lin YF, Lu KC. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes high risk for chronic kidney disease in Asian male with hypertension – a meta regression analysis of 98 observational studies. *PLoS One* 2014; 1:e87604.
- 17-Pereira TV**, Nunes CF, Rudnicki M, Magistrone R, Albertazzi A, Pereira A C. Influence of ACE I/D gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis 2006;21(11):3155-3163.



18-Beige J, Schere S, Weber A. Angiotensin converting enzyme genotype and renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1319–1323.

19-Settin A, Elbaz R, Abbas A, Abd-Al-Samad A, Noaman A. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in Egyptian patients with myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2009; 10: 96–100.

20-Elshamaa M F, Sabry S M, Bazaraa H M, Koura H M, Elghoroury E A, Kantoush N A, Abd-El Haleem D A. Genetic polymorphism of ACE and the angiotensin II type1 receptor genes in children with chronic kidney disease. *J Inflamm* 2011; 8(1), 20.

21-Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86:1343–1346.

22-Campbell KN, Raij L, Mundel P. Role of angiotensin II in the development of nephropathy and podocytopathy of diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 2011; 7: 3–7.

23-Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Gomez-Guerrero C. Angiotensin II, the immune system and renal diseases: another road for RAS. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1423–1426.

24-Floege J, Burns MW, Alpers CE. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int* 1992; 41:297–309.

25-Mitch WE. Is the inherited ACE genotype a trump or a joker. *J Clin Invest* 1995; 96:2100-2101.

26-Gheissari A, Salehi M, Dastjerdi SB, Jahangiri M, Hooman N, Otookesh H, Merikhipour A, Ajir A, Foroughmand A, Khatami S, Shahidi S, Atapour A, Seirafian S, Naeini AE. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the progression rate of focal segmental glomerulosclerosis in Iranian children. *Nephrology (Carlton)* 2008; 13:708-711.

27-Yoshida H, Kuriyama S, Atsumi Y, Tomonari H, Mi-tarai T, Hamaguchi A, Kubo H, Kawaguchi Y, Kon V, Matsuoka K, Ichikawa I & Sakai O. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1996; 50: 657–664.

28-Ramachandran V, Patimah I, Johnson S, Norashikin S, Saidi M, Rusni MJ. Association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus in Malaysian subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2008; 9: 208.

Polymorphism Pattern of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Gene in the Chronic Renal Failure Patients

* Huda Rafaa Sabbar ; **Omar Abdulkareem Ali ; ***Fazea Oleiwi Naser

* *Ph.D. Medical Microbiology/ College of Medicine/ University of Anbar*

** *MSc. Medical Microbiology/ College of Medicine/ University of Anbar*

****Higher diploma. Internal Medicine / Ministry of Health/ Iraq*

Abstract

Genetic variability in the genes of different components of renin system (RAS) is likely to contribute for its heterogeneous association in the renal disease patients. The angiotensin converting enzyme (ACE) gene consists of either an insertion (I) allele or a deletion (D) allele that form three possible genotypes: II, ID or DD. This study was aimed to detect if there is a relation of genetic factors changes as ACE polymorphism in the progression of patients to the End stage renal disease (ESRD):

Blood samples were obtained from 100 Patients suffering and 50 samples as control groups. Blood was collected in tube containing EDTA; DNA was extracted from the samples by wizard genomic DNA purification kit, (Promega) according to the "Isolating Genomic DNA from whole blood protocol". The volume of the extracted DNA solution was usually 100 µl were stored at -20 °C.

The results show the DD genotype percent was found to be high in the patients group 56%, followed by ID 28% then II genotype 16%. While in the control group the results were DD 34%, II 30%, ID 36%. There was a significant difference between patients and control group in DD (P value was 0.0019 and odd ratio 2.47) while II genotype the (P value 0.02 and Odd ratio 0.44), in the ID genotype there was no significant difference (P value >0.05). There was no relation between the cofactors of chronic renal failure disease and ACE polymorphism P value for all was > 0.18. Also there was no relation between gender and the ACE polymorphism (P value was > 0.05).

In most studies in spite of the percent of alleles distribution, they found that DD allele was mostly related to the progression of patients to ESRD. Although all our patients in ESRD, the large proportion of present patients had DD, which may be related to progression of patients to the end stage renal disease (ESRD).

Key words: ACE, Polymorphism, ESRD

INTRODUCTION

The angiotensin converting enzyme (ACE) was encoded by a 21 Kb gene that consists of 26 exons and located on chromosome 17q23. A polymorphism of the ACE gene engross the insertion (I) or deletion (D) of a 287 bp AluYa5 repeat sequence inside intron (1). Though I/D polymorphism is located in a non-coding region of the ACE gene it is not quiet and that the D allele was related with increased activity of ACE in serum (the highest serum ACE activity was seen in the DD genotype while the lowest seen in II genotype) (2). ACE gene consists of either an insertion (I) allele or a deletion (D) allele that form three possible genotypes: II, ID or DD (3).

Rigat *et al.* (4) noted that the inter individual difference in plasma ACE activity was related to an insertion/ deletion polymorphism in an intron of the ACE gene; individuals homozygous for the shorter or deleted (DD) gene had the highest values of serum ACE activity compared with subjects with the longer or inserted (II) gene. Heterozygous individuals (ID) articulated intermediate serum ACE activities. It was reasoned that the D allele and a higher ACE activity could be associated with more extensive kidney damage (5).

DD homozygotes also have higher tissue levels of ACE. The ACE I/D gene polymorphism, correlate with circulating ACE concentration, has been concerned in the etiology of ESRD and has been investigated in several epidemiologic studies at present (6). Development of renal disease in the ESRD population was manipulated by the ACE polymorphism. The time from diagnosis to the beginning of ESRD was shorter in the existence of the ACE-DD than ID or II alleles.

The ACE gene I/D polymorphism may be important determinant of the reno or renal protective efficiency of ACE inhibitor treatment in independent diabetes mellitus (IDDM) patients. Those with the II genotype had a greater rate of progression of albumin excretion rate (AER) in the absence of ACE inhibitor treatment, patients in this group also had the greatest response to ACE inhibitors in terms of slowing the progression of AER, and those with the DD genotype were the most resistant (7). Thus, a concern must be taken during the treatment of these patients with

these drugs. In the present study, we had not been capable to assume the association of ACE inhibition and DD genotype due to non-availability of the information of anti-hypertensive therapy consumed by the patients in this study. The Renin-Angiotensin system (RAS) is a key regulator of both blood pressure and kidney functions and may play a role in their relations. Its role in the pathogenesis of hypertension is well documented but its contribution to chronic renal failure and progression of kidney nephropathy is still debated (8, 9).

MATERIAL AND METHODS

1- Samples Collection & DNA Extraction: Blood samples were obtained from 100 patients with ESRD and 50 as control groups. Blood was collected in tube containing EDTA; DNA was extracted from the samples by wizard genomic DNA purification kit, (Promega) according to the "Isolating Genomic DNA from whole blood protocol". The volume of the extracted DNA solution was usually 100 µl were stored at -20 °C.

2- Estimation of Purity

DNA samples were quantified by ultraviolet spectrophotometer (Unico, USA) reading at 260 and 280 nm (10). All samples were stored at -20 °C until use.

3- Amplification :

The specific segment of ACE gene was amplified by polymerase chain reaction

(PCR) using the specific primers :

ACE-F (5-TGGAGACCACTCCC ATCCTTTC-3) and

ACE-R (5-GATGTGGCCATCACATTTCGTCAGAT-3).

The PCR amplification was performed in a total volume of 25 µl containing:

- 5µl DNA (conc. 20 ng), 12.5 µl of 2X Go Taq green master mix. , 2.5 µl of ACE-F primer., 2.5 µl of ACE-R primer., 2.5 µl of Nuclease free water .

PCR tubes were closed and transferred into the thermal-cycler when reach temperature reach 95 C° and start the amplification program. The reaction was performed in: 4 min of initial denaturation at 94°C, followed by 32 cycles of 30 s at 94°C, 30 s

at 57°C and 1 min at 72°C and one cycle of 10 min at 72°C as a final extension.

4- Result Analysis:

Analysis of PCR results were based on the presence of specific bands of DD, ID and II genotypes. These identified by the presence of a single 190 bp, this represent the DD homozygous. The homozygous for I allele (II genotype) was identified by the presence of single 490 bp PCR product while the heterozygous individuals (ID genotype) were identified by the presence of both 190bp and 490bp PCR products as showed in post PCR gel electrophoresis.

RESULTS:

1- Pre-PCR Result

After the extraction of DNA, the purity of all samples were assessed and mean levels were found to be (1.4) .The gel electrophoresis for extracted DNA was done to ensure the presence of DNA in the extracted samples and the result was shown in Figure 1.

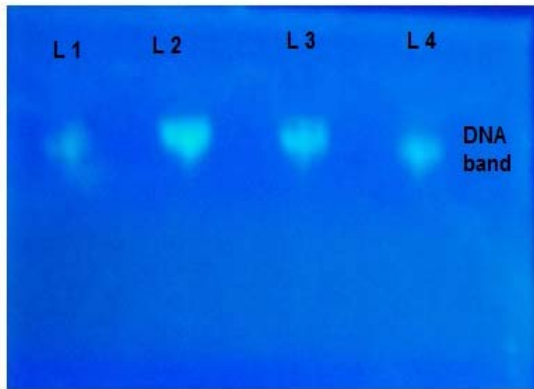


Figure 1. Pre-PCR bands of extracted DNA.

2. Polymerase Chain Reaction

The PCR result showed that, the homozygous individuals for the D allele (DD genotype) was identified by the presence of a single 190 bp PCR product. The homozygous for I allele (II genotype) was identified by the presence of a single 490 bp PCR product while the heterozygous individuals (ID genotype) was identified by the presence of both 190 and 490 bp PCR products as shown in Figure (2).

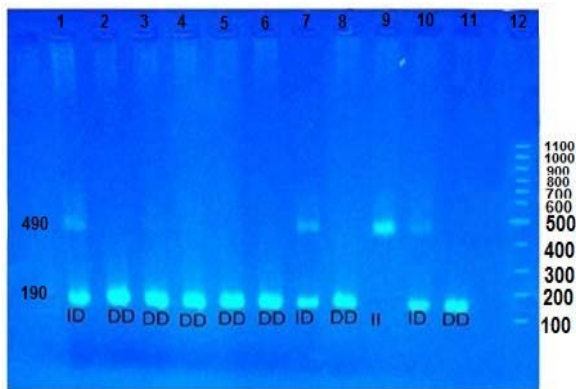


Figure 2: Homozygous DD, homozygous II and heterozygous ID genotype, lane 1,7,10: heterozygous ID, lane 2,3,4,5,6,11: homozygous DD, lane 9: homozygous II, lane 12: DNA ladder.

3. Distribution of Patients According to Angiotensin converting enzyme Polymorphism

The DD genotype percent was found to be high in the patients group 56%, followed by ID 28% then II genotype 16% .While in the control group the results were DD 34%, II 30%, ID 36%. There was a significant difference between patients and control group in DD(P value was 0.0019 and odd ratio 2.47) while II genotype the(P value 0.02 and Odd ratio 0.44), in the ID genotype there was no significant difference (P value >0.05) as shown in Table 1 and Figure 3.

Table 1. The distribution of ACE genotype frequency in the patients and controls group

Genotypes frequency percent	Patients % N (100)	Control % N (50)	P value	OR
DD	56%	34%	0.0019	2.47
ID	28%	36%	>0.05	0.69
II	16%	30%	0.02	0.44

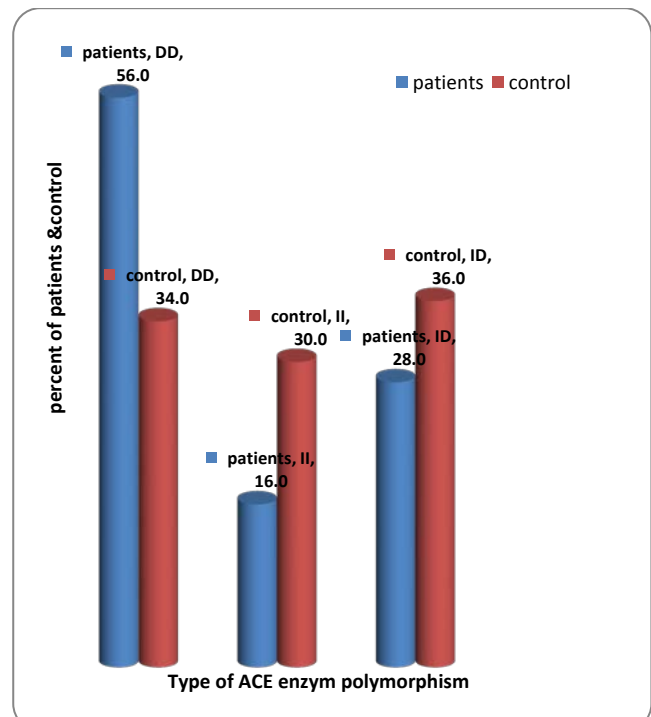


Figure 3. Distribution of patients according to ACE polymorphism.

4. Relation between Angiotensin Converting Enzyme Polymorphism and Cofactors of Disease and the Gender.

There was no relation between the cofactors of chronic renal failure disease and ACE polymorphism P value for all was > 0.18 as shown in Table 2. Also there was no relation between gender and the ACE polymorphism (P value was > 0.05).

Table 2. Relation of ACE polymorphism with cofactors of disease

Cofactors	Chi- square value	P value
Hypertension	4.900	0.179
Diabetes mellitus	0.655	0.884
Urolithiasis	0.77	0.81
Other causes	1.704	0.636

DISCUSSION:

The present study showed that DD genotype was (56%) more frequent in the patients than other, followed by ID (28%) and II (16%). There was significant difference between patients and control in DD and II genotypes. This finding was in agreement

with Al-Awadi *et al* (11), who found that DD was predominant between population within other different diseases. Also agreed with Tripathi *et al* (9) in the presence of significant difference between patients and control in DD and II but not in percent of genotypes frequency. Also agreed with Mclaaughlin *et al* (12) who found that high prevalence of DD among patients with renal disease. The present study not consistent with Samuelsson *et al* (13) and Choudhry *et al* (14) in the distribution of DD, ID and II percent in patients of renal disease. This inconsistency could be in part due to the genetic and environmental heterogeneity among different ethnic groups, or may be caused by methodological differences or may be due to small sample sizes of population in the study.

In most studies in spite of the percent of alleles distribution, they found that DD allele was mostly related to the progression of patients to ESRD (9, 11, 12). Although all our patients in ESRD, the large proportion of present patients had DD, which may be related to progression of patients to the end stage renal disease (ESRD). This progression was indicated by many studies (9, 11, 12). However, disagreed with Choudhry *et al* (14). This progression may occur because the DD homozygotes had higher tissue levels of ACE and the ACE I/D gene polymorphism, correlating with circulating ACE concentration, has been implicated in the etiology of ESRD and has been investigated in numerous epidemiologic studies (15).

The phrase is repeated in the introduction. Those with the II genotype had a greater rate of progression of albumin excretion rate (AER) in the absence of ACE inhibitor treatment, patients in this group also had the greatest response to ACE inhibitors in terms of slowing the progression of AER, and those with the DD genotype were the most resistant (16). Therefore, a consideration must be taken during the treatment of these patients with these drugs. In the present study, we had not been able to deduce the association of ACE inhibition and DD genotype due to non-availability of the information of anti-hypertensive therapy consumed by the patients in this study.

Also ACE DD genotype was a known risk factor of cardiovascular diseases, including coronary heart disease and left ventricular hypertrophy, and that the latter was a strong predictor of the mortality in dialysis patients (17).

There was no significance difference between male and female in ACE polymorphism, this not confirm with Al-Awadi *et al* (11) and Samuelsson *et al* (13). This disagreement may be due to that the male patients in this study were older than female. DD allele may be depleted in older patients with cardiovascular disease (12). There was no relation between gene polymorphism and the type of disease, even with patients having the same allele frequency, in-spite of that patients had the DD and hypertension were more than the hypertensive patients without DD allele (35:21),

This difference was not significance. This result was not consistent with Al-Awadi *et al* (11) and Samuelsson *et al* (13) who found that most hypertensive patients had DD allele and this may be due to the inhomogeneous population, therefore, the large number of each type of disease must be involved to determine the presence of such relationship.

REFERENCES

- 1- Michel MC, Bohner H, Koster J, et al(2004). Safety of telmisartan in patients with arterial hypertension: an open label, observational study. *Drug Safety*, ; 27:334-335.
- 2- Sakuma T, Hirata R D and Hirata M H.(2004) Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. *J Clin Lab Anal*, ;18: 309-316.
- 3- Rigoli L, Chimenz R, di Bella C, et al.(2004) Angiotensin-converting enzyme and angiotensin type 2 receptor gene genotype distributions in Italian children with congenital uropathies. *Pediatr Res*, ;56: 988-993.
- 4- Rigat B.; Hubert P. and Corvol P.(2009) PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl 1 carboxy peptidase. *Nucleic Acids Res*, 20:1433-1439
- 5- Yu J, Kuznetsova T, Thijs L, et al.(2011) Association of echocardiographic left ventricular structure with the ACE D/I polymorphism: A meta-analysis. *J RAS*, ; 12: 243-253.
- 6- Yoshida H, Kon V, Ichikawa I. Polymorphism of the renin-angiotensin system genes in progressive renal disease. *Kidney Int.*, 1996;50:732-744.
- 7- Penno G, Chaturvedi N, Talmud Ph J, et al.(1998) Effect of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Gene Polymorphism on Progression of Renal Disease and the Influence of ACE Inhibition in IDDM Patients. *Diabetes*, ; 47: 1507-1510.
- 8- Mondry A, Loh M, Liu P, et al .(2005) Polymorphism of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new finding and meta-analysis of data. *BMC Nephrol*, ; 6:1.
- 9- Tripathi G , Dharmani P, Khan F, et al.(2006) High prevalence of ACE DD genotype among north Indian end stage renal disease patients.*BMC Nephrol*, , 7:15
- 10- Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T.(1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed., cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York 1 .
- 11- Al-Awadi SJ, Ghareeb AM, Oleiwi AA et al.(2006) Genotype Distribution of Angiotensin I- Converting Enzyme in Iraqi Arab Population. *Iraqi J of Can and Med Genet*, ; 4(2): 24-29.
- 12- Mclaaughlin KJ, Harden PN, Ueda Sh, et al.(1996) The Role of Genetic Polymorphisms of Angiotensin-Converting Enzyme in the Progression of Renal Diseases.*Hyper*, 1 ; 28 (5): 912-915.
- 13- Samuelsson O, Attman P, Larsson R, et al.(2000) Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in non-diabetic renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, ;15: 481-486.
- 14- Choudhry N, Nagra SA, Shafi T et al.(2012) Lack of association of insertion/deletion polymorphism in angiotensin converting enzyme gene with nephropathy in type 2 diabetic patients in Punjabi population of Pakistan. *African J of Biotech*, ; 11(6): 1484-1489.
- 15- Zhou T , Yin Sh and Qin Y.(2014) Association between angiotensin converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and end stage renal disease susceptibility. *J Re-Ang- Ald Sys*, ;15(1): 22-31.
- 16- Penno G, Chaturvedi N,Talmud PJ et al.(1998) Effect of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)Gene Polymorphism on Progression of Renal Disease and the Influence of ACE Inhibition inIDDM Patients. *Diabetes*, ; 47: 1507-1510.
- 17- Yoshida H, Kuriyama S, Atsumi Y et al.(1996) Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Inter*, ; 50: 657-664.

RESEARCH ARTICLE

The Association of Angiotensin-converting Enzyme (*ACE*) Gene polymorphism and Some Biomarkers in Hemodialysis Patients

Maysaa A Hadi,¹ Ali H Al. Saadi,² Wisam A A Rady³

University of Babylon, College of Sciences, Dept. of Biology/Iraq

Received: 06th July, 19; Revised: 09th August, 19, Accepted: 08th September, 19; Available Online: 25th September, 2019

ABSTRACT

The Aim: Chronic kidney disease (CKD) is clarified by constant structural abnormalities, urine abnormalities, or damaged excretory renal function indicative of a failure of functional nephrons. One of the treatments for renal failure is hemodialysis. The aim was assessing the potential association between *ACE* gene I/D polymorphism with renal failure and their correlation with some biochemical parameter as Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and symmetric dimethyl arginine (SDMA) and kidney function test (KFT) “urea” and “creatinine” in Iraqi hemodialysis patients.

Materials and Methods: The study was contained 60 hemodialysis patients (30 Male and 30 Female). The control group was 30 healthy subjects (15 Male and 15 Female). The ages of hemodialysis patients and control groups ranged between (11–75 years). The information was taken from a questionnaire which included age, sex, smoking, duration of disease, duration of dialysis, number of dialyzes, other diseases, and family history. Also, body mass index (BMI), urea, creatinine, IGF-1, and SDMA were measured. After extraction of DNA from white blood cells and carrying out of PCR, characterizing *ACE* I/D polymorphism by applying an amplification refractory mutation system (ARMS) technique.

Results: The demographic study showed that there were more hemodialysis patients had age ≥ 50 years old (40%) when compared with the control group. The most hemodialysis patients had BMI were 18–24.9 (48.33%) in comparison with the control group, which was 18–24.9 (100 %). The smoking percentage was (16,67%) in hemodialysis patients compared to the control group (10%). The presence of another disease in the hemodialysis patients were hypertension (70 %) followed by diabetes mellitus (25 %), arthritis (23.33%), and cardiovascular disease (20 %). Concerning a family history of CKD, (25%) of hemodialysis patients have a family history while the family history of the control group was (6.67%). In the hemodialysis patients, the genotype I/I, I/D, and D/D distribution percentage were 18.33 %, 65 %, and 16.67% respectively compared with the control group which was 33.33 %, 36.67%, and 30% respectively.

Conclusion: There was a high association between heterozygous genotype (I/D) with the occurrence of CKD. Serum urea level increased in hemodialysis patients had ID genotypes in comparison with II and DD genotypes. Also, IGF-1 and SADMA have importance as a risk factor or prognosis indicator in adult CKD hemodialysis patients.

Keyword: *ACE* gene polymorphism, ARMS, Hemodialysis, IGF-1, Iraq, SDMA.

International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance (2019); DOI: 10.25258/ijpqa.10.3.3

How to cite this article: Al-Amer Rady, W.A. (2019). The Association of *ACE* Gene polymorphism and Some Biomarkers in Hemodialysis Patients. International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance 10(3): 121-130.

Source of support: Nil

Conflict of interest: None

INTRODUCTION

The (CKD) is a syndrome clarified as constant modifications in the function, the composition of kidney or both with a consequence for the health of the individual.¹ Kidneys in good health make clean blood and eliminate extra fluid in the shape of urine. As well, they synthesize hormones which necessarily for some important functions of the body. If the failure of the kidney takes place, treatment is essential to replace some of the essential functions of kidneys. There are five stages of CKD, and the stage of kidney disease is determined by dependence on the existence

of damage in kidney and measurement of kidney function level by *glomerular filtration rate (GFR)*. The first stage is damage of kidney (e.g., protein in the urine) accompanied by a normal GFR “90” or above, the second stage is damage of kidney with mild decline in GFR “60” to “89”, the third stage is moderate decline in GFR 30 to 59, the fourth stage is severe reduction in GFR 15–29 and the final stage is kidney failure or end-stage renal disease when the GFR little than 15.²

IGF-1 is a polypeptide hormone consisting of 70 amino acid with a partial weight estimated at 7,649 Dalton.³ Growth hormone (GH) secretes by the anterior pituitary gland that

* Author for Correspondence: wisamabedamer@gmail.com

acts on the liver to IGF-1 synthesis then function on bone and kidney to intermediate longitudinal growth.⁴ In addition, IGF-1 is fundamental for growth, cell differentiation, development, survival, and proliferation besides metabolic influence similar to insulin in the main cell and tissues kinds. Specifically, IGF-1 is influential for the normal pre- and postnatal progression of the kidney. Also, IGF-1 intermediates numerous GH activities and both GH deficiency and excess are connected with the disturbed function of kidney and influence hemodynamics of kidney both indirectly and directly by interaction with the renin-angiotensin system (RAS).⁵

Symmetric dimethylarginine (SDMA) is a product from catabolism of arginine methylated proteins and was revealed as kidney function biomarker⁶ and it is supposed uremic toxins that may cause toxicity by many mechanisms, involving a damaged synthesis of nitric oxide and reactive oxygen species generation.⁷ In hemodialysis patients with kidney diseases, SDMA is elevated and related with GFR. Additionally, it is related to raised mortality in the general population.⁸

Angiotensin-converting enzyme (ACE) encoded by a single gene existing on chromosome 17 at q23. The length of the ACE gene is 21 kb and includes 25 introns and 26 exons⁹ and is one of the influential genes included in the RAS. In cardiovascular disease (CVD), the RAS is increased and has been hypothesized to impart to the progression of CKD,¹⁰ and is an influential modulator for kidney disease and blood pressure.¹¹

MATERIALS AND METHODS

The study was contained 60 hemodialysis patients (30 Male and 30 Female) from Merjan hospital in Babylon Province/Iraq. The control was 30 healthy subjects (15 Male and 15 Female). The ages of hemodialysis patients and control were 11–75 years. The information was taken from a questionnaire which included age, sex, weight, length, smoking, duration of disease, duration of dialysis, number of dialyzes, other diseases, and family history. Also, BMI was measured, and the biochemical study included IGF-1 (Elabscience ELISA Kit), SDMA (Bioassay technology Sandwich ELISA Kit, urea, and creatinine levels (BioMérieux ELISA Kits). The genetic research includes DNA extraction according to the Favorgene Biotech Kit for extraction of DNA from white blood cells. Genotyping of ACE gene polymorphism was observed by polymerase chain reaction (PCR) applying the amplification refractory mutation system (ARMS) technique.

For polymorphism (I/D) for ACE gene, a sense primer 5'GACCTGCTGCCTATAGACT3' and anti-sense primer 5'GGGTAAACTGGAGGATGGGT3' that developed a 521 bp band for *I* and 233 bp band for *D*¹². In case of a heterozygote, both 233 bp and 521bp bands must be noticed. To preventing mistyping of the DD genotype, an additional specific pair of primer for *I*: a sense primer 5'GATTACAGGCGTGATACAGT3' and antisense primer 5'GGGTAAACTGGAGGATGGGT3' were utilized.

Statistical Analysis

The Statistical Package for Social Science (SPSS), version 23 was employed to the analysis of different biomarkers in the study. Chi-square analysis was utilized to a comparison between percentage and analysis of variance (ANOVA), least significant (statistically accepted) difference and Duncan test or t-Test was employed to a comparison between means. The correlation coefficient between variables in this study also estimated.

RESULTS

The results of the demographic study recorded that the percentage of hemodialysis patients age group ≥ 50 years old was higher (40.0%) compared to the control group which was equal (33.33%) for different age groups. The ratio between males and females was equal in patients and control groups, and there were no significant differences between them in age and smoking. Differences between hemodialysis patients and control groups were significant ($p \leq 0.01$) in BMI where the most hemodialysis patients were in 18–24.9 (48.33%) in comparison with the control group (100%). Regarding the presence of a history of previous CKD (OR = 4.67; 95% CI: 0.99–21.97), (25.0%) of hemodialysis patients have a family history in comparison with the control group (6.67%). Also, the presence of another disease in hemodialysis patients were hypertension (70%) followed by diabetes mellitus (25%), arthritis (23.33%), and cardiovascular disease (20%) as displayed in Tables 1 and 2.

This study showed significant differences ($p \leq 0.01$) in urea and creatinine between hemodialysis patients and the control groups (Figure 1 A and B) and there were significant differences for IGF-1 and SDMA ($p \leq 0.05$) as shown in (Figure 1 C and D). When comparing hemodialysis patients and controls groups in age and BMI, there is a significant difference in the BMI ($p \leq 0.05$) only Table 3.

Statistical analysis of biochemical parameters in hemodialysis patients according to age, there was a significant decrease in IGF-1 and significant increase ($p \leq 0.05$) in SDMA in 31–49 years group (Table 4) and there is a significant elevation in SDMA in 18–24.⁹ category according to the BMI group as shown in (Table 5).

The impact of duration of disease on biochemical parameters of hemodialysis patients showed a significant decline ($p \leq 0.05$) in IGF-1 when the duration of CKD increased and nonsignificant accepted increment ($p < 0.05$) in SDMA when the duration of CKD increased (Table 6). Also, significant increment ($p \leq 0.05$) in SDMA with increased the duration of dialysis (Table 7), while according to the number of dialyzes, there is significant elevation ($p \leq 0.05$) in creatinine, IGF-1, and SDMA (Tables 8). The study of the effect of sex in biochemical parameters showed a significant difference ($p \leq 0.05$) in creatinine level only between male and female (Table 9).

The correlation coefficient between parameters in hemodialysis patients showed a significant correlation between

Table-1: Demographic characteristics of hemodialysis and control groups.

<i>Variables</i>	<i>Control group</i>	<i>Hemodialysis group</i>
<i>Total Number</i>	<i>30 (%)</i>	<i>60 (%)</i>
Age (years)		
(≤ 30) years	10 (33.33%)	14 (23.33%)
(31–49) years	10 (33.33%)	22 (36.67%)
(≥ 50) years	10 (33.33%)	24 (40.0%)
Sex		
Male	15(50.0%)	30(50.0%)
Female	15(50.0%)	30(50.0%)
BMI Kg/m ²		
Underweight < 18	0 (0%)	5 (8.33%)
Normal weight 18-24.9	30 (100%)	29 (48.33%)
Overweight 25–29.9	0 (0%)	16 (26.67%)
Obesity 30–39.9	0 (0%)	10 (16.67%)
Family history		
Present	2 (6.67%)	15 (25.0%)
Absent	28 (93.33%)	45(75.0%)
Smoking		
Yes	3(10.0%)	10(16.67%)
No	27(90.0%)	50(83.33%)
Hypertension		
Present	0	42 (70.0%)
Absent	0	18 (30.0%)
Diabetes mellitus		
Present	0	15 (25.0%)
Absent	0	45 (75.0%)
Arthritis		
Present	0	14 (23.33%)
Absent	0	46 (76.67%)
Cardiovascular disease		
Present	0	12 (20.0%)
Absent	0	48 (80.0%)

Table 2: The association of study groups by different variables

<i>Variables</i>	<i>Control groups</i>	<i>Hemodialysis groups</i>	χ^2	<i>Sig.</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>95% CI</i>
Age(Year)						
≤ 30	10 (33.33%)	14 (23.33%)				
(31–49)	10 (33.33%)	22 (36.67%)	1.05	0.59		
≥ 50	10 (33.33%)	24 (40.0%)				
Sex						
Male	15 (50.0%)	30(50.0%)	0.001	1.000	1.000	0.42–2.40
Female	15 (50.0%)	30(50.0%)				
BMI Kg/m ²						
< 18	0 (0%)	5 (8.33%)				
18–24.9	30 (100%)	29 (48.33%)	23.65	0.001**		
25–29.9	0 (0%)	16 (26.67%)				
30–39.9	0 (0%)	10 (16.67%)				
Family history						
Present	2 (6.67%)	15 (25.0%)	4.39	0.03*	4.67	0.99–21.97
Absent	28 (93.33%)	45 (75.0%)				
Smoking						
Present	3 (10.0%)	10(16.67%)	0.71	0.39	1.8	0.46–7.10
Absent	27 (90.0%)	50(83.33%)				

**p<0.01, S.E: Standard error

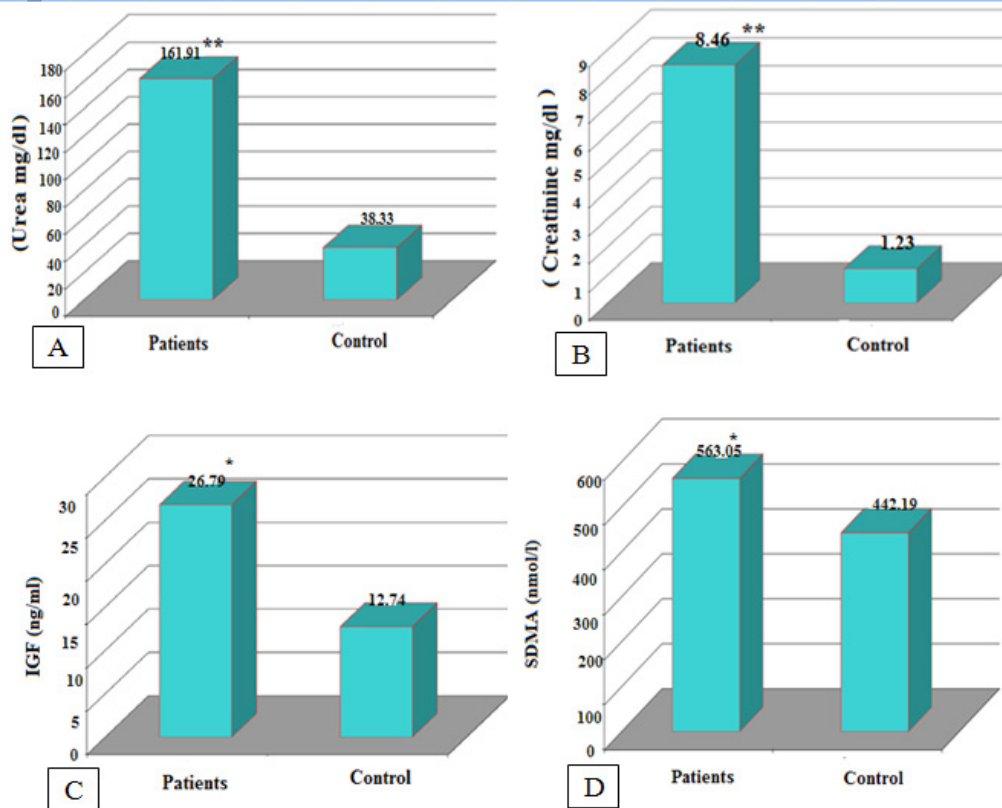


Figure 1: Comparison of urea (A), creatinine (B), IGF (C), and SDMA (D) concentration between hemodialysis and control groups.

Table 3: The comparison of age and BMI between hemodialysis and control groups.

Parameters	Group	Control (Mean ± S.E) n = 30	Hemodialysis hemodialysis patients (Mean ± S.E) n = 60	Sig **
Age (year)		37.77 ± 2.52	43.68 ± 1.93	0.77
BMI (kg/m ²)		23.20 ± 0.30	25.46 ± 0.73	0.0001

t-test, **P ≤ 0.01, S.E: Standard error

Table 4: The impact of age groups on biochemical parameters of hemodialysis group.

Parameters	Age Group		
	Mean ± S.E ≤30 n = 14	31-49 n = 22	≥ 50 n = 24
Urea (mg/dL)	170.14 ± 14.93a	160.54 ± 10.99 a	158.37 ± 10.25a
Creatinine (mg/dL)	8.92 ± 0.74a	9.08 ± 0.78 a	7.63 ± 0.67a
IGF-1 (ng/mL)	30.74 ± 2.14 a	22.96 ± 2.06b	27.98 ± 2.22ab
SDMA (nmol/L)	476.91 ± 43.30b	608.35 ± 83.10a	571.78 ± 77.89ab

Different letters in the same row refer to significant differences (p ≤ 0.05), S.E: Standard error.

Table 5. The impact of BMI groups on biochemical parameters of hemodialysis group.

Parameters	BMI(Kg/m ²)			
	Mean ± S.E <18 n = 5	18-24.9 n = 29	25.29.9 n = 16	30-39.9 n = 10
Urea (mg/dL)	159 ± 12.96a	172.55 ± 9.66 a	157.81 ± 14.93 a	138.90 ± 12.59a
Creatinine (mg/dL)	8.20 ± 0.78 a	9.24 ± 0.60 a	7.74 ± 0.95 a	7.49 ± 1.09a
IGF-1 (ng/mL)	29.12 ± 3.23 a	26.23 ± 2.06 a	28.22 ± 2.11 a	24.95 ± 3.78a
SDMA (nmol/L)	335.55 ± 20.67b	649.85 ± 75.86a	478.85 ± 62.71c	510.84 ± 103.71ac

Different letters in the same row refer to significant differences (p ≤ 0.05), S.E: Standard error.

Table 6: The impact of duration of disease on biochemical parameters of hemodialysis group.

Parameters	Group(years)		
	Mean ± S.E		
	Less than 1 n = 34	1-5 n = 22	More than 5 n = 4
Urea (mg/dL)	169.32 ± 8.45a	149.54 ± 9.65a	167 ± 47.72a
Creatinine (mg/L)	9.05 ± 0.58a	7.60 ± 0.70a	8.15 ± 1.52a
IGF-1 (ng/mL)	29.56 ± 1.77a	24.05 ± 1.96ab	18.26 ± 2.78 b
SDMA (nmol/L)	506.59 ± 38.90a	648.79 ± 101.67a	571.44 ± 154.71a

Table 7: The impact of duration of dialysis on biochemical parameters of hemodialysis group.

Parameters	Group(years)		Sig*
	Mean ± S.E		
	Less than 1 n = 39	More than 1 n = 21	
Urea (mg/dL)	166.64 ± 8.07	153.14 ± 11.62	0.89
Creatinine (mg/dL)	8.41 ± 0.57	8.54 ± 0.63	0.32
IGF-1 (ng/mL)	28.48 ± 1.62	23.63 ± 2.14	0.43
SDMA (nmol/L)	529.59 ± 42.54	625.21 ± 100.29	0.02*

t-test, *p≤ 0.05, S.E: Standard error.

Table 8: The impact of many dialyzes weekly on biochemical parameters of hemodialysis group.

Parameters	Group(weekly)		
	Mean ± S.E		
	1 n = 3	2 n = 46	3 n = 11
Urea (mg/dL)	144.00 ± 29.48a	161.08 ± 7.00 a	170.27 ± 20.76 a
Creatinine (mg/L)	6.80 ± 0.60b	8.42 ± 0.52ab	9.08 ± 0.85a
IGF-1 (ng/mL)	19.68 ± 3.03 b	27.47 ± 1.51a	25.88 ± 3.20ab
SDMA (nmol/L)	492.17 ± 16.79b	517.44 ± 42.33ab	773.13 ± 157.35a

Different letters in the same raw refer to significant differences (p≤ 0.05).S.E: Standard error.

Table 9: The impact of sex on biochemical parameters of hemodialysis group.

Parameters	Group(years)		Sig*
	Mean ± S.E		
	Male n = 30	Female n = 30	
Urea (mg/dL)	167.53 ± 9.61	156.30 ± 9.19	0.76
Creatinine (mg/dL)	9.20 ± 0.55	7.72 ± 0.65	0.02*
IGF-1 (ng/mL)	28.25 ± 2.08	25.32 ± 1.58	0.07
SDMA (nmol/L)	545.13 ± 64.12	580.98 ± 62.83	0.97

t-test, *p ≤ 0.05, S.E: Standard error.

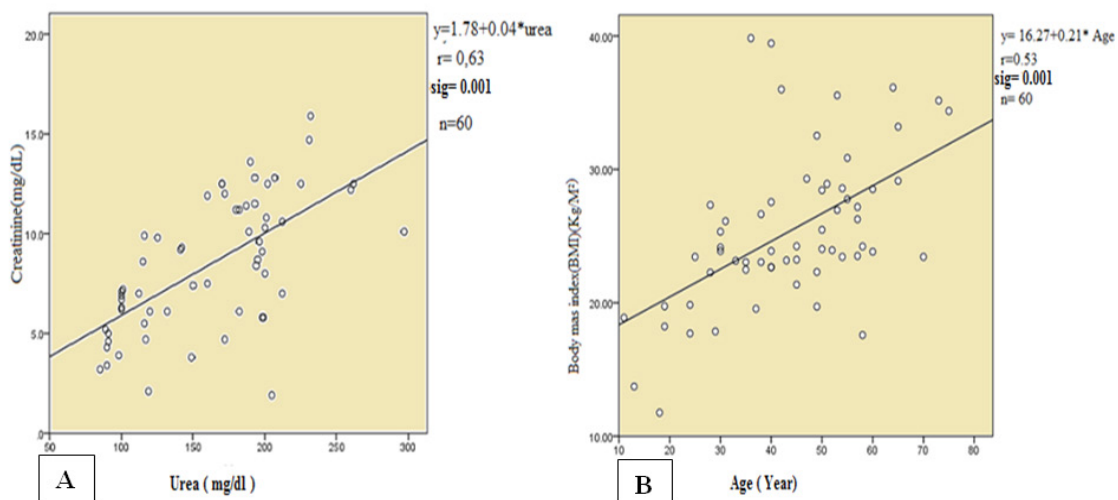


Figure 2: The correlation coefficient between urea(mg/dl) and creatinine (mg/dL) (A) and between BMI (Kg/m²) and age (year)(B) in Hemodialysis group.

urea and creatinine in addition to age and BMI ($p \leq 0.05$) as shown in Figures (2A and B).

MOLECULAR ANALYSIS

Deoxyribo nucleic acid (DNA) extraction

The DNA was extracted from the white blood cells of hemodialysis patients and control groups as in (Figure 3) which showed the electrophoresis pattern of DNA extracted.

The Genotype of *ACE* gene polymorphism using PCR-ARMS

The PCR product of *ACE* gene amplification was 521,233, 234 bp in control, and hemodialysis groups (Figures 4 and 5).

Respecting the *ACE* genotype distribution, I/I, I/D,

and D/D distribution in hemodialysis patients were 18.33%, 65%, and 16.67% respectively while in the control group the genotypes were 33.33 %, 36.67%, and 30% respectively. Frequencies of alleles for the *ACE* gene were 50.83% and 49.17% for I and D in hemodialysis patients and 51.67% and 48.33% for control. The results exhibit significant differences ($p \leq 0.05$) between I/I and I/D genotype in hemodialysis patients (OR = 0.31, CI:0.10-0.92) and I/D-D/D genotype (OR = 0.32, CI:0.11-0.96) as compared with control group, while there were no significant differences in allele frequency (I, D) (Table 10).

The table 11 refers to the significant increasing ($p \leq 0.05$) in the serum of urea level in heterozygous I/D genotype in hemodialysis groups, while there is no appearance of

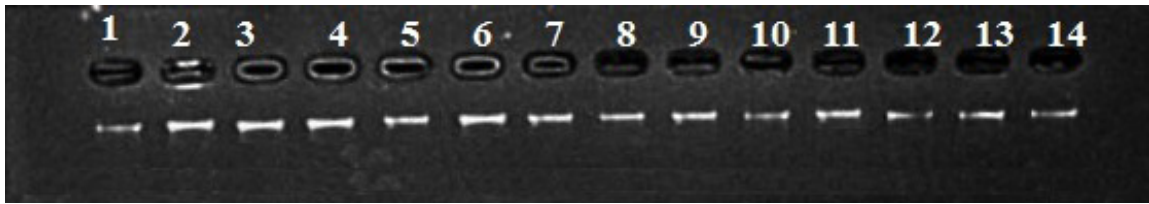


Figure 3: The electrophoresis pattern of DNA extracted from white blood cell of hemodialysis patients(lane 1–7) and control group (lane 8–14), 1% agarose, 75 V, 20 Am for 30 minutes.

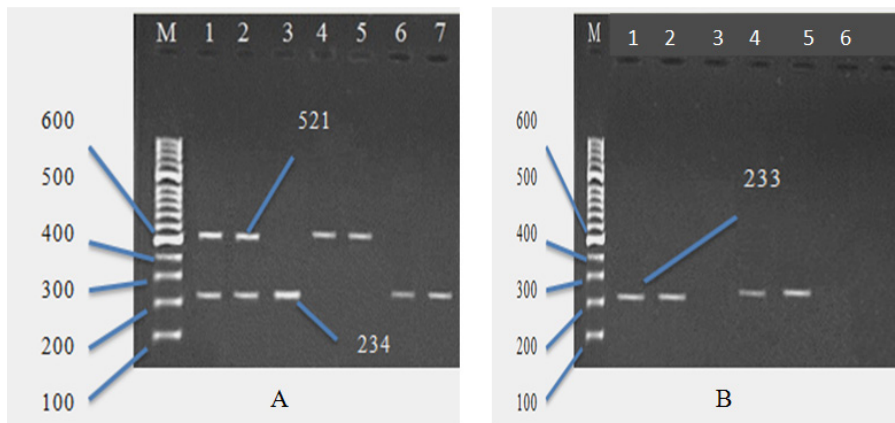


Figure 4: A- Electrophoresis pattern of PCR product of the *ACE* gene in control group, lane M: DNA ladder. Lanes (1-2) show heterozygotes (I/D) genotype yielded a 521 bp and 234bp bands. Lanes (3,6 and 7) show (D/D) genotype yielded a 234bp band. Lanes (4,5) show (I/I) genotype yielded a 521bp band. B- Display a 233 bp band which appears as a result of confirming primers for insertion for the same specimens.3% agarose, 70 V, 20 mA for 90 minutes.

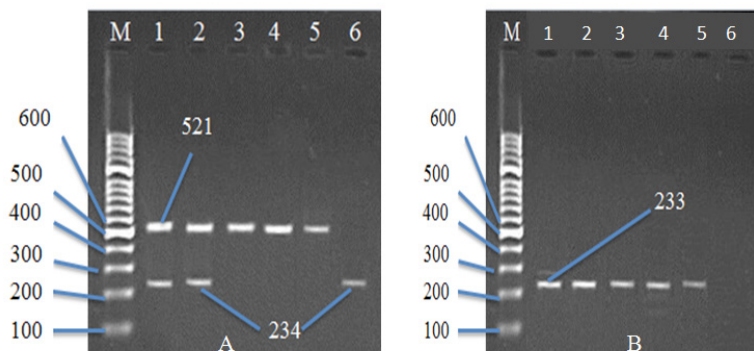


Figure 5: Electrophoresis pattern of PCR product of the *ACE* gene in hemodialysis patients. Lane M: DNA ladder. Lanes (1–2) show heterozygotes (I/D) genotype yielded a 521 bp and 234bp bands. Lanes (3,4, and 5) show (I/I) genotype yielded a 521 bp band. Lanes (6) show (D/D) genotype yielded a 234bp band. B Displays 233 bp band which appears as a result of confirming primers for insertion for the same specimens. 3% agarose, 70 V, 20 mA for 90 minutes.

Table 11: Association of ACE gene polymorphisms in Hemodialysis group with biochemical parameters.

Parameters	Genotype	Mean ± S.E		
		II n = 11	ID n = 39	DD n = 10
Urea (mg/dL)		148.09 ± 12.36 ab	173.21 ± 8.58 a	133.10 ± 12.75b
Creatinine (mg/L)		7.19±1.02 a	9.11±0.53 a	7.34±0.97 a
IGF-1 (ng/mL)		27.04±3.18 a	26.29±1.64 a	28.46±3.32 a
SDMA (nmol/L)		558.59 ± 84.17 a	559.70 ± 52.53 a	581.05 ± 154.87 a

Different letters in the same raw refer to the significant difference (p≤0.05).

Table 10: Genotype distribution of ACE gene polymorphism of patient and control groups.

Genotype	Control %	Study Group		χ ²	Sig.	Odds ratio (95% CI)
		Control %	Hemodialysis group %			
IIa	10 (33.33%)	11 (18.33%)	39 (65.0%)	4.66	0.03*	0.31 (0.10–0.92)
I/D	11(36.67%)	39 (65.0%)	10 (16.67%)	0.001	0.97	0.98 (0.29–3.43)
DDa	9 (30.0%)	39 (65.0%)	39 (65.0%)	4.30	0.04*	0.32 (0.11–0.96)
I/D	11(36.67%)	39 (65.0%)	39 (65.0%)			
Total	30	60				
Allele frequency						
I	31(51.67%)	61 (50.83%)				
D	29 (48.33%)	59 (49.17%)		0.11	0.9	0.95 (0.52-1.79)

*reference group, *P ≤ 0 .05.

significant differences (p >0.05) in the levels of creatinine, IGF-1, and SDMA in comparison with homozygous genotypes II and DD.

DISCUSSION

The outcome of the current data revealed that the hemodialysis patients had higher urea and creatinine levels with a significant increase in comparison with the control group. In CKD, the kidneys are damaged or cannot filter blood as healthy kidneys. Because of this damages, excess fluid and waste from the blood remain in the body and may cause other health problem,¹³ these alterations or damages are most frequently identified by elevated serum levels of blood urea nitrogen or creatinine in CKD hemodialysis patients.²

According to the level of IGF-1, a significant increment (p ≤0.05) was shown in hemodialysis patients in comparison with control. Previous studies demonstrated that the CKD cause numerous alterations of the GH/IGF-1 system which collectively cause GH and IGF-1 resistance, these alterations bring about significant clinical outcomes, involving growth retardation in children while in adults result in malnutrition and catabolism. This result is not consistent with previous studies which recorded less than normal level of IGF-1 in adult CKD hemodialysis patients with stage 5 directing to the risk of mortality connected with a less than normal IGF-1. Earlier investigations demonstrated that widespread hemodialysis patients who died have lessened levels of IGF-1 from survivors.^{14,15} The mortality prognosis and the function of IGF-1 analyzed in non-dialyzed CKD hemodialysis patients at stage 5 and the risk of mortality connected with the alteration of IGF-1 levels after the beginning of treatment with dialysis

in these patients. In addition, there was a meaningful elevation of IGF-1 throughout the dialysis therapy (first 1 year), and those hemodialysis patients who appeared to had a persistently raised level of IGF-1 had a lessen risk of mortality from all cases.¹⁶

In regarding the effect of the age group in biochemical parameters, there was a significant decline in IGF-1 between groups 31–49 and ≤30 age groups.¹⁷ explained that IGF-1 level linked in a negative manner with age, taking into account that depletion of IGF-1 level in CKD hemodialysis patients is connected to the structure of the body, specifically muscle weakening^{17,18} and lower bone mineral density(BMD).¹⁹

When studying the effect of duration disease, there is significant decrease (p ≤0.05) in IGF-1 level in hemodialysis patients with increased duration of disease and showed the high level of the IGF-1 in dialysis patients had dialysis two to three times a week compared to patients who use dialysis once a week (Table 8). This explained by the baseline level of serum IGF-1 and the alteration of IGF-1 throughout 1 year in CKD hemodialysis patients in stage 5 beginning dialysis in connection with bone mineral density (BMD), metabolic parameters, nutritional status, and mortality.¹⁶ Also, the IGF-1 may be considered as a novel biomarker in ESRD patients getting hemodialysis two or three times a week.²⁰ On the other hand, levels of IGF-1 in CKF are normal, whereas, in ESRD, the IGF-1 levels were slightly reduced.²¹

With regard to the level of SDMA, there was a significant increase (p ≤0.05) in hemodialysis patients in comparison with control. SDMA is believed an inert metabolite, but since it can transfer into cells, SDMA effect on glomerular endothelial cells, in addition, circulating SDMA is raised in hemodialysis patients with CKD²² and SDMA is a catabolic

outcome of arginine methylated proteins.⁶ Also, it revealed as kidney function biomarker while the level of SDMA raised and linked with GFR in hemodialysis patients.²³

According to the age, these results recorded a significant increment in the age group 31–49 in comparison with age groups ≤ 30 and nonsignificant increment in comparison with the age group ≥ 50 . These results not consistent with previous studies which recorded that SDMA is not being affected by non-renal agents which are verified to affect creatinine like diet, muscle mass, diabetes, and inflammation. Moreover, SDMA is slightly affected by obesity, age, and another reason²⁴.

According to BMI, the significant decrease in SDMA in the < 18 when compared with other BMI groups. These results not consistent with previous studies illustrated SDMA is minimally influenced by obesity.²⁴ Another study recorded the absence of the correlation between BMI and level of SDMA when studying the relation between the level of SDMA and level of arginine in hemodialysis patients group.²⁵ Malnutrition capable to share in the reduction of nitric oxide (NO) production as a result of a deficiency of arginine, particularly hemodialysis patients endures from malnutrition.²⁶ The deficiency in proteins can be brought about by a reduction of protein intake, and hemodialysis treatment worsens this situation.²⁸

Furthermore, this results disagreed with another study which showed no correlation between BMI and level of SDMA.²⁸ The ESRD effects on the patient body, including peripheral nerves and muscles, differently from one patient to another, which is reflected on physical activity and affect the independence of the patient and the physical activity of healthy people is much better than people under hemodialysis. This reflects the effect of the disease on the patient.²⁹

According to the duration of dialysis and the number of dialyzes, there is a significant increase ($p \leq 0.05$) in the level of SDMA with increasing of number and duration of dialysis. The level of SDMA was about four-fold larger in CRF and about 5.5-fold are larger in hemodialysis patients.²⁵ The increase was more noticeable for SDMA, where its level increased about fourfold in CKD and about sixfold in dialysis hemodialysis patients.³⁰ This result explains the increased level of SDMA as the duration of disease and the number of dialysis in hemodialysis patients.

According to the effect of sex in biochemical parameter studied, there was a statistically accepted increase in creatinine levels of males than females. Serum creatinine level is the largest usually employed biomarker for prediction the degree of kidney function, except it can be influenced by different factors as a dietary habit, muscle mass, gender, age, ethnicity, and specific drug treatment. Furthermore, the muscle mass is a great determinant for the level of serum creatinine, and females have little mass of muscle in comparison with males.³¹ Moreover, the variation between males and females in glomerular hemodynamics, glomerular structure, and the metabolism of the hormone could perform an important function in the gender dissimilarity.³²

There were little studies in adult CKD hemodialysis patients with stage 5 directing to the mortality risk connected with IGF-1 or SADMA in the Iraqi population. To our acknowledgment, this the first study analyzed the importance of IGF-1 and SADMA as a risk factor or prognosis indicator? And their association with I/D polymorphism of *ACE* gene polymorphism in adult Iraqi CKD hemodialysis patients.

In hemodialysis patients, the positive correlation between urea and creatinine in addition to age and BMI ($p \leq 0.05$) may be illustrated as hemodialysis plays a vital role in the elimination of waste products such as free water, urea, and creatinine from the blood as the kidneys are impaired. Hemodialysis is usually performed with uremic patients for two to three times a week, and the required times for dialysis vary from two to four hours.³³ The results of this study agreed with the previous study reported the range of serum creatinine, and urea was significantly high before hemodialysis and reduced significantly after hemodialysis and noted among many biochemical parameters in blood, serum creatinine and urea are emerging as a source of more sensitive markers for the detection of the renal failure³⁴.

In terms of age and BMI, obesity is linked with raising the risk of occurrence CKD,^{35,36} ESRD,³⁷ and mortality.³⁸ The gradual deprivation of kidney role like with the diversely combined age-BMI groups, older patients had a larger risk of gradually deprivation of kidney role, independent of BMI levels. The correlation between BMI and a faster decrease in kidney role was larger in patients older than 40 years old, with a noticeable accentuation of the risk linked with higher BMI as age increased³⁹. In older patients with larger BMI had higher medication usage, the higher predominance of cardiovascular disease, hypertension, and diabetes mellitus. Also, aging itself result in raised glomerular permeability, the decline in individual glomerular volume decreased nephron numbers, and glomerular sclerosis⁴⁰ All these influences could superimpose on the alterations induced by obesity and cause a more observed effect on the function of kidney in older individuals.³⁹

In *ACE* genotyping study, showed that there were significant differences of study groups in the *ACE* gene ($p \leq 0.05$), I/D genotype was higher in hemodialysis patients 39 (65%) than control 11(36.67) with OR = 0.31 and 95% CI: 0.10–0.92.

The role of RAS is familiar for its maintenance and regulation of glomerular and systemic blood pressure as well as salt balance. The hyperactivity of this system cause raising in glomerular and systemic blood pressure results in fibrosis and progressive failure of the renal function. The result of this study agreed with results obtained by who recorded the *ACE* I/D polymorphisms association with essential hypertension that leads to CKD⁴¹⁻⁴³ while this study disagreed with earlier studies which concluded that *ACE*-DD genotype might be a potential risk factor for causing and progression of CKF among hypertensive hemodialysis patients⁴⁴⁻⁴⁶.

This study showed that subjects having I/D genotype had a higher risk for the development of CKD compared with II and DD genotype but statistically no significant differences

between I and D allele frequency. Another previous result recorded the ACE I/D polymorphism is liked with female CKD hemodialysis patients rather than male CKD hemodialysis patients⁴⁷ while¹¹ found that DD genotype is associated with female CKD hemodialysis patients. The kidney is affected by many factors as recorded by the molecular study of DNA, which showed fragmentation in DNA extracted from the renal cortex in the diabetic group compared to the control group.⁴⁸ There is another polymorphism in other genes associated with kidney diseases as a link between polymorphism of promoter region of -634 G/C with levels of systolic blood pressure (SBP), GFR, type IV collagen and increased expression of

Vascular endothelial growth factor (VEGF) in blood and urine. The increase in VEGF in the urine reflects the activation of angiogenesis and endothelial dysfunction, aggravated during the development and progression of chronic kidney disease.⁴⁹

In conclusion, subjects having I/D genotype may be a potential risk factor for the development of CKD in hemodialysis patients as compared with II and DD genotype. Also, level of serum urea statistically increases in hemodialysis patients had ID genotypes in comparison with II and DD genotypes as well as, the importance of IGF-1 and SADMA as a risk factor or prognosis indicator in adult CKD hemodialysis patients.

Authors contributions

Maysaa Adil Hadi conceived of the presented idea, contributed in design, planning methodology, and supervision. Wisam Abed Al-Amer Rady carried out the experiments, processed the experimental data using the analysis by the statistical methods, designed the figures and performed the drafted manuscript. Both Maysaa Adil Hadi and Wisam Abed Al-Amer Rady authors contributed to the interpretation of the results and completed writing of the final version of the manuscript with support from Ali Hmood Al. Saadi. Both Ali Hmood Al. Saadi and Maysaa Adil Hadi supervised the project.

REFERENCES:

- Zoccali, C.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; Ortiz, A.; Sarafidis, P.; Dekker, F.W.; Fliser, D. and Fouque, D. (2017). The systemic nature of CKD. *Nat. Rev. Nephrol.* 13: 344-358.
- Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO). (2013). Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* 3: 1– 150.
- Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factors–I: a growth hormone. *J. Clin. Pathol: Mol Pathol.* 54:311-316.
- Rogers, S.; Ryan, G. and Hammerman, M. (1991). Insulin-like growth factors I and II are produced in the metanephros and are required for growth and development in vitro. *J. Cell Biol.* 113:1447-1453.
- Leon, A. B.; Lorna J. H. (2014). Insulin-like Growth Factors and Kidney Disease. *Am J Kidney Dis.* by the National Kidney Foundation, Inc.
- El-Khoury, J.M.; Dustin, R.B.; Bo, H.; Edmunds, Z.R., and Sihe, W. (2016). Comparison of symmetric dimethylarginine with creatinine, cystatin C and their eGFR equations as markers of kidney function. *Clin. Biochem.* 49 (15):1140-1143.
- Shafi, T.; Hostetter, T.H.; Meyer, T.W.; Hwang, S.; Hai, X.; Melamed, M. L.; Banerjee, T.; Coresh, J. and Powe, N. R. (2017). Serum Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine and Morbidity and Mortality in Hemodialysis Patients. *Am. J. Kidney Dis.* 70:48-58.
- Kielstein, J.T.; Salpeter, S.R.; Bode-Boeger, S.M.; Cooke, J.P., and Fliser, D. (2006). Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21: 2446–2451.
- Devansena, T. (2015). *Enzymology*, published in Indian, Oxford university press. pp 442.
- Weiner, D.E.; Tabatabai, S.; Tighiouart, H.; Elsayed, E.; Bansal, N.; Griffith, J.; Salem, D.N.; Levey, A. S. and Sarnak, M. J. (2006). Cardiovascular outcomes and all-cause mortality: Exploring the interaction between CKD and cardiovascular disease. *Am. J. Kidney Dis.* 48:392- 401.
- Nagamani S.; Shanmuga, P.M.; Shanmuga, P.R. L. Chandrasekhar, K., and Kartikeyan, M. (2015). ACE DD genotype associated with the female Chronic Kidney Disease hemodialysis patients of Tamilnadu population. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 16: 29–33.
- Sakhteh, M.; Behzad, P.; Naser, A.; Ahmadreza, S.; Abdolhamid, B. and Mohammad, F. (2015). Polymorphism and synergism of angiotensin-converting enzyme (ACE) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) genes in coronary artery disease. *16(4) :1168– 1174.*
- National Chronic Kidney Disease Fact Sheet. (2017). National Centers for Chronic Disease Prevention and health promotion.
- Fernandez-Reyes, M.J.; Alvarez-Ude, F.; Sanchez, R.; Mon, C.; Iglesias, P.; Diez, J.J., and Vazquez, A. (2002). Inflammation and malnutrition as predictors of mortality in hemodialysis patients on hemodialysis. *J Nephrol* 15: 136–143.
- Qureshi, A.R.; Alvestrand, A.; Divino-Filho, J.C.; Gutierrez, A.; Heimbürger, O.; Lindholm, B. and Bergstrom, J. (2002). Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(1): 28–36.
- Jia, T.; Gama, A. T.; Heimbürger, O.; Bárány, P.; Lindholm, B.; Stenvinkel, P. and Qureshi, A. (2014). IGF-1 and survival in ESRD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9(1):120-127.
- Zheng, Z.; Messi, M.L., and Delbono, O. (2001). Age-dependent IGF-1 regulation of gene transcription of Ca²⁺ channels in skeletal muscle. *Mech. Ageing Dev.* 122: 373–384.
- Scicchitano, B.M.; Rizzuto, E. and Musaro, A. (2009). Counteracting muscle wasting in aging and neuromuscular diseases. The critical role of IGF-1. *Ageing.* Albany, NY. Online. 1: 451–457.
- Park, S.; Jia, T.; Qureshi, A.; Barany, P.; Heimbürger, O.; Larsson, T.; Axelsson, S. P. and Lindholm, B. (2013). Determinants and survival implications of low bone mineral density in end-stage renal disease hemodialysis patients. *J. Nephrol* 26: 485–494.
- Prelevic, V.; Radunovic, D.; Ratkovic, M.; Gledovic, B.; and Antunovic, T. (2018). IGF1 can be considered as novel biomarker for assessment of cognitive function in CKD patients? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 33(1): 564.
- Tonshoff, B.; Powell, D.; Zhao, D.; Durham, S.; Coleman, M.; Domené, H.; Blum, W.; Baxter, R.; Moore, L. and Kaskel, F. (1997). Decreased hepatic insulin-like growth factor (IGF-1) and increased IGF-1 binding protein-1 and -2 gene expression

- in experimental uremia. *Endocrinology*.138 (3):938-946.
- 22 Feliers, D.; Duck-Yoon, L.; Yves, G. and Balakuntalam, S. K. (2015). Symmetric dimethylarginine alters endothelial nitric oxide activity in glomerular endothelial cells. *Cellular Signalling*. 27: 1–5.
 - 23 Schwedhelm, E. R., and Boger, H. (2011). The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 7: 275–285.
 - 24 Hokamp, J.A. and Nabity, M.B.. (2016). Renal biomarkers in domestic species. *Vet. Clin. Pathol.* 45: 28-56.
 - 25 Christian, F.; Frank, S.; Elke, K.; Martin, B. and Gunter, S. (2003). Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in hemodialysis patients with chronic kidney diseases. *Clinica Chimica Acta.* 336: 1-12.
 - 26 Suliman, ME.; Stenvinkel, P.; Heimbürger, O.; Barany, P.; Lindholm, B. and Bergstrom, J.(2002). Plasma sulfur amino acids in relation to cardiovascular disease, nutritional status, and diabetes mellitus in hemodialysis patients with chronic renal failure at start of dialysis therapy. *Am. J. Kidney Dis.*40: 8-480.
 - 27 Ritz, E. and Nowicki, M. H. (1994). Kardiovaskulare und infektiöses –bedingte Mortalität bei Dialyse. Ist ADMA (asymmetrisches Dimethyl-L Arginine) involviert? *Nieren – Hochdruckkrankh.* 23:20 -116.
 - 28 Flecka, C.; Frank, S.; Elke, K.; Martin, B. and Gunter, S. (2003). Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clinica Chimica Acta.* 336: 1–12.
 - 29 Baqer, H. M.; Jabur, F. and Kadhum, S. (2018). Impact of End Stage Renal Disease upon physical activity for Adult Patients Undergoing Hemodialysis at AL-Najaf Governorate Hospitals. *J. Pharm. Sci. & Res.*10(5):1170-1174.
 - 30 Morescau, B.; Nagels, G.; Posseniens, I.; Debroe, M.E.; Because, I.; Blliouw, J.M.; Lornoy, W. and DE, D. P.P. (1997). Guanidino compounds in serum and urine of non dialyzed hemodialysis patients with chronic renal insufficiency. *Metabolism* 46: 1024-1031.
 - 31 Heymsfield, S.B.; Arteaga, C.; Mc, M. C.; Smith, J. and Moffitt, S. (1983). Measurement of muscle mass in humans. the validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am. J. Clin. Nutr.* 37:478-494.
 - 32 Silbiger, SR. and Neugarten, J. (2003). The role of gender in the progression of renal disease. *Adv. Ren. Replace Ther.*10:3-14.
 - 33 Wendy, E.; Bloembergen, D.C. and Friedrich, K. (1996). Relationship of dose of hemodialysis and cause-specific mortality. *Kidney Int.* 50:557-565.
 - 34 Nisha, R.; Kannan, S.S.R.; Mariappan, T.K., and Jagatha, P. (2017). Biochemical evaluation of creatinine and urea in patients with renal failure undergoing hemodialysis. *Journal of Clinical Pathology and Laboratory Medicine.* 1(2): 1-5.
 - 35 Fox, C.S.; Larson, M.G.; Leip, E.P.; Culleton, B.; Wilson, P.W., and Levy, D. (2004). Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAM.*,291(7):844–850.
 - 36 Foster, M.C.; Hwang, S.J. and Larson, M.G. (2008). Overweight, obesity, and the development of stage 3 CKD: the Framingham Heart Study. *Am J Kidney Dis.* 52(1):39–48.
 - 37 Vivante, A.; Golan, E.; Tzur, D.; Leiba, A.; Tirosh, A.; Skorecki, K.; Calderon-Margalit, R. (2012). BMI in 1.2 Million Adolescents and Risk for End-Stage Renal Disease. *Arch Intern Med.*172(21):1644-1650.
 - 38 De-Gonzalez, A.B.; Hartge, P. and Cerhan, J.R. (2010). Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. *N Engl. J. Med.* 363(23): 2211–2219.
 - 39 Ling, J.L.U.; Molnar, M. Z.; Naseer, A.; Mikkelsen, M.K.; Kalantar-Zadeh, K. and Kovesdy, C.P. (2015). Age and Association of BMI with Loss of Kidney Function and Mortality. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 3(9): 704–714.
 - 40 Mcnamara, B.J.; Diouf, B.; Hughson, M.D.; Hoy, W.E., and Bertram, J.F. (2009). Associations between age, body size and nephron number with individual glomerular volumes in urban West African males. *Nephrol Dial Transplant.* 24(5):1500–1506.
 - 41 Glavnik, P. (2007). M235T polymorphism of the angiotensinogen gene and insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-I converting enzyme gene in essential arterial hypertension in Caucasians. *Folia Biol.* 53:69–70.
 - 42 Gupta, S.; Agrawal, B.K.; Goel, R.J., and Sehajpal, P.K. (2009). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertensive rural population of Haryana. India. *J. Emerg Trauma Shock,* 2:150–154.
 - 43 Patnaik, M.; Pati, P.; Swain, S.N.; Mohapatra, M.K.; Dwibedi, B.; Kar, S.K. and Ranjit, M. (2014). Association of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme-2 gene polymorphisms with essential hypertension in the population of Odisha, India. *Ann Hum Biol.* 41:143–150.
 - 44 Tripathi, G.; Dharmani, P.; Khan, F.; Sharma, RK.; Pandirikka, V. and Agrawal, S. (2006). High prevalence of ACE DD genotype among north Indian end-stage renal disease hemodialysis patients. *BMC Nephrol.*7:15.
 - 45 Tripathi, G.; Sharma, R.; Baburaj, V.; Sankhwar, S.; Jafar, T. and Agrawal, S. (2008). Genetic risk factors for renal failure among North Indian ESRD hemodialysis patients. *Clin. Biochem.* 41:525–531.
 - 46 Sarkar, T.; Narinder, P. S.; Premashish, K.; Syed, A. H.; Seema, K.; Sunil, K. P.; Anish, K. and Neena, G. (2016). Does angiotensin-converting enzyme-1 (ACE-1) gene polymorphism lead to chronic kidney disease among hypertensive hemodialysis patients? *Renal Failure.* 38(5): 765–769.
 - 47 Mansoor, Q.; Bilal, N.; Qureshi, S.; Qureshi, Q.; Javaid, A. and Ismail, M. (2010). Gender-based disparities in ACE I/D polymorphism associated with progression of diabetic nephropathy in Pakistani hemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Diab. Metab.*18:67–71.
 - 48 Al-Joubori, M. A. Ali Hmood Al-Saadi, A.H. and Haider Kamil Zaidan, H. Z. (2013). Effect of a Mixture of Plants Extracts on Genomic DNA, Insulin Receptor, and Insulin Receptor Substrate-1 Genes in Alloxan-Induced Diabetic Male Rats. *Journal of Biology, Agriculture, and Healthcare,*3(2): 140-149.
 - 49 Shulkina, S. G.; Smirnova, E.N.; Osadchuk, M.A., and Trushin, M.V.(2018). Obesity and functional state of kidney depends on VEGF polymorphism. *J. Pharm. Sci. & Res.*10(5): 1259-1262.

Annexe 3

A. Définition d'une méta-analyse

C'est une méthode scientifique systématique combinant les résultats d'une série d'études indépendantes sur un problème donné, pour faire une synthèse objective selon un protocole précis. Son intérêt est d'augmenter la puissance et la précision et de lever le doute en cas de discordances entre les travaux précédemment réalisés. Elle permet aussi de suggérer de nouvelles hypothèses.

Le travail doit être protocolisé afin d'assurer sa reproductibilité, le protocole doit détailler les quatre étapes principales d'un méta-analyse : la recherche des études, la sélection, l'extraction des données et l'analyse.

1. La recherche des études

Elle doit être la plus exhaustive possible partant d'une question précise. Pour cela, toutes les sources d'informations permettant d'avoir des connaissances sur les études doivent être sollicitées. Les premières à consulter sont les bases de données bibliographiques informatisées telles que MEDLINE.

2. Sélection et inclusion

Les études destinées à être incluses dans la méta-analyse doivent faire l'objet d'une sélection soignée à la fin de la phase de la recherche bibliographique.

-Une pré-sélection : a pour but d'éliminer les études sans rapport avec la problématique de la méta-analyse.

-Une sélection proprement dite : le but de cette phase est de ne retenir que les travaux répondant aux critères de sélection préalablement définis.

3. Extraction des données

Elle est réalisée de façon concomitante à la sélection et lors de la lecture des études. Les éléments recueillis des études doivent comporter les informations suivantes :

- 1- Les caractéristiques des études (populations, pathologie, ...).
- 2- Les données nécessaires à l'estimation de l'effet global (prévalence, fréquence, ...).

4. Analyse

- Présentation des résultats

La présentation des résultats d'une méta-analyse doit respecter deux étapes importantes :

- La présentation descriptive des études incluses dans la méta analyse.
- La présentation graphique par l'utilisation des logiciels spécifique comme " Rev Man "

B. La technique RFLP

1. Définition

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) est une technique inventée en 1984 par le scientifique anglais Alec Jeffreys pendant les recherches sur les maladies héréditaires.

La technique PCR RFLP est l'association entre les techniques d'amplifications et d'observations de polymorphisme sur des fragments digérés par des enzymes de restriction. D'un point de vue technique, la méthode RFLP est utilisée pour refléter directement des variations dans la séquence primaire de l'ADN

2. Principe

La technique RFLP repose sur la digestion d'un ADN cible par une ou plusieurs enzymes de restriction (Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui coupent un long fragment d' 'ADN en courts fragments. Chaque endonucléase de restriction vise différentes séquences de nucléotides dans un brin d'ADN et coupe pour cette raison à différents sites). Les fragments de différentes tailles sont séparés par électrophorèse.

3. Comment fonctionne cela ?

Le PLFR est exécuté en utilisant une suite d'opérations :

a. Extraction d'ADN

Pour commencer, l'ADN est extrait du sang, de la salive ou d'autres échantillons et épuré.

b. Fragmentation d'ADN

Digestion de l'ADN pure par une ou plusieurs enzymes de restriction reconnaissant des séquences de 3-9 nucléotides

c. Électrophorèse sur gel

Les fragments de restriction produits pendant la fragmentation d'ADN s'analysent en utilisant l'électrophorèse sur gel.

Résumés

Résumé

L'IRC est un problème de santé publique largement répandu dans le monde. Elle progresse rapidement, silencieusement et d'une manière indépendante de la maladie causale pouvant aboutir à l'IRT. Plusieurs facteurs et mécanismes contribuent au développement de l'IRT. De nombreuses études ont été réalisées pour rechercher une éventuelle relation entre le polymorphisme I/D du gène *ACE* et la survenue de l'IRT mais les résultats demeurent controversés.

L'objectif de notre travail est de réaliser une analyse d'articles pour examiner les rapports de données publiées sur le polymorphisme I/D du gène *ACE* et l'IRT dans l'intention de fournir une conclusion plus fiable sur la signification de cette association.

A cet effet, nous avons sélectionné cinq études cas-témoins après l'interrogation des différentes bases de données. Les résultats de chaque article ont été extraits et analysés. Les **Odds ratios** (OR) et les intervalles de confiance (IC) à 95% ont été calculés par le logiciel « **Epi Info 7.0** ».

L'analyse globale des populations étudiées a montré que:

- L'allèle D était en très forte association avec l'IRT » (D versus I OR=1.70 IC 95 % [1.42, 2.03] $P < 0.001$), le génotype homozygote DD a triplé le risque d'IRT (Odds ratio 3.16, IC 95 % [2.40, 4.17] $P < 0.001$) par rapport autres génotypes II et ID.

- Le génotype II aurait un rôle protecteur contre le développement de l'IRT (II versus DD+ID OR= 0.43 IC 95 % [0.32, 0.59] $P < 0.001$) toutes les populations à l'exception de la population égyptienne.

Selon les différentes populations étudiées, l'allèle D/génotype DD étaient associés au risque d'IRT dans la population égyptienne et les populations irakienne d'Al Najaf et d'Anbar, cependant l'association de l'allèle D/génotype DD avec le risque de l'IRT chez la population irakienne de Babylone n'a pas été observé. De même que le génotype DD dans la population malaisienne.

Une corrélation positive a été retrouvée entre le polymorphisme I/D du gène *ACE* et la survenue de l'IRT dans la population globale mais pas dans toutes les populations étudiées.

Mots clés : Insuffisance rénale terminale (IRT), polymorphisme I/D, gène *ACE*, progression de l'insuffisance rénale chronique (IRC).

Summary

CKD is a worldwide public health problem widely distributed in the world. It progresses quickly, silently and independently of the original illness which can lead to ESRD. Several factors and mechanisms contribute to the development and the outcome of ESRD. Many studies have been conducted to investigate a possible relationship between *ACE* gene I/D polymorphism and ESRD, but the findings were controversial.

The aim of this work is to achieve a review of scientific literature to examine the data reports published about *ACE* gene I/D polymorphism in the intention to provide a conclusion more reliable in the meaning of this association.

To this end, we have selected five case-control studies after interrogating different databases. The results of each article were extracted and analyzed. The Odds ratios (OR) and the 95% confidence intervals (CI) were calculated by the “Epi Info 7.0” software.

The overall analysis of the populations studied showed that:

- The D allele was in very strong association with ESRD (D versus I OR = 1.70 95 % CI [1.42, 2.03] P < 0.001), The DD genotype tripled the risk of ESRD (Odds ratio 3.16, CI 95% [2.40, 4.17] P < 0.001) compared to other genotypes II and ID.

- Genotype II might have a protective role against the development of ESRD (II versus DD + ID OR = 0.43 95% CI [0.32, 0.59] P < 0.001) with the exception of the Egyptian population.

According to the different populations studied, the D Allele / DD genotype was associated with the risk of ESRD in the Egyptian population and the Iraqi populations of Al Najaf and Anbar, however the association of the D allele / DD genotype with the risk of ESRD in the Iraqi population of Babylon has not been observed. As is the DD genotype in the Malaysian population.

A positive correlation was found between the I/D polymorphism of the *ACE* gene and the occurrence of ESRD in the general population but not in all the populations studied.

Key words: polymorphism I/D, End stage renal disease ESRD, *ACE* gene, progression of chronic kidney disease.

المخلص

القصور الكلوي المزمن هو مشكلة صحية عامة منتشرة في جميع أنحاء العالم يتطور بسرعة وبصمت وبطريقة مستقلة عن المرض المسبب الذي يمكن أن يؤدي إلى الداء الكلوي في مراحله الأخيرة. تساهم عدة عوامل وآليات في تطور الداء الكلوي في مراحله الأخيرة. تم إجراء العديد من الدراسات لاستقصاء العلاقة المحتملة بين تعدد الأشكال الجينية *I/D ACE* ومرض الكلى المزمن في مراحله الأخيرة.

الهدف من هذا العمل هو إجراء مقارنة لمقالات علمية حول تعدد الأشكال الجينية *I/D ACE*، والداء الكلوي في مراحله الأخيرة بقصد تقديم استنتاج موثوق أكثر حول أهمية هذا الارتباط

من اجل تحقيق هذه الغاية قمنا باستجواب عدة مواقع علمية واخترنا خمسة دراسات من نوع حالة شاهد. ثم قمنا باستخراج نتائج كل مقال وتحليلها، حساب نسب الارجحية وفواصل الثقة باستعمال برنامج Epi Info 7.0.

- التحليل العام لمختلف المقالات المدروسة اوضح ما يلي: الأليل D كان جد مرتبط مع مرض الكلى المزمن في مراحله الأخيرة ($P < 0.001$ [1.42, 2.03] IC 95% D versus I OR=1.70)، النمط الوراثي DD ضاعف خطر المرض الكلوي في مراحله الاخيرة بثلاثة مرات ($P < 0.001$ [2.40, 4.17] IC 95% Odds ratio 3.16)، مقارنة بالأنماط الوراثية الأخرى.
- النمط الوراثي II قد يكون له دور وقائي ضد تطور مرض الكلى في مراحله الأخيرة ($P < 0.001$ [0.32, 0.59] IC 95% II versus $DD+ID$ OR= 0.43)، حيث كان هذا الدور واضح في كل المقالات المدروسة ماعدا المقالة الخاصة بالسكان المصريين لم يكن له دور وقائي.

انطلاقا من المجموعات السكانية المدروسة الأليل D والطابع الوراثي DD كانا على ارتباط مع خطر المرض الكلوي في مراحله الاخيرة وهذا بالنسبة للشعوب المصرية والعراقية لمنطقتي كل من الانبار والنجف، اما بالنسبة لمنطقة بابلون فقد كان هناك غياب كلي لهذا الارتباط، نفس الشيء بالنسبة للنمط الوراثي DD فيما يخص شعوب ماليزيا.

في الختام تم الحصول على ارتباط بين تعدد الأشكال الجينية *I/D ACE* ومرض الكلى المزمن في مراحله الأخيرة.

الكلمات الدالة: التغير الجيني *I/D*، الجينات *ACE*، مرض الكلوي في مراحله الأخيرة، تطور القصور الكلوي المزمن.

Noms : CHELLOUF Rimal

NECER Meriem

Année universitaire : 2019/2020

Polymorphisme I/D du gène ACE chez les hémodialysés

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention de Master en Biochimie appliquée

Résumé

Introduction

L'IRC est un problème de santé publique largement répandu dans le monde. Elle progresse rapidement, silencieusement et d'une manière indépendante de la maladie causale pouvant aboutir à l'IRT. Plusieurs facteurs et mécanismes contribuent au développement de l'IRT. De nombreuses études ont été réalisées pour rechercher une éventuelle relation entre le polymorphisme I/D du gène ACE et la survenue de l'IRT mais les résultats demeurent controversés.

Objectif

L'objectif de notre travail est de réaliser une analyse d'articles pour examiner les rapports de données publiées sur le polymorphisme I/D du gène ACE et l'IRT dans l'intention de fournir une conclusion plus fiable sur la signification de cette association.

Méthodes

Nous avons sélectionné cinq études cas-témoins après l'interrogation des différentes bases de données. Les résultats de chaque article ont été extraits et analysés. Les **Odds ratios** (OR) et les intervalles de confiance (IC) à 95% ont été calculés par le logiciel « **Epi Info 7.0** ».

Résultat

L'analyse globale des populations étudiées a montré que:

- L'allèle D était en très forte association avec l'IRT » (D versus I OR=1.70 IC 95% [1.42, 2.03] P < 0.001), le génotype DD a triplé le risque d'IRT (Odds ratio 3.16, IC 95% [2.40, 4.17] P<0.001) par rapport autres génotypes
- Le génotype II aurait un rôle protecteur contre le développement de l'IRT (II versus DD+ID OR= 0.43 IC 95% [0.32, 0.59] P < 0.001), chez toutes les populations à l'exception de la population égyptienne.

Selon les différentes populations étudiées, l'allèle D/génotype DD étaient associés au risque d'IRT dans la population égyptienne et les populations irakienne d'Al Najaf et d'Anbar, cependant l'association de l'allèle D/génotype DD avec le risque de l'IRT chez la population irakienne de Babylone n'a pas été observée. De même que le génotype DD dans la population malaisienne.

Conclusion

Une corrélation positive a été retrouvée entre le polymorphisme I/D du gène ACE et la survenue de l'IRT dans la population globale mais pas dans toutes les populations étudiées.

Mots clés : Insuffisance rénale terminale (IRT), polymorphisme I/D, gène ACE, progression de l'insuffisance rénale chronique (IRC).

Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire. Faculté de Médecine Université Salah Boubendir Constantine 3.

Laboratoire de Biochimie CHU Constantine.

Jury d'évaluation : Président de jury : REZGOUN Mohamed Larbi (MC-A-UFM, Constantine 1).

Rapporteur : Pr. HANACHI Sabah

Examineur : Dr. ZEKRI Salima