

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Objectif	3
Chapitre I -Synthèse Bibliographique	4
1.1- Aspect clinique	4
1.1.1-Anatomie et physiologie du pancréas	4
1.1.2- Anatomie pathologique : l'insulite	4
1.1.3- Classification étiologique du diabète de type 1 (DT1)	5
a) diabète de type 1 auto-immun	5
b) diabète de type 1 idiopathique	6
1.1.4- Symptômes	6
1.1.5- Diagnostic et évolution	6
1.1.6- Traitement	6
1.1.6.1-Traitement par insuline	6
1.1.6. 2- Thérapie cellulaire	7
1.1.6.3- Immunothérapie	7
1.1.6.4- Greffe du pancréas	7
1.1.7- Complications	8
1.1.8- Prévention et conseils	9
1.2-Aspect génétique	10
1.2.1-Évaluation fonctionnelle des gènes candidats de la susceptibilité au DT1	11
1.2.2- Locus de susceptibilité héritée pour le DT1	14
1.2.3- Gène de l'insuline : le locus IDDM2	15
INS-VNTR	18
1.2.3.1- Mécanisme biologique de l'action du locus IDDM2	20
1.2.4- Gène CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)	22
1.2.4.1- Rôle de la molécule CTLA4	23
Processus de présentation de l'antigène aux cellules T par les molécules HLA classe II	24
1.2.4.2-les polymorphismes du CTLA-4 dans le DT1	24
Résumé de la signification génétique et fonctionnelle des SNP dans le gène CTLA4	25
1.3- Aspects immunologiques du DT1	26
1.3.1-Mécanisme de la réaction auto-immune dans le DT1	26
Pathogénie de la destruction des îlots de Langerhans	27
1.3.2 - les auto-anticorps dans la prédiction du DT1	28
1.3.3 -Marqueurs immunologiques du DT1	28
1.3.3.1- Anticorps anti-Cytoplasme des Îlots (ICA)	29
1.3.3.2- Auto-anticorps anti-insuline (IAA)	29
1.3.3.3- Auto-anticorps anti-acide-glutamique decarboxylase (GADA)	30
1.4-Facteurs de risques environnementaux du DT1	32
1.4.1-L'environnement prénatal	32
1.4.2- Le facteur de risque alimentaire	32
1.4.2.1- L'allaitement maternel	32
1.4.2.2- Le lait de vache	33
1.4.2.3- La vitamine D	33
1.4.3- Les infections	34
1.4.3.1- Les infections virales	35
1.4.4 – Les toxines	36
1.4.5-Les variations saisonnières du DT1	37
1.4.6-Les autres causes	37

SOMMAIRE

Chapitre 2 -MATERIEL ET METHODES	38
2.1 -Echantillonnage	38
2.2 - Analyses des échantillons	38
2.3- Prélèvement du sang	38
2.4- Mesure de l'indice de masse corporelle (IMC)	38
2.5- Extraction de l'ADN à partir du sang total	39
2.5.1- Méthode d'extraction au NaCl	39
2.5.2- Méthode d'extraction au phénol-chloroforme	40
2.6- Contrôle de la qualité de l'ADN	41
2.6.1- Pureté de l'ADN	42
2.7- La PCR (Polymérase Chain Reaction)	42
2.7.1- Principe	42
2.7.2- Échantillon	43
2.7.3- Matériels nécessaires pour la PCR	43
a.Biologique	43
b.Non biologique	43
2.7.4- Protocole de l'amplification	43
2.7.5- Procédure de la PCR	44
2.7.5- Avant la réalisation	44
Programme PCR pour le SNP +49 du gène CTLA4	44
Programme PCR pour le SNP -23 Hph1 du gène INS-VNTR	44
Programme PCR pour le gène HLA-DMB	45
2.8- Electrophorèses sur gel d'agarose	46
2.8.1- Principe	46
2.8.2- Procédure de l'électrophorèse sur gel d'agarose	46
2.8.2.1-Préparation du gel d'agarose	46
2.8.2.2-Dépôt des produits d'amplification. Observation du gel sous UV	46
2.8.4-Avertissement	46
Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION	47
3.1-Analyses statistiques	47
3.1.1- Effet du sexe dans le déclenchement du DT1	47
Distribution des diabétiques de type 1 et des témoins en fonction du sexe	47
Nombre et fréquences de nos échantillons	48
3.1.2- Effet de la consanguinité sur le déclenchement du DT1	48
Distribution des individus selon la consanguinité chez les DT1 et les témoins	49
Fréquence de la consanguinité	49
3.1.3 Effet de l'IMC sur l'apparition du DT1	50
Distribution de l'IMC dans notre échantillon	50
Moyenne générale de la distribution de l'IMC	51
3.2-Analyse moléculaire	52
3.2.1 - Extraction de l'ADN	52
Electrophorèse après extraction au phénol	52
3.2.2- Concentration et pureté de l'ADN	53
3.2.3- La PCR	53
Les données génotypiques	54
Electrophorèse après amplification du SNP -23Hph1 du gène INS-VNTR à Tm 55°C	55
Electrophorèse après amplification des différents gènes à Tm 54°C	56
Electrophorèse après amplification des différents gènes à Tm 54,5°C	57

SOMMAIRE

Electrophorèse après amplification du gène INS-VNTR à Tm 53°C	58
Electrophorèse après amplification du gène HLA-DMB à Tm 62°C	59
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	60
Références bibliographiques	61

ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique
ADA: Association Américaine du Diabète
ARN: acide ribonucléique
ATG: Anti-thymocyte globulin
AVC: accèdent vasculaire cérébral
ATD: Autoimmune thyroid diseases
CD: Coaster Differentiated
CPA: Cellule Présentatrice d' Antigène
CMH: Complexe Majeure Histocompatibilité
CNC: Couple Non Consanguin
CTLA4 +49 A/G : Cytotoxique Lymphocyte T Antigène -4
CSM: cellules souches mésenchymateuses
CV-B4: Coxsackievirus B4
DQA/B: haplotypes Alpha/ Béta
DR3/4: haplotypes
DNID: Diabètes Non Insuline Dépendant
DID: Diabètes Insuline Dépendant
DMSO: Dimethyl sulfoxide
HLA: Humaine Leucocyte Antigène
GADA: Autoanticorps anti-acide-glutamique decarboxylase
GWAs: genome-wide association scans
IA-2: insulinome antigène associé -2
IA 2 b: Islet cell antigen 2 beta
IAA: auto-anticorps anti-insuline
ICA: Anti-Cytoplasme des Ilôts
ICOS: T-Cell Co-Stimulator
IGF2: Insulin-Like Growth Factor 2
IMC: Index Masse Corporelle
InVS: Institut de Veille Sanitaire
IFN : Interferon
IL : Interleukin
INS: gène d'insuline

ABBREVIATIONS

IPCs: Insulin Productrice Cells
LADA: latent autoimmune disease of adulthood
LYP: lymphoid tyrosine phosphatase
LD: Linkage Disequilibrium
ND: Non Diabète
NFkB: nuclear factor-kappa B
OMS: Organisation mondiale de la santé
SNP: Single Nucléotide Polymorphisme
SPK: Simultaneous pancreas-kidney
SUMO4: Small Ubiquitin-related Modifier 4 Gene
TCR: T cell Receptor
T1DM: Type 1 Diabète Mellites
Th: T helper (cell)
T CD4+: Lymphocyte Cell Helper
RBA: Radio Binding Analyses
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM: rotations par minute
PAK: pancreas after kidney
PTPN22/LYP: Lymphoid protein tyrosine phosphatase
PH: protecteur haplotype
VNTR: Variable Number of Tandem Repeat
X²: Khi deux

INTRODUCTION

Le **diabète de type 1** représente 5 % à 10 % des cas de diabète observés dans le monde, bien loin derrière le diabète de type 2 (non insulino-dépendant). L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime à 180 millions le nombre total de diabétiques dans le monde et 10 à 15 millions souffrant du diabète de type 1.

La pathologie du diabète vient en deuxième position du classement des maladies chroniques derrière l'hypertension, en Algérie, selon la 3^{ème} étude nationale 2006. Le nombre de personnes atteintes de diabète est en progression, passant de 0,3% chez les sujets âgés de moins de 35 ans à 4,1% chez les 35 à 59 ans et 12,5% chez les plus de 60 ans [Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière Algérie 2009].

La prévalence totale, des diabétiques en Algérie est passée d'un million de personnes en 1993, à plus de 2 500 000 personnes en 2007, soit 10% de la population [OMS].

L'incidence du diabète de type 1 avant 15 ans est en progression ; dans la région de Constantine, l'incidence passe de 9,1 en 1997 à 12,3 pour 100 000 en 2002 [Belhadj M. et al 2005]. Dans la région de Tlemcen (Ouest Algérien) sur un échantillon la prévalence du diabète de type 2 (initialement appelé diabète non insulino-dépendant : DNID) est de 10,5 % et celle du diabète de type 1 (appelé insulino-dépendant : DID) de 3,7 %.

La prévalence globale du diabète à Tlemcen est alors de 14,2 %, les hommes 20,4 % étant plus touchés que les femmes 10,7 %. Cette prévalence globale est de 15,3 % en milieu urbain et de 12,9 % en milieu rural. Plus de 50 % des diabétiques ont au moins un membre de leur famille atteint de la maladie [Salah Zaoui et al 2007]. A Sétif et à Mostaganem la prévalence (tous les cas, nouveaux ou non, à un moment donné) augmente avec l'âge. La prévalence des tranches d'âge de 25 à 64 ans dans ces deux régions et par décennie est de 4,9 %, 4,8 %, 7,9 % et 8 % respectivement. Le diabète est donc près de deux fois plus fréquent après 45 ans d'après ces études

L'incidence du DT1 dans différents groupes ethniques est extrêmement variable, suggérant aussi bien la participation de déterminants génétiques que des éléments de l'environnement [Y. Park et al 2000].

Le diabète de type 1 est la conséquence d'une destruction des cellules β des îlots de Langerhans par un processus auto-immun, survenant sur un terrain génétique de susceptibilité et conduisant à une carence absolue en insuline. En dépit des recherches qui confirment

INTRODUCTION

l'implication de la consanguinité dans les problèmes de santé, certains pays perpétuent encore ce comportement.

Dans la région de l'ouest algérien, qui est connue pour son histoire de mariages consanguins, il ya un taux élevé de consanguinité [AOUAR et al 2009]. Ce fait pourrait augmenter le risque de développer un diabète de type 1, en favorisant la transmission des haplotypes HLA et gènes récessifs de la susceptibilité à l'exception des antigènes HLA qui sont communs aux deux parents.

Plus de 20 gènes montre une susceptibilité à l'apparition du DT1 et cette estimation est probablement basse.

Le première et le principal gène se situe sur le chromosome 6 au niveau des gènes ou du système HLA de classe II qui présentent l'association la plus forte avec le diabète de type 1 [Appleman Lj et al 2000 ; Rich, Surmin 1990]. Le deuxième c'est le gène de l'insuline qui est situé sur le chromosome 11 (Chr.11p15.5); le VNTR à l'extrémité 5' du gène de l'insuline régule l'expression de l'insuline au niveau du thymus, un polymorphisme dans l'extrémité 5' flanquant la région du gène de l'insuline a été considéré pendant deux décennies c'est le SNP -23 Hph1 du gène INS-VNTR.

Le gène CTLA-4 a été étudié comme un bon gène candidat pour le DT1, il est situé sur le chromosome 2(Chr.2q33) [Nistico L et al 1996], c'est un membre de la superfamille des immunoglobulines, ce gène est principalement exprimé par les cellules LT activées comme molécule de co-stimulation [Tong Sun et al 2010]. La plupart des études épidémiologiques ont porté sur le polymorphisme +49 A /G. Il est la preuve de forts déséquilibres de liaison.

INTRODUCTION

L'Objectif

Compte tenu des statistiques élevées du diabète de type 1 et l'absence des études génétiques qui donnent la susceptibilité génétique du DT1 en Algérie.

Nous avons réalisé un travail en deux volets, sur une population de l'ouest Algérien.

- Dans le premier volet, épidémiologique, nous avons essayé de mettre en évidence les effets de la consanguinité, du sexe et de l'indice de masse corporelle sur le diabète de type 1, dans notre population.
- Dans un deuxième volet, moléculaire, nous avons réalisé des extractions d'ADN à partir de sang puis une amplification par PCR de deux régions décrites comme présentant une susceptibilité au diabète de type 1 dans d'autres populations.

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

1.1 Aspect clinique

1.1.1 Anatomie et physiologie du pancréas

Le pancréas est un organe à sécrétion endocrine et exocrine c'est à dire qu'il fabrique des hormones déversées dans le sang et des enzymes digestives déversées dans le duodénum. Les îlots de Langerhans, amas de cellules dispersés dans tout le pancréas, sécrètent des hormones, l'insuline surtout, qui est produite par la cellule bêta, mais aussi le glucagon, la somatostatine et d'autres hormones produites par les cellules dites non bêta.

Environ 80 % de la masse glandulaire du pancréas est responsable de la sécrétion exocrine c'est à dire des enzymes responsables de la digestion des protéines, des triglycérides et des glucides alimentaires.

Les enzymes pancréatiques sont sécrétées en excès et la maldigestion ne survient que si plus de 90 % de la glande a été détruite (par exemple alcoolisme). Situé, dans la partie supérieure de l'abdomen, le pancréas est un organe profond expliquant les difficultés de diagnostic précoce en cas d'affection le concernant.

Il comprend 4 parties : La tête et l'isthme qui s'insèrent dans le cadre du duodénum, le corps et la queue qui se prolongent jusqu'au bord de la rate [Heinz Feneis, Wolfgang Dauber 2000].

1.1.2 Anatomie pathologique : l'insulite

L'insulite, infiltrat inflammation des îlots de langerhans, est la caractéristique histologique du diabète de type 1. L'étude de l'insulite chez l'homme se heurte à des limites évidentes les techniques d'imagerie, utilisant par ligand radiomarqués des lymphocytes T, sont balbutiantes et les rares études histologiques de biopsie pancréatique sous laparoscopie ont donné des informations partielles. Le pancréas endocrine de sujets décédés dans la semaine et suivant le diagnostic contient toujours des îlots qui comportent des cellules β ; leur pourcentage augmente parallèlement à l'âge de découverte du diabète.

La masse résiduelle de cellules β au moment du diagnostic n'a pu être appréciée de façon fiable que dans de rares cas ; chez l'enfant elle serait de 20%. Les cellules β présentent des aspects de dégranulation et de vacuolisation ou au contraire d'hyperactivité. Il a longtemps été considéré que la capacité de régénération des cellules β est pratiquement nulle. Une insulite est observée chez tous les enfants, mais moins de 50% Chez des sujets adultes. L'insulite est spécifique des îlots qui contiennent encore des cellules β et respecte les autres qui prennent un aspect désorganisé et atrophique [Mohamed A. 2005].



Chapitre I -Synthèse Bibliographique

Différents aspect d'insulite peuvent être observés :

- ✓ Infiltrat péri-insulaire par des macrophages (possible stade précoce)
- ✓ infiltrat lymphocytaire péri-insulaire (péri-insulite)
- ✓ ou pénétrant les îlots

La destruction des cellules Semble rapidement complète chez le petit enfant, alors que 40% des sujets de plus de 15 ans conservent à long terme des cellules β qui échappent à l'infiltrat inflammatoire [GUY GORCHOV, THOMAS PAPO 2000].

1.1.3 Classification étiologique des diabètes type 1

La classification étiologique des diabètes sucrés a été proposée par l'ADA (l'Association Américaine du Diabète) et l'OMS. Cette classification actualise en fonction des données scientifiques récentes, celle du National Diabetes Data Group [National Diabetes Data Group 1979].

Les termes de diabète de type 1 (chiffres arabes) remplacent le terme DID :

Le diabète de type 1 correspond à la destruction des cellules β aboutissant habituellement à une carence absolue d'insuline.

Il est divisé en 2 sous types

a) Le diabète de type 1 auto-immun.

Au cours duquel la destruction des cellules β par un processus auto-immun est confirmée par la présence d'anticorps anticellules d'îlots, anti-insuline, anti-glutamate décarboxylase (GAD), anti-tyrosine phosphatase IA-2 et IA 2 b.

Cette forme est fortement associée aux gènes HLA- DQA et DQB et influencée par les gènes HLA-DRB. Ici, la destruction des cellules β peut être rapide (enfants et adolescents) ou plus lente (adultes).

D'autres affections auto-immunes peuvent être associées (maladie de Basedow, thyroïdite de Hashimoto, maladie d'Addison, vitiligo, maladie de Biermer).

Survenant généralement chez le sujet jeune (enfants, adolescents), le diabète de type auto-immun peut apparaître à tous les âges.

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

b) Le diabète de type 1 idiopathique.

Certains présentent une insulinopénie permanente avec céto-acidose d'origine inconnue ; cette forme à forte composante héréditaire est plus fréquente chez les sujets d'origine africaine ou asiatique. Chez les Africains, une forme voisine se caractérise par une céto-acidose révélatrice après laquelle l'insulinothérapie n'est pas indispensable.

1.1.4 Symptômes

Certains aspects cliniques sont communs aux deux formes principales insulinodépendante et non insulinodépendante du diabète sucré, leur mode classique de révélation est généralement différent.

Le diabète de type 1 se révèle le plus souvent sur un mode aigu, et affecte surtout l'enfant et l'adulte de moins de quarante ans. Le syndrome cardinal typique comprend l'apparition d'une polyurie diurne et nocturne associée à une soif intense (polydipsie), chiffrée à plusieurs litres par vingt-quatre heures. Une polyphagie avec un attrait pour les sucres est souvent notée. Paradoxalement, un amaigrissement rapide et massif de plusieurs kilogrammes est observé. Une fatigue plus ou moins prononcée ne tarde pas à apparaître. Parfois, des infections cutanéomuqueuses surviennent : folliculite ou furonculose, vulvovaginite ou balano-posthite selon le sexe [American Diabetes Association 2007].

1.1.5 Diagnostic et évolution

Le diagnostic du diabète repose sur les antécédents médicaux de la personne (les symptômes et autres troubles de santé) et sur les résultats d'analyses de sang et d'urine. Les analyses sanguines permettent de déceler les anomalies dans la concentration de sucre, tandis que l'analyse d'urine révèle la présence de glucose ou de corps cétoniques (déchets provenant de la dégradation des graisses et des protéines) [H. Rifkin & D. et al 1997].

1.1.6 Traitements

1.1.6.1 Traitement par insuline

Le traitement du diabète de type 1 consiste en l'injection pluriquotidienne d'insuline, à l'aide de stylos à insuline jetables ou non. Environ 7 à 8% des patients sont porteurs d'une

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

pompe à insuline externe. Le but de ces injections est de rendre la glycémie aussi régulière et aussi proche que possible de la normale.

Outre ces injections, le patient doit observer un régime alimentaire spécifique favorisant la consommation de sucres lents (pâtes, riz) et limitant les sucres rapides (sodas) [A. Grimaldi 2005].

1.1.6.2 Thérapie Cellulaire

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules progénitrices non hématopoïétiques multipotentes qui constituent aujourd'hui un outil thérapeutique prometteur pour la régénération et la réparation tissulaire.

L'insulinothérapie permet, en partie, de palier le déficit en insuline endogène et de contrôler la glycémie, mais ne représente pas un traitement curatif de la maladie.

Dans ce contexte, les thérapies cellulaires fondées sur l'utilisation de cellules productrices d'insuline (IPCs) dérivées des CSM représentent des perspectives thérapeutiques séduisantes. Dans cette revue, nous présentons les principales caractéristiques fonctionnelles des CSM ainsi que les données expérimentales qui suggèrent l'efficacité potentielle de la greffe de CSM ou de cellules dérivées des CSM dans le traitement du diabète de type 1 [L. Vija, D. Farge, et al 2009].

1.2.6.3 Immunothérapie Antithérapie Anti- Cellule -T Polyclonales

Diverses approches immunothérapeutiques ont été essayées avec un succès limité.

La quantité de globuline d'anti cellule T de lapin polyclonales (ATG) et pour les patients ayant le diabète de type 1, dans un délai de 4 semaines de diagnostic et présentant les niveaux toujours résiduels post -glucagon C-peptide, reste à plus de 0.3nmol/l. ATG a été administrée pendant qu'un premier comprimé de 9 mg/kg suivait 3 doses consécutives de 3 mg/kg [Frantisek Saudek et al 2004].

1.1.6.4 Greffe du pancréas

L'insuffisance pancréatique est associée au diabète insulino-dépendant qui reste la première indication de la transplantation pancréatique.

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

La greffe du pancréas implique d'implanter un pancréas sain (un qui peut produire de l'insuline) chez une personne qui a le diabète. Puisque le pancréas exécute des fonctions nécessaires dans le procédé de digestion, le pancréas indigène du destinataire est laissé en place, et le pancréas donné joint dans un endroit différent. En cas du rejet du nouveau pancréas, le destinataire ne pourrait pas continuer à survivre sans pancréas indigène en place. Le pancréas sain provient d'un donateur qui vient juste de mourir ou peut être une partie du pancréas d'un donateur vivant [Larsen JI 2004]. Les greffes entières de pancréas des donateurs vivants ne sont pas encore possibles parce que le pancréas est un organe nécessaire pour la digestion. Actuellement, des greffes de pancréas sont réalisées chez les personnes avec du diabète insulino-dépendant qui ont des complications graves.

Il y a trois types principaux de transplantation de pancréas :

Greffe simultanée de pancréas-rein (SPK), quand le pancréas et le rein sont transplantés simultanément du même donneur décédé.

- ✓ greffe de Pancréas-après-rein (PAK), quand une greffe cadavérique de donneurs de pancréas est exécutée après une précédente et différente greffe de donneur de rein.
- ✓ Seule la greffe de pancréas, pour le patient présentant le diabète de type 1 qui est habituellement grave, fréquentes hypoglycémies, mais à fonction proportionnée de rein.

Après une greffe du pancréas, le traitement immunosuppresseur est à prendre de manière très régulière et à vie [Fishman Ja, Rubin Rh. La 1998].

1.1.7 Complications

Les complications majeures, outre celles mentionnées plus haut, sont le rejet, l'infection et la pancréatite du greffon. Il est difficile de déceler le rejet chez ces patients porteurs d'une greffe isolée du pancréas, car la majeure partie du greffon peut être détruite par la réaction de rejet avant que les anomalies du métabolisme du glucose deviennent évidentes. Cependant, avec une compatibilité HLA excellente, on obtient un taux de survie du greffon de 80 %, comparable au taux global de succès des greffes de rein/pancréas [American Diabetes Association 2007].

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

1.1.8 Prévention et Conseils

Afin de limiter les complications dues au diabète de type 1, il est recommandé aux patients :

- ✓ d'avoir une hygiène buccodentaire rigoureuse : le diabète entraîne souvent des complications buccales (gingivite, parodontite) ; il convient donc de préconiser au patient un brossage personnalisé, l'utilisation d'un dentifrice et d'un bain de bouche antibactériens et une brosse à dents souple, tous adaptés aux problèmes de gencives.
- ✓ de prendre soin de leurs pieds : chaussures adaptées, chaussettes propres et sèches...
- ✓ de pratiquer une activité physique : marcher, bricoler, jardiner sont essentiels pour maintenir une glycémie équilibrée,
- ✓ d'avoir un régime alimentaire adapté : privilégier l'apport en sucres complexes et en fibres, limiter la consommation de lipides, manger en quantité raisonnable et dans le cadre du repas pour éviter les hyperglycémies souvent dues à la consommation isolée d'un aliment riche en sucre,
- ✓ de limiter la consommation d'alcool, notamment ceux qui apportent des glucides (bières, vins cuits comme certains apéritifs).

Lutter contre le diabète passe par une véritable éducation : le patient doit apprendre à être autonome, mesurer sa glycémie, interpréter les résultats et, si nécessaire, s'injecter l'insuline.

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

1.2 Aspect génétique

Au début des années 80, le développement de nouveaux outils pour l'analyse de la liaison génétique et le clonage de position avait pour résultat l'identification des gènes à la base de plusieurs affections héréditaires ; cependant, concernant le diabète de type 1, l'identification des gènes de susceptibilité fondamentaux a été lente, du fait que le mode de transmission restait inconnu.

Le seul grand facteur de risque pour le diabète de type 1 est d'avoir un jumeau monozygote possédant les troubles ; mais, la plupart des études placent le taux de concordance dans l'intervalle de 25% à 50% [Bell Gi, Horita S, Karam Jh 1984] ; ces taux reflètent la contribution familiale au risque, dont certains sont également environnementaux, diminuant le rôle des facteurs de risque génétique.

Ceci signifie que les facteurs environnementaux, familiaux et non familiaux, expliquent probablement une fraction importante du risque de développement du diabète de type 1.

Le risque pour le diabète de type 1 diminue quand la parenté génétique à un probant dans une famille diminue mais demeure élevé en fonction du risque de la population chez les parents consanguin de 1^{er}, 2^{ème}, et même 3^{ème} degré. Le risque pour les enfants d'un probant n'est pas différent de celui de la progéniture, d'où la proposition que la variance génétique dans le diabète de type 1 soit additive.

Sous un modèle strictement additif, le rapport entre la parenté génétique avec un probant et le risque de diabète de type 1 devrait être une fonction linéaire de la prévalence de la population. Cependant, un examen du risque de diabète de type 1 chez les parents du 2^{ème} et 3^{ème} degré suggère un rapport non linéaire.

Ceci est incompatible avec la possibilité qu'un locus unique explique à lui seul le risque, et est compatible aux modèles dans lesquels des gènes multiples se combinent selon un mode additif pour conférer le risque [Rich, Surmin 1990].

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

1.2.1 Évaluation fonctionnelle des gènes candidats de la susceptibilité au DT1

L'étude de gènes candidats a été longtemps la principale méthode pour l'identification des gènes de susceptibilité au diabète de type 1, ce qui a permis la découverte de HLA, INS, PTPN22, CTLA4 et IL2.

Toutefois, bon nombre d'études qui reposaient sur cette stratégie ont été largement sous-estimés, en raison des limites de l'information génomique et du génotypique, ainsi que la taille limitée des cohortes disponibles.

Depuis, cette situation a évolué, avec les grands progrès technologiques et méthodologiques survenus au cours des dernières années, et la disponibilité de plus grandes cohortes ont abouti à la faisabilité de balayage du génome en entier (genome-wide association scans "GWAs"), qui disposent désormais de la puissance d'études d'associations sans hypothèse. Bien que ces études conduisent à l'identification d'un nombre croissant de SNP (single-nucleotide polymorphisms) associés au DT1, ceux-ci se trouvent souvent à une certaine distance du gène responsable de causalité; la variante comme une conséquence des régions prolongées de déséquilibre de liaison sur le génome.

En revanche, les gènes candidats ont été choisis en fonction de leurs rôles connus ou putatifs dans la fonction immunitaire et auto-immunitaire où la fonction cellulaire des cellules β et les résultats d'association positive fourni une preuve directe du mécanisme de la maladie. Par conséquent, l'examen des gènes candidats, avec la charge d'explorations antérieures de ces gènes, est apparue comme une source prometteuse pour identifier et/ou confirmer les gènes associés au DT1 ou de nouveaux SNP associés à des gènes connus, en utilisant la meilleure technologie disponible et la meilleure information génomique, ainsi que la grande taille des cohortes.

Le progrès a été accompli en étudiant les facteurs génétiques impliqués dans le développement du diabète de type 1 (D T1) pendant les dernières années tandis que La cartographie de déséquilibre de liaison (DL) a été utile à la fois à la confirmation et la cartographie fine des intervalles de sensibilité, Ainsi que l'identification de mutations

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

étiologiques et l'identification des gènes responsables de maladies spécifiques définies et limitées à des gènes candidats connus.

Le risque global pour les diabétiques de type 1 de la molécule HLA DR et DQ (IDDM1) est déterminé par des combinaisons des allèles polymorphes.

Des études fonctionnelles indiquent que cette susceptibilité, est liée au HLA DR-DQ protecteur et présente des peptides non –recouvrant.

Bien que la preuve de liens constants ait été signalée pour l'intervalle de susceptibilité d'IDDM2, IDDM5 et IDDM12, la preuve pour la plupart des autres intervalles varie dans différents ensembles de données.

Le nombre variable des répétitions en tandem du VNTR à l'extrémité 5' du gène de l'insuline règle l'expression de l'insuline au niveau du thymus, Un polymorphisme dans l'extrémité 5' flanquant la région du gène de l'insuline (INS) sur le chromosome 11p15.5 a été considéré pendant deux décennies c'est le SNP -23 Hph1. Il se compose d'un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR), également dénommé un polymorphisme de minisatellite, situé dans la 365^{ème} pb en amont de l'INS, en dehors des séquences codantes [38] il ya répétition en tandem d'un oligonucléotide de 14 à 15 pb qui est lié à une séquence consensus ACAGGGGTGTGGGG.

Le nombre de répétitions montre une distribution bimodale avec des allèles regroupant soit à 30-60 répétitions (classe I) ou 120-170 répétitions (classe III), avec des tailles intermédiaires (classe II) très rares. L'homozygotie pour l'allèle de la classe I confère un risque relatif de 2-3 contre la présence d'au moins un allèle de classe III. Inversement, les allèles de classe III, moins fréquents ont un effet protecteur dominant [Knerr I.; Wolf J. et al 2005].

Le polymorphisme des INS-VNTR n'affecte pas la séquence peptidique d'insuline. Par conséquent, et compte tenu de sa situation en amont du promoteur de l'INS, ses effets biologiques sont les plus susceptibles aux différences alléliques dans les niveaux de transcription d'INS.

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

Les études sur IDDM5 ont mené à la découverte d'un polymorphisme 163 A →G (substitution méthionine-valine au codon 55 M55V) dans le gène SUMO4, ce qui s'est Avéré être associé au DT1 chez les patients d'origine asiatique.

Fonctionnellement le SUMO4 conjugué à IκB alpha règle négativement la voie transcriptionnelle. La substitution de M55V réduit l'activité de simulation de la variante V55, qui a pour conséquence une activité dépendante plus élevée de la transcription de NFκB [D. Kantárová, M. Buc 2006].

Les polymorphismes du gène CTLA4 (IDDM12) codant une molécule de régulation dans la réponse immunitaire du DT1 et des maladies thyroïdiennes auto-immunes (ATD). Dans des désordres complexes, comme démontré par des changements quantitatifs des gènes candidats contribuent à la destruction auto-immune des tissus.

D'ailleurs, on a identifié deux facteurs de transcription dans le cas des mutations, qui sont responsables de maladies auto-immunes graves et qui nous ont mené à une meilleure compréhension de la tolérance des cellules T [Mein Ca et al 1998].le CTLA-4 est considéré comme le troisième gène de susceptibilité du DT1 et a été associé à des niveaux élevés de CTLA4 soluble et dans la régulation des cellules LT.

En Algérie, dans l'ouest à Oran [Benhamamouch et al 1992] ont montré que l'observation des fréquences haplotypiques et alléliques de HLA-DQA1, DQB1 et DRB1 et leurs associations au diabète étaient, à part quelques différences mineures, comparables à ceux observés en France.

Les études des gènes candidats susceptibles ont également identifié le gène de l'insuline sur le chromosome 11 comme deuxième facteur génétique de susceptibilité, contribuant à 10% de susceptibilité génétique au DT1; des formes plus courtes d'une (VNTR) dans le promoteur de l'insuline sont associées à la susceptibilité à la maladie, tandis que de plus longues formes sont associées à la protection.

Pendant la dernière décennie, l'analyse du génome en entier a montré qu'il existe au moins 15 autres locus liés au DT1, dont 2 gènes intimement associés avec l'activation de cellule-T ont été identifiés récemment.

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

1.2.2 Loci de susceptibilité héritée pour le DT1

Les gènes de susceptibilité impliqués dans le déclenchement du diabète de type 1 sont présentés dans le tableau 1 [D. Kantárová, M. Buc 2006].

Tableau 1
Loci de susceptibilité héritée pour le DT1

LOCUS	CHROMOSOME	Gène candidat ou Microsatellite
IDDM 1	6p21	HLA-DQ\DR
IDDM 2	11p15	Insulin VNTR
IDDM 3	15q26	D15s107
IDDM 4	11q13	MDU1, ZFM1, RT6, FADD/MORT1, LRP5
IDDM 5	6q24-27	ESR, MnSOD
IDDM 6	18q12-q21	D18s487, D18s64, JK (Kidd locus)
IDDM 7	2q31	D2s152, IL-1, NEUROD, GALNT3
IDDM 8	6q25-27	D6s264, D6s446, D6s281
IDDM 9	3q21-25	D3s1303
IDDM 10	10p11-q11	D10s193, D10s208, D10s588
IDDM 11	14q24.3-q31	D14s67
IDDM 12	2q33	CTLA-4, CD28
IDDM 13	2q34	D2s137, D2s164, IGFBP2, IGFBP5
IDDM 14	?	NCBI # 3413
IDDM 15	6q21	D6s283, D6s434, D6s1580
IDDM 16	?	NCBI # 3415
IDDM 17	10q25	D10s1750-D10s1773

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

1.2.3 Gène de l'insuline : le locus IDDM2

En 1974, les scientifiques ont découvert que des variantes particulières des gènes du CMH étaient fortement associées au diabète de type 1 ; les personnes qui héritent des variantes DR3 et DR4 sont exposées à un risque de développer un diabète 10 à 20 fois supérieur par rapport à d'autres personnes, par contre, ceux qui héritent de la variante DR2 bénéficient d'une forte protection [Merriman 2004]. La contribution génétique la plus importante au risque de diabète de type 1 est codée dans le complexe HLA sur le chromosome 6 sur le bras court [Concannon P. 1998].

Mais de nombreux facteurs montrent que le caractère génétique du diabète de type 1 n'est pas uniquement lié à ce système. En 1984, une association génétique entre le diabète de type 1 et une région polymorphe localisée à l'extrémité 5' du gène de l'insuline a été rapportée pour la première fois dans une étude cas-témoins [Bell et al 1984].

Ainsi, la région du gène de l'insuline (INS) localisé au niveau du chromosome 11 sur le bras court est probablement la deuxième plus importante contribution génétique à la variation de la susceptibilité au diabète de type 1 ; elle contribue pour 10% au risque génétique du diabète [Bain et al 1992] ; le gène de l'insuline fut admis comme deuxième gène candidat avant même l'avènement des approches par l'étude systématique du génome [Lucassen et al 1993].

La région codante pour l'insuline est située plus précisément sur le chromosome 11p15.5 et les premières descriptions de polymorphismes l'ont initialement rattachée au diabète non insulino-dépendant.

La variation de cette région comprend en fait 2 types de polymorphismes ; d'une part, les travaux de Lucassen et Julier (1993) ont montré l'existence de mutations ponctuelles en amont et dans le gène de l'insuline, dont certaines sont fréquentes chez les sujets diabétiques de type 1 ; l'autre variation est l'existence de mini-satellites formés d'unités répétitives de 14 paires de bases, en nombre plus ou moins important, ce sont des séquences répétées en tandem (VNTR) avec le consensus ACAGGGGTSYGGGG [Lucassen et al 1993].

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

Le VNTR "insulin/IGF-2" (INS-IGF2 VNTR) est situé à l'extrémité 5', à environ 600 pb du site de début de la transcription de l'INS ; il représente un marqueur VNTR, dont les allèles sont divisés en 3 classes principales selon leur taille :

Court (classe I), intermédiaire (classe II), et long (classe III), présentant respectivement 40, 85 et 157 unités en moyenne [86]. Dans les populations caucasiennes, ce VNTR est représenté par 2 principales classes, les allèles courts de la classe I ont entre 26 et 63 unités de répétition, et les allèles de la classe III ont entre 141 et 209 unités de répétition. Les allèles intermédiaires de la classe II sont rares dans les populations européennes blanches [Stead et al 2000].

Les différentes études épidémiologiques ont montré que les allèles de la classe I au INS VNTR confèrent une susceptibilité au diabète de type 1, par la présence plus fréquente de cette classe chez les diabétiques [Bain et al 1992].

Des études sur les polymorphismes des régions flanquantes rapportaient que cette association était limitée aux marqueurs compris dans un intervalle de 19 kb [Owerbach et Gabbay 1994]. La découverte d'une association entre les allèles de la classe I du VNTR de l'insuline et le DT1 a suggéré qu'un gène (ou plusieurs gènes) dans la région ait contribué à la susceptibilité de la maladie, mais puisque le VNTR n'a pas affecté la région codante d'un gène connu, des polymorphismes additionnels dans et autour du gène de l'insuline et des gènes flanqués, à savoir le facteur de croissance insuline-like (IGF2) et la tyrosine hydroxylase (TH), ont été identifiés [Lucassen et al 1993]. Ces sites polymorphes ont montré des degrés similaires d'association avec le diabète de type 1 chez les patients et les témoins [Julier C, Lucassen A, Villedieu et al 1994].

D'autres études ont mis en évidence une association du diabète de type 1 avec un fragment d'ADN de 4,1 kb incluant le gène de l'insuline et ses régions flanquantes en 5' et 3' sur le chromosome 11p15.5. Dans cet intervalle de 4,1 kb existaient 10 variantes, le VNTR et 9 SNPs. De ces 10 candidats, les associations à la maladie les plus fortes étaient avec le VNTR et les SNP -23HphI et +1140A/C [Lucassen et al 1993].

Un certain nombre d'études additionnelles [Barbara Heude, Clive J. 2006] ont exclu les SNPs de la région de 4,1 kb et ont laissé au VNTR la proposition de variante étiologique

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

[Bennett & Todd 1996]. Cette proposition a été principalement basée sur l'association différentielle des haplotypes influencé par VNTR classe III, l'haplotype protecteur (PH) et l'haplotype très protecteur (VPH) [Bennett et al 1995], un phénomène plus facilement expliqué par la variation de séquences dans le VNTR plutôt que les effets cis des allèles SNP sur ces haplotypes. En outre, les études d'expression [Paquette, J. et al 1998] suggéraient que le VNTR pourrait directement changer la transcription de l'INS et de l'IGF2. Cependant, la cartographie fine de la susceptibilité IDDM2 au VNTR était très dépendante à l'idée de base que l'association était limitée à l'intervalle de 4,1 kb. On pouvait conclure qu'un polymorphisme majeur, correspondant au locus IDDM2, a été identifié au sein du VNTR localisé dans le promoteur du gène de l'insuline.

Dans chacune des classes, il a été possible d'isoler un certain nombre d'allèles en fonction du nombre précis d'unités répétitives. Alors que l'allèle nommé 307 de la classe III est le plus fréquent dans la population caucasienne prise en tant que témoin, l'allèle le plus représenté chez les enfants insulinodépendants est l'allèle nommé 814 de la classe I. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Bennett qui montraient des variations d'expression in vitro du gène de l'insuline en fonction de la classe du VNTR [Bennett et al 1995].

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

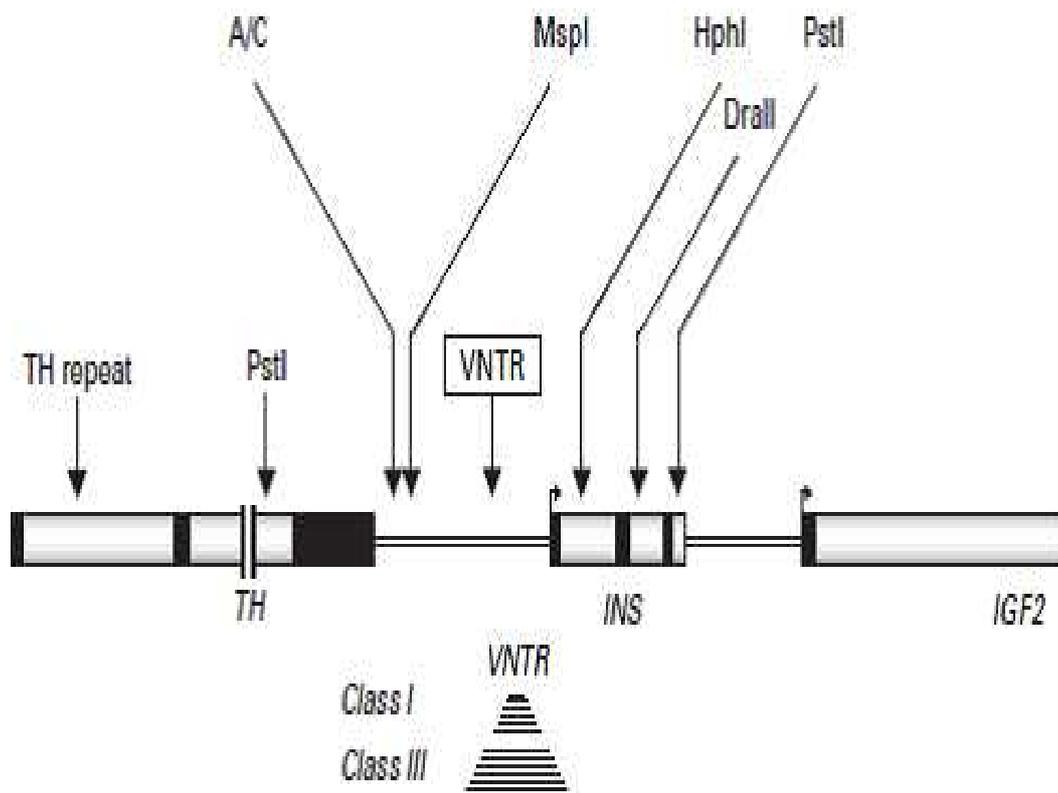


Figure 1.

Insulin VNTR minisatellite repeats

INS= Insulin; TH =Tyrosine Hydroxylase; IGF2= Insulin-Like Growth Factor II [36].

La classification des cas par le typage HLA a suggéré des risques relatifs plus élevés liés à l'homozygotie au niveau des polymorphismes du gène de l'insuline chez les patients qui avaient l'haplotype HLA-DR4. Les analyses des transmissions des allèles de l'insuline des parents hétérozygotes dans les familles multiplex ont révélé un excès de la transmission des allèles à 2 marqueurs, l'insuline VNTR 5' et un RFLP Pst I, spécifiquement aux individus affectés DR4+. Cet effet était significatif seulement pour les transmissions paternelles, soulevant la possibilité que l'impression, qui est connue pour se produire dans cette région du chromosome 11, puisse jouer un rôle dans la susceptibilité au diabète de type 1, par un effet sur IDDM2. Ces études ont été interprétées en cartographiant le locus IDDM2 à une région de 4,1 kb entourant le gène de l'insuline, bien qu'on ait proposé des interprétations alternatives [Lucassen et al 1993].

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

En 2005 Lander et al [Smith et Al 1997] ont montré que l'homozygotie pour le génotype INS prédisposant augmente la probabilité que les jumeaux identiques seront concordants pour le DT1.

La susceptibilité et la résistance de L'IDDM2 associées peuvent dériver des différences quantitatives dans la transcription d'INS dans la cellule présentatrice d'antigène CPA trouvées dans le thymus et les tissus lymphoïdes périphériques, où la production des antigènes du soi, comme proinsuline peut être cruciale pour l'élaboration et le maintien d'un auto-tolérant répertoire des cellules T [Rich, Surmin 1990].

En 1996, Doria et al ont rapporté l'association de la maladie avec un SNP dans la région 5' du gène de la tyrosine hydroxylase (TH) et réinterprété les résultats de Lucassen et al, et il est devenu possible de dire que la variante causale IDDM2 soit cartographié hors de la région de 4,1 kb.

D'un autre coté, Bennett et al (1995) ont effectué une analyse détaillée de l'association entre les haplotypes marqueurs au niveau d'IDDM2 et le diabète de type 1. Ils ont identifié les haplotypes marqueurs spécifiques qui étaient prédisposants ou protecteurs pour le diabète de type 1 et ont conclu, sur la base d'une comparaison des allèles à divers marqueurs présents dans ces haplotypes, que la susceptibilité au diabète de type 1 au niveau du locus IDDM2 est cartographié au niveau du VNTR lui-même. Des résultats similaires ont été rapportés [Owerbach et Gabbay 1994]. Le polymorphisme de ce locus est très complexe et les études sur les populations ont permis de définir 3 haplotypes principaux associant VNTR et 7 polymorphismes de restriction.

Dans le cadre de ces maladies polygéniques, il semblait important de déterminer les interactions potentielles entre les différents facteurs génétiques incriminés [Danze et al 1997].

En 2004, Barratt et al ont indiqué que, tandis que la susceptibilité à la maladie est localisé dans la région de 4,1 kb, il y avait, en plus du VNTR, 2 SNP candidats probables, -23HphI et +1140A/C. Après une analyse génétique plus détaillée de la région IDDM2 pour confirmer les incertitudes entourant la localisation de la variante causale, ils ont trouvé que la susceptibilité au diabète de type 1 dans cette région est localisée dans une région d'environ 2kb au niveau INS, dans l'un des 3 polymorphismes, ceci constitue une révision de la cartographie de l'INS VNTR [Faas et Trucco 1994]. Mais le VNTR reste le meilleur candidat,

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

puisque fonctionnellement, il contient les multiples sites de liaison pour les facteurs de transcription comme Pur-1 [Lew et al 2000], et la susceptibilité au diabète de type 1 au niveau de INS a été proposé pour apparaître à différents niveaux de l'expression thymique [Vafiadis P, Bennett St et al 1997], considérant qu'il n'y a aucun rôle fonctionnel évident pour les SNP candidats.

1.2.3.1 Mécanisme biologique de l'effet d'IDDM

La définition des mécanismes fondamentaux de la susceptibilité génétique a été un but important de recherche en diabète de type 1 pour un certain nombre de raisons ; l'identification des gènes qui contribuent au risque de diabète de type 1 devrait fournir de nouvelles données sur le mécanisme fondamental du développement de la maladie et créer de nouvelles opportunités thérapeutiques. La définition des facteurs génétiques qui prédisposent au diabète de type 1 devrait augmenter la capacité de prévoir qui dans la population peut avoir un risque de diabète de type 1, et une telle amélioration des prévisions peut faciliter le développement de nouvelles thérapies préventives ; les risques des thérapies avec effets secondaires potentiels pourraient être équilibrés en ciblant une population "à risque" hautement spécifique.

La forte évidence statistique de l'association entre le diabète de type 1 et les allèles du polymorphisme du VNTR de l'insuline suggèrent que la variation au niveau de ce site contribue à la susceptibilité de la maladie ; un mécanisme biologique est alors requis pour expliquer cet effet.

En raison de leur localisation dans la région promotrice du gène, les allèles INS pourraient influencer la régulation et donc l'expression de l'insuline. Les allèles de classe I (26-63 répétitions), prédisposent au diabète [Undlien et al 1995]. Leur présence à l'état homozygote augmente le risque de diabète d'un facteur de 2,5. A l'inverse, les allèles de classe III (140-200 répétitions) ont un effet protecteur, qui est dominant ; ils sont associés à une faible transcription de l'insuline dans le pancréas, mais à une plus forte expression dans le thymus [Pugliese et al 1997].

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

En examinant l'expression pancréatique du gène de l'insuline chez les individus hétérozygotes pour un polymorphisme dans le gène, Bennett et al ont démontré que, bien que l'expression était bi-allélique, le rapport des transcrits de chaque allèle variait avec l'identité des allèles du VNTR présent [Bennett et al 1995]. Kennedy et al 1995 ont démontré ensuite que la région VNTR était active comme régulateur de la transcription dans les cellules β pancréatiques. Puisque l'insuline est un auto-antigène connu des cellules β dans le diabète de type 1, la variation dans le niveau d'expression ou de la spécificité tissulaire de la transcription pourrait jouer un rôle dans l'induction régulatrice de la tolérance immunologique indépendante de l'expression dans les cellules d'îlot.

Deux études, compatibles avec cette possibilité, ont rapporté la transcription du gène de l'insuline dans le thymus [Vafiadis P et al 1997]. Dans les 2 cas, les allèles VNTR protecteurs de la classe III étaient associés à des niveaux élevés équilibrés de l'ARNm de l'insuline dans le thymus.

La preuve de l'expression thymique dans l'auto-tolérance est venue des études de surexpression transgénique [Derbinski et al 2001]. Les études utilisant les souris transgéniques ont établi que la susceptibilité à la sélection négative dépend de "l'avidité" du TCR et que l'auto-antigène thymique joue un rôle dépendant de la dose [Ashton-Rickardt 1994]. Plusieurs protéines spécifiques aux tissus, y compris les hormones, sont exprimées dans le thymus [Hanahan D 1998]. Il a été rapporté que l'insuline est produite par les cellules dendritiques thymiques rares dispersées dans la médullaire [Smith et al 1997].

Ces études suggèrent un modèle pour le rôle du gène d'insuline VNTR dans la susceptibilité du diabète de type 1 dans lequel la sélection négative des cellules T auto-réactives spécifiques à l'insuline dépend du niveau d'expression global de l'insuline dans le thymus. En effet, la présence de l'insuline à des taux élevés dans le thymus pourrait être à l'origine d'une induction de la tolérance secondaire à la délétion intra-thymique de clones T auto-réactifs anti-insuline, et ainsi pourrait expliquer la protection vis-à-vis du diabète.

Une étude a confirmé le fait que les niveaux d'expression thymique de l'insuline jouent un rôle critique dans la sélection des cellules T auto-réactives spécifiques à l'insuline et que le locus IDDM2 prédispose au diabète par les niveaux thymiques bas de l'expression de l'insuline par l'intermédiaire de l'échec de la sélection négative des cellules T auto-réactives

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

spécifiques à l'insuline [Chentoufi et Polychronakos 2002]. Il a été démontré une réponse des cellules T détectable à la pro-insuline chez les souris non-diabétiques avec une expression thymique déficiente en pro-insuline, une réponse absente chez les animaux exprimant des niveaux normaux ou presque dans le thymus. Le résultat était important, reproduit en sus de plusieurs expériences avec la pro-insuline et les épitopes spécifiques (peptide C et B:9-23 de la chaîne B).

Appliqué à la situation humaine, les résultats impliquent directement que la basse expression thymique de l'insuline liée aux allèles VNTR de prédisposition [Vafiadis P, et al 1997] pourrait être responsable de la génération de nombres élevés des LT auto-réactifs spécifiques à l'insuline. Le thymus étant l'organe où les précurseurs des cellules T subissent la sélection négative par apoptose s'ils rencontrent l'auto-antigène [Lew A et al 2000].

1.2.4 Gène de Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4)

La molécule CTLA-4 existe sous deux isoformes chez l'homme:

1-une isoforme de longueur totale (flCTLA-4) codée par les exons 1 à 4

2-une forme soluble (sCTLA-4) à laquelle manque l'exon 3 (domaines transmembranaires).

Chez la souris, l'isoforme flCTLA-4 et une forme indépendante du ligand (liCTLA-4) à laquelle manque l'exon 2. Le ratio de sCTLA-4 à flCTLA-4 formes d'épissage des ARN messagers dans les cellules non stimulées T CD4+ a été démontré qu'il est 50% inférieur chez les homozygotes pour la maladie par rapport aux allèles prédisposant le génotype de protection [M. J. Simmonds 2005].

Le gène CTLA-4 a été étudié comme un bon gène candidat pour le DT1, il est situé sur le chromosome 2 brin long bande 33 Chr.2q33 [Nistico L et al 1996], ce gène est également connu sous le nom de CD152, c'est un membre de la superfamille des immunoglobulines, ce gène est traduit en 223 acide aminé et est principalement exprimé par les cellules LT activées comme molécule de co-stimulation. Le CTLA-4 est similaire à une autre co-stimulation par la molécule CD28 des LT; les deux lient B7.1 et B7.2 sur les cellules présentatrices d'antigènes (APC), mais le CTLA-4 présente une affinité beaucoup plus élevée que CD28 [Tong Sun et al 2010].

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

Ce gène a été établi comme un important régulateur négatif de la fonction des cellules LT et la prolifération par le biais de multiples mécanismes, comme la réduction de la production des récepteurs d'interleukine à la fois IL-2 et arrêter la division des cellules LT à la phase G1 du cycle cellulaire. En plus de l'activation des cellules LT et inhibition de la prolifération LT, le gène CTLA-4 peut induire l'apoptose FAS ligand-indépendante des cellules T activées [Scheipers P et al 1998].

La structure du gène CTLA-4 est composée de quatre exons qui codent pour séparer des domaines fonctionnels: la séquence de tête, le domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique [30]. Ce chromosome contient également deux autres gènes candidats importants dans la fonction immunitaire CD28 et inductible T-cell co-stimulator ICOS (voir Figure 3).

Des polymorphismes du gène CTLA-4 sont associés aux maladies auto-immunes telles que la maladie thyroïdienne auto-immune, la sclérose en plaque, le lupus systémique Erythémateux « SLE [Marque O, Gough S et al 2007]. Son association avec le DT1 A été confirmée par plusieurs auteurs [Kathleen M. Gillespie 2006].

1.2.4.1 le rôle de la molécule CTLA4

La molécule de CTLA-4 est une molécule inhibitrice c'est à dire un régulateur négatif, exprimée par la cellule lymphocyte T active, se lie au B7-1 (CD 80) et au B7-2 (CD 86), sur les membranes des cellules présentant des antigènes (APCs). Elle régule alors négativement la réactivité des lymphocytes T par des mécanismes qui ne sont pas complètement élucidés. Il est à noter que le CTLA-4 est libéré, tout de suite après l'activation des lymphocytes T. Chez l'homme, certains polymorphismes du gène qui modifient les taux ou la fonction du CTLA-4, augmentent la susceptibilité au DT1 et aux autres maladies auto-immunes [Scheipers P et al 1998] (figure 2).

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

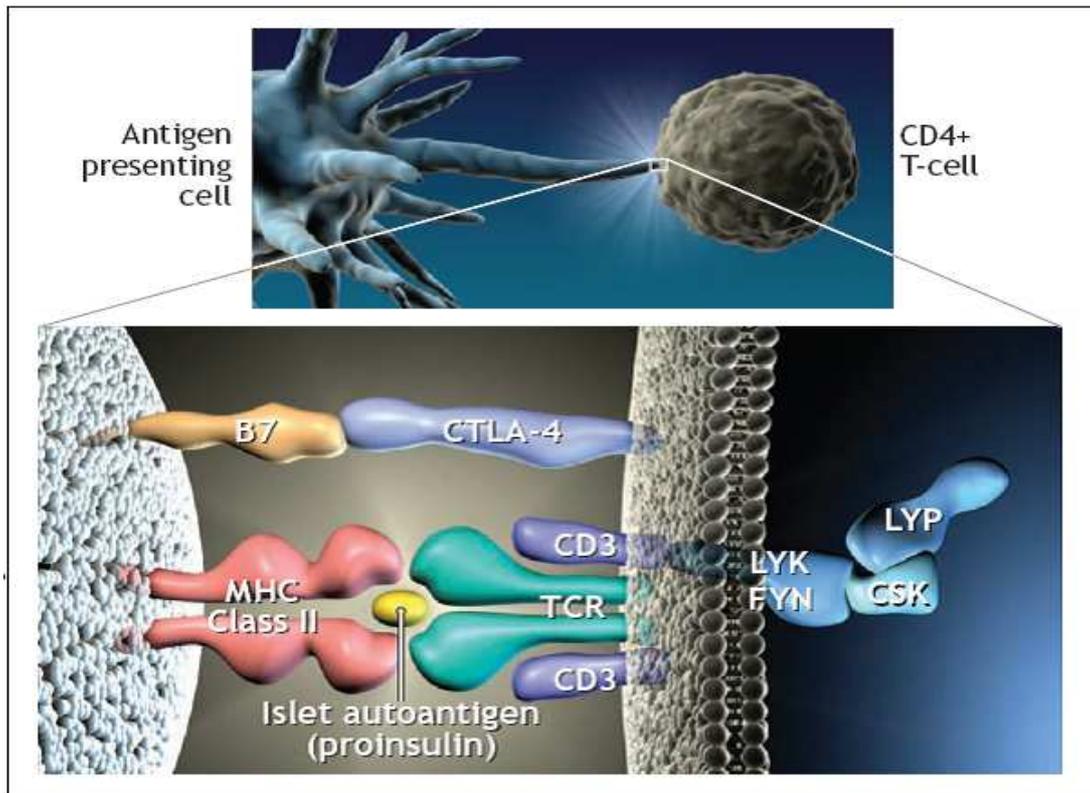


Figure 2

Processus de présentation de l'antigène (cas des peptides de proinsuline) aux cellules CD4 T par les molécules de classe II du système HLA.

1.2.4.2 les polymorphismes de CTLA-4 dans le DT 1.

Les gènes codant pour le CTLA-4 sont situés chez l'homme sur le chromosome 2 en position q33, ils sont composés de quatre exons qui codent pour séparer des domaines fonctionnels: la séquence de tête, le domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique. Il y a plusieurs sites polymorphes dans le gène CTLA-4 le polymorphisme C/T dans le promoteur -318, le polymorphisme A / G dans l'exon 1+ 49, le microsatellite (AT) n répété dans la région 3 'non traduite (UTR) de l'exon 4 et les 3 SNPs en 6,1 kb 3' dans la région non codante, CT60, JO31, et JO30 [Yu-Ching Weng et al 2005].

Certains de ces polymorphismes exercent une influence sur le niveau de prolifération lymphocytaire : ainsi que l'allèle G en position +49 de l'exon 1 qui est associé à un niveau élevé de prolifération alors que l'allèle A est lié à une capacité de prolifération réduite.

Chapitre I -Synthèse Bibliographique

L'allèle G pourrait donc être associé à une rupture de tolérance dans certaines maladies auto-immunes comme le diabète de type I [Toussiro E,Wendling D 2005].

La majorité des études génétiques moléculaires sur le gène CTLA-4 ont porté sur les polymorphismes suivants :

- ✓ SNP CT-318 à partir du codon d'initiation ATG dans le promoteur.
- ✓ le A/G+49 dans l'exon 1.
- ✓ la répétition de dinucléotides dans le 3'-UTR. Récemment.
- ✓ un autre SNP C / T -819 dans l'intron 1 de l'exon 2 qui ont montré une association significative avec plus de diabète de type 1 que le A/G+49 et les microsatellites.

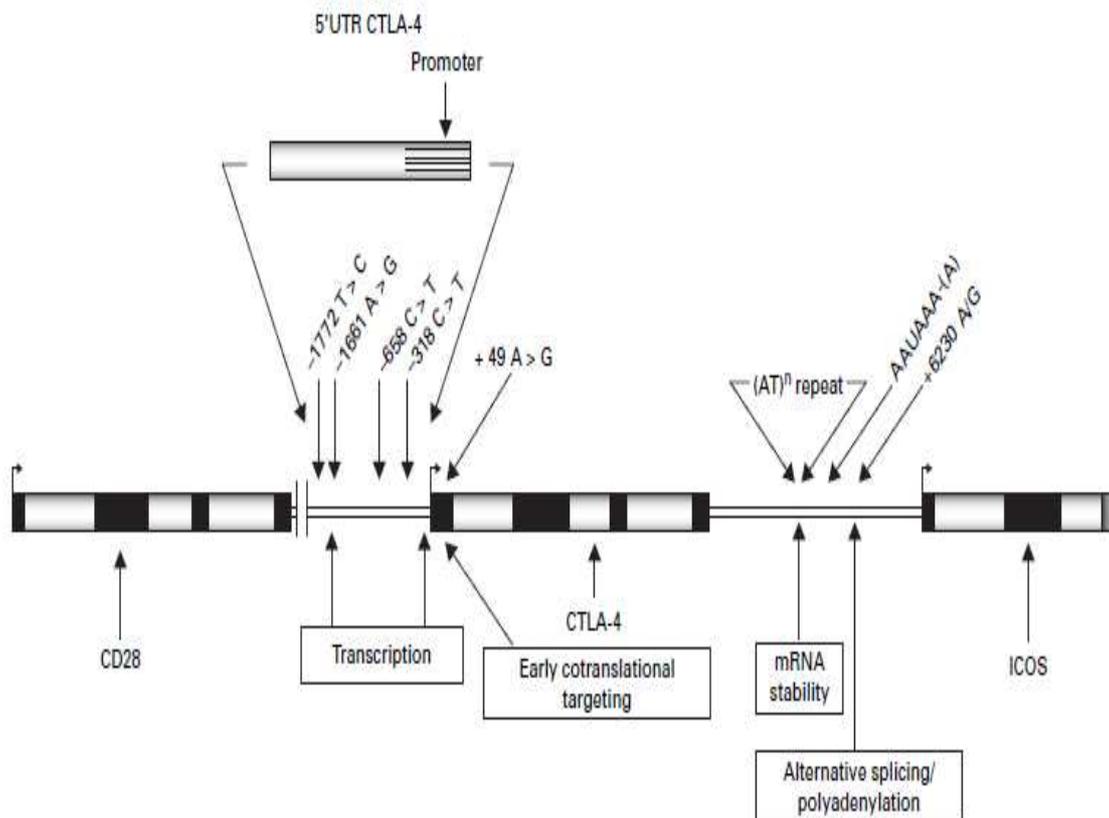


Figure 3

CTLA-4 sur le chromosome 2q33.

Résumé de la signification génétique et fonctionnelle des SNPs dans le gène CTLA-4.

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

1.3 Aspects immunologiques du diabète de type1 (DT1)

Le diabète de type 1 est causé par la destruction auto-immune spécifique et progressive des cellules bêta des îlots de Langerhans alors que les autres types de cellules dans l'îlot (alpha, delta et PP) sont épargnés. Les auto-antigènes du diabète de type 1A peuvent être divisés en sous-groupes en fonction de leurs distributions tissulaires : antigènes des cellules bêta-spécifiques comme l'insuline, les dérivés de l'insuline, et IGRP (Islet-specific Glucose-6-phosphatase catalytic subunit Related Peptide); antigènes neuroendocrine comme carboxypeptidase H, insulino antigène associé (IA-2), l'acide glutamique décarboxylase (GAD65), et E carboxypeptidase; et ceux exprimés de façon ubiquitaire comme la protéine de choc thermique 60 (un auto-antigène putatif du diabète de type 1).

La recherche d'auto anticorps dirigés contre les cellules β des îlots de Langerhans a été améliorée par l'identification des cibles moléculaires reconnues au sein des cellules endocrines du pancréas, essentiellement le glutamate décarboxylase (GAD), la tyrosine phosphatase IA-2 et l'insuline. Cependant, la recherche d'un seul type d'auto-anticorps n'est pas suffisante et dans la plupart des situations cliniques, il faut avoir recours à la détection de deux ou trois types d'auto-anticorps différents. Les principales indications cliniques de ces dosages sont le diabète insulino et non insulino dépendant et la prédiction du risque chez les individus à risque de diabète (maladies auto-immunes et diabète de type 1 dans la parenté).

1.3.1 Mécanisme de la réaction auto-immune DT1

Les macrophages ou les cellules dendritiques sont les premières cellules à infiltrer les îlots de Langerhans et semblent être impliqués à un stade précoce dans la pathogenèse du diabète de type I car leur inactivation résulte dans une prévention quasi-complète du diabète dans des souris NOD [Yoon et al. 1998]. La présentation des auto-antigènes des cellules β par les macrophages ou cellules dendritiques aux cellules lymphocytes LT helper CD4+ en association avec les molécules CMH-II est considérée comme l'étape initiale dans le développement du diabète auto-immun. Les CPA activés sécrètent l'IL-12 qui stimule les cellules LT CD4+ de type TH1. Les cellules LT CD4+ sécrètent de l'IFN γ et l'IL-2. L'IFN γ active les macrophages quiescents, qui à leur tour libèrent l'IL1 β , le TNF α et des radicaux libres toxiques (cytotoxique) pour les cellules β . L'IL-2 et d'autres cytokines induisent la

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

migration de lymphocytes T CD8+ périphériques vers les foyers inflammatoires au niveau des îlots de Langerhans. Les cellules LTCD8+ spécifiques des auto-antigènes des cellules β se différencient en lymphocytes cytotoxiques par reconnaissance des ces auto-antigènes liés aux molécules CMH-II en présence cellules LT CD4+.

Les cellules cytotoxiques provoquent une destruction cellulaire par libération de perforine et granzyme et une apoptose médiée par Fas CD95 [Yoon Jw 2005].

Le TNF α à l'instar des autres pathologies liées à une intolérance alimentaire joue un rôle majeur dans la pathogenèse du diabète de type I. il est directement impliqué dans la destruction des cellules β et des effets inflammatoires profonds en agissant directement sur les CPA et les lymphocytes T auto-réactifs [Christen et al 2001]. L'effet des cytokines est cependant variable. Il a été démontré qu'une cytokine peut donner, retarder ou accélérer le développement du diabète, en fonction de la dose, de la fréquence, de l'âge et de la nature du modèle animal étudié [Scheipers P 1998]. Le TNF α accélère la progression de la maladie à un stade précoce, aux stades avancés, l'induction de l'expression de TNF α annule le processus auto-immun par une réduction de l'activité lytique des cellules T CD8+ [Christen et al 2001]. La qualité de la réaction immune contre les cellules β est donc à côté de la spécificité de la reconnaissance de l'antigène un élément déterminant de la destruction de ces cellules (Figure 4).

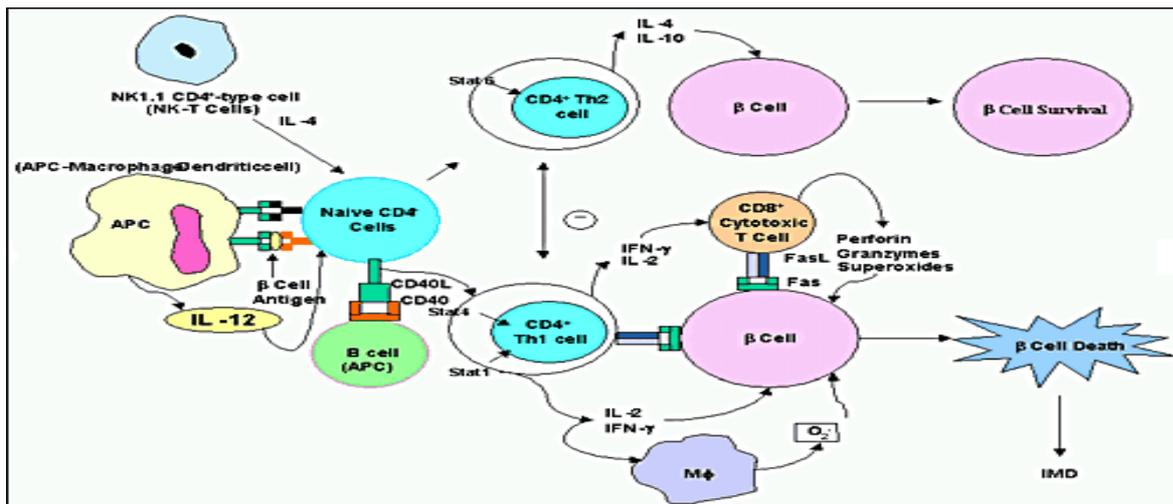


Figure 4

La pathogénie de la destruction des îlots de Langerhans.

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

1.3.2 Les auto-anticorps dans la prédiction du DT1

La présence d'auto-anticorps est observée des années avant l'apparition du diabète et ceux-ci continuent d'être produits après le diagnostic.

Les anticorps produits durant le processus auto-immun incluent les anticorps dirigés contre les cellules des îlots de Langerhans comme ; l'Anti-Cytoplasme des Ilôts (ICA), les auto-anticorps anti-insuline (IAA), l'Autoanticorps anti-acide-glutamique decarboxylase (GADA) et l'insulinome antigène associé -2(IA-2) [Achenbach P 2004].

Des études ont indiqué qu'il est possible de déterminer le stade du DT1 préclinique sur la base du nombre d'auto-anticorps détectables. Les IAA étaient les premiers ou parmi les premiers auto-anticorps à apparaître chez 96 % des enfants qui développaient de multiples anticorps, et la moitié des sujets chez qui de multiples anticorps apparaissaient à l'âge de 2 ans développaient le diabète à l'âge de 5 ans [Knip M.2002].

La prévalence des auto-anticorps GADA et IA2 chez les patients africains DT1 à Dar es-Salaam étaient beaucoup plus élevée que la prévalence d'ICA précédemment rapporté de la même clinique il y a environ 15 ans.

La prévalence des auto-anticorps relatifs pancréatiques dans cette population Africaine est considérablement inférieure à des prévalences trouvées chez les Caucasiens [Jjk Lutale et al 2007].

La fréquence des anticorps pancréatiques dans le DT1 change considérablement par rapport à l'âge des patients et à la provenance géographique, aussi bien qu'à la durée de la maladie. Jusqu'à maintenant, les auto-anticorps principaux décrits dirigés contre la cellule de l'îlot sont le (ICA), (GADA), (IA-2A) et (IAA) [R. Fakfak et al 2008].

1.3.3 Marqueurs immunologiques du diabète de type1

Plusieurs auto anticorps d'îlots ont été identifiés et servent à diagnostiquer cliniquement le diabète de type 1 (provoqué par le system Immunitaire), dans des cas

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

ambigus. Ces auto-anticorps servent également à prévoir le diabète de type 1 chez les individus non diabétiques. Les auto-anticorps d'îlot les plus utilisés incluent l'ICA, l'IAA, le GADA, et l'IA-2A. Et ceux de la maladie de la thyroïde (par exemple, TMA, TGA, ou thyroperoxidase auto-anticorps) et auto-immune gastrite lymphocytaire chronique (par exemple, GPCA).

Des données récentes démontrent également qu'une association entre la maladie cœliaque et le diabète de type 1, suggérant que la transglutaminase des auto-anticorps devrait également être cherchée. Ces autoanticorps sont de 2-7% chez les sujets DT1 ; de nombreux autoanticorps ont été détectés et sont présents au début du diabète de type 1.

1.3.3.1 Anti-Cytoplasme des Îlots (ICA)

Les personnes atteintes ou à risque de diabète insulino-dépendant (DID) ont souvent des auto-anticorps contre les antigènes cytoplasmiques d'une des cellules des îlots (ICA) considéré comme un sialoglycolipide.

L'ICA joue un rôle important comme marqueur sérologique de l'auto-immunité des cellules bêta.

Aucun des auto-anticorps d'îlot décrits jusqu'à maintenant n'est supposé jouer une fonction pathogène dans la destruction de cellules bêta ; 70% ou plus de Caucasiens sont ICA-positifs au début du diabète de type 1 ; Moins que la moitié des Afro-Américains sont ICA-positifs [Feeney Sj et al 1997].

1.3.3.2 Autoanticorps anti-insuline(IAA)

Jusqu'à présent, l'insuline est le seul auto-antigène des cellules- bêta spécifiques. Les IAA peuvent être produits généralement chez les individus qui portent HLA-DR4.

Les IAA sont mieux mesurés par une analyse par radio-immuno précipitation, qui est désignée également sous le nom de Radio Binding Analyse (RBA).

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

L'IAA devrait être déterminé avant l'introduction de l'insuline exogène de 5 à 7 jours de la thérapie, parce qu'après les anticorps de l'insuline se développeront.

Le RBA pour IAA ne différencie pas spontanément l'IAA résultant de l'immunisation d'insuline.

Les IAA sont produits chez 35-60% d'enfants au début du diabète de type 1 mais est moins répandu chez les adultes. Par Exemple, chez les Australiens au début du DID, L'IAA était présent chez 90% des enfants moins de 5 ans et 71% chez les enfants de 5 à 10 ans et dans 50% de 10 à 15 ans [Feeney Sj et al 1997] ; l'IAA a été détecté dans plusieurs autres maladies auto-immunes.

Les IAA ont été identifiés chez 15.9% des patients de la maladie thyroïdite de Hashimoto et 13.5% de sujets ayant des maladies graves.

Cet examen sera axé spécifiquement sur l'insuline comme un auto-antigène primaire, une cible essentielle de la maladie, dans le DT1.

1.3.3.3 Autoanticorps anti-acide-glutamique decarboxylase (GADA)

C'est une enzyme qui catalyse la décarboxylation du glutamate en GABA et le CO₂, chez les mammifères, GAD existe sous deux isoformes codées par deux gènes différents - GAD1 et GAD2. Ces isoformes sont GAD67 et GAD65 avec des poids moléculaires de 67 et 65 kDa, respectivement [1]. GAD1 et GAD2 sont exprimés dans le cerveau où GABA est utilisé comme un neurotransmetteur, GAD2 est aussi exprimé dans le pancréas [Bhalla Ak et al 1983].

Un certain nombre d'études récentes indiquent que les patients avec l'insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) ont souvent des anticorps anti-GAD et plusieurs autres antigènes des cellules d'îlot. Ceci confirme l'hypothèse que l'IDDM est une maladie auto-immune et que la production d'auto-anticorps est une première étape dans le développement du DT1. Les auto-anticorps peuvent être détectés dans de nombreux cas, avant le début de l'intolérance au glucose. La présence d'auto-anticorps GAD a été montrée comme un marqueur fort prédictif de survenue éventuelle de DT1.

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

La mesure d'anticorps GAD peut également être utile pour distinguer les diabètes insulino dépendant et non insulino dépendants lorsque le schéma clinique est ambigu. Les GADAs sont plus persistants que les ICA après le diagnostic du diabète de type 1, GADAs peut-être plus souvent positif que les ICA en maladie auto-immune latente de l'âge adulte LADA.

Les GADAs ont constitué un axe majeur de recherche sur le diabète depuis plus de 10 ans. 64 à 70 GADAs sont détectés dans 60% ou plus de survenue de cas de diabète de type 1 et 3-5% des parents [Bhalla Ak et al 1983].

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

1.4 Factures de risques environnementaux du DT1

L'incidence du diabète varie entre les différents groupes ethniques. Même si cela peut en partie s'expliquer par des différences dans la prédisposition génétique entre populations différentes, des changements dans l'incidence du diabète de la migration des populations, ainsi que la rapidité de l'augmentation de l'incidence du diabète dans le monde entier indiquent que les facteurs environnementaux jouent un rôle très important, non seulement dans le diabète mais aussi avec plusieurs maladies. Les facteurs de risque environnementaux du DT1 chez l'Homme et qui interviennent depuis la naissance (environnement prénatal) et jusqu'à la fin de la vie sont climatiques, géographiques, démographiques, alimentaires et infectieux.

1.4.1 Environnement prénatal

L'amniocentèse a permis de rapporter que l'âge maternel avancé (> 35 ans) et la croissance excessive de poids pendant la grossesse mais aussi pendant le premier et deuxième mois après la naissance présentent des facteurs de risque dans la pathogénie du diabète de type 1 [55]. Ceci peut être provoqué par l'accumulation de cellules graisseuses excessives affectant la résistance à l'insuline. La croissance accrue a été associée à la présence d'auto-anticorps dirigés contre les cellules des îlots de Langerhans IA-2 [Erik Biros et al 2005].

D'autres facteurs de risque suspectés pendant la période prénatale sont les infections virales, notamment aux entérovirus dont plus particulièrement le virus Coxsackie B [José Timsit 2000, Knip M 2005].

1.4.2 Le facteur de risque alimentaire

1.4.2.1 Allaitement maternel

L'arrêt de l'allaitement représente chez le nourrisson un stress avec la disparition de sa source naturelle de nourriture et de protection et la fin d'une relation privilégiée avec sa mère. Chez les mammifères, le sevrage précoce empêche les petits d'acquiescer les comportements spécifiques de

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

l'espèce qui provoque une instabilité émotionnelle. L'arrêt de l'allaitement maternel expose prématurément le nourrisson à de nouveaux antigènes et empêche les Ig A maternels de jouer leur rôle dans le développement du système immunitaire du nourrisson, la protection des muqueuses respiratoires et digestives. Or le diabète est également un problème immunitaire [Pouvert C 1991].

1.4.2.2 Lait de vache

Il existe une relation entre l'introduction précoce des produits laitiers dans l'alimentation infantile et l'augmentation du risque du DT1, indépendamment de la durée de l'allaitement. Autrement dit, l'introduction précoce de protéines du lait de vache, chez des enfants à prédisposition génétique au DT1, pourrait constituer un facteur de risque supplémentaire. Mais ces résultats sont toujours débattus.

La consommation précoce du lait de vache serait un facteur de risque potentiel mais de faible amplitude. Le risque était plus élevé chez les enfants porteurs des haplotypes HLA-DR /DQ de susceptibilité au DT1 [Gerstein Hc 1994]. La protéine incriminée dans le déclenchement de ces différentes réponses est la sérum albumine bovine (BSA) [64]. L'augmentation de la réponse humorale contre les protéines du lait de vache a été observée chez des enfants diabétiques ou non dans leur fratrie [Virtanen Sm et al 2000, Gerstein Hc 1994]. Des anticorps anti-BSA sont produits à cause d'une consommation précoce de lait de vache et pourraient être un facteur déterminant précoce de l'augmentation de la maladie [Levy-Marchal C et al 1995].

1.4.2.3 Vitamine D

La vitamine D non seulement essentielle pour le métabolisme des os et des minéraux mais affecte également le métabolisme du glucose et la fonction immunitaire. Les cellules β qui synthétisent et sécrètent l'insuline sont altérées chez les animaux déficients en

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

vitamine D et la tolérance au glucose est restaurée lorsque les niveaux de vitamine D sont revenus à la normale [Mathieu C, Laureys J, et al 1992].

Les cellules Monocytes dans le sang périphérique humain et les cellules T activées ont des récepteurs avec une haute affinité pour la vitamine D [Bhalla Ak et al 1983].

L'incidence de diabète de type 1 est réduite de façon significative avec des suppléments de vitamine D, soit chez les nourrissons à risque ou leurs mères pendant la grossesse [The Eurodiab Substudy 1999, Abdulbari Bener et al 2008].

Carsten Geisler en 2010 explique que "quand une cellule T est exposée à un agent pathogène étranger, elle met au point un dispositif de signalisation ou d'antenne connu comme un récepteur de la vitamine D, avec lequel elle recherche la vitamine D. Cela signifie que la cellule T doit avoir la vitamine D, sinon son activité cessera. Si les cellules T ne peuvent pas trouver suffisamment de vitamine D dans le sang, elles ne seront même pas mobiliser dans la réponse immunitaire.

1.4.3 Infections

Les maladies infectieuses ont été proposées comme un modificateur de l'environnement de l'auto-immunité chez l'homme.

L'infection par différents pathogènes viraux et bactériens a été proposée depuis longtemps comme l'une des étiologies du diabète auto-immun. De nombreuses théories, allant de la cytolysse directe des cellules des îlots pancréatiques à des processus immunologiques telles que le mimétisme des antigènes et l'activation des lymphocytes polyclonaux, ont tenté d'expliquer la corrélation épidémiologique entre les infections et le diabète, appuyée par des informations provenant des études humaines et animales [Elad Goldberga and Ilan Kraus 2009].

La recherche d'une infection qui entraîne le déclenchement du diabète de type 1 reste jusqu'à présent peu concluante.

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

1.4.3.1 Infections virales

➤ -Entérovirus

Les entérovirus sont de petits virus (27 nm de diamètre) qui sont à acide ribonucléique (ARN) et protéine.

Ils incluent les virus de la polio, les coxsackie vireuses, et les échovirus.

Il y a 3 virus différents de la polio et plus de 60 entérovirus non-poliomyélite qui peuvent causer la maladie chez l'homme, y compris 23 virus de Coxsackie A, 6 virus de Coxsackie B, 28 échovirus, et 4 autres entérovirus.

L'association entre les entérovirus et le DT1 dans des études sur les animaux et l'homme a été réalisée en Finlande, où l'incidence du diabète est haute mais les infections par les entérovirus sont rares. [Luppi et al 1999] ont indiqué que les virus ont été détectés plus souvent chez les enfants diabétiques que chez les enfants non diabétiques de mêmes parents sachant que les infections rétrovirales peuvent être influencées par le système HLA.

Une association causale est soutenue par la séroconversion aux anticorps d'anti-îlot après que l'infection par des entérovirus ait été trouvée chez les enfants avec le génotype HLA-DQB1.

Les infections par les entérovirus sont les principales candidates environnementales pour le déclenchement du diabète de type 1, les infections maternelle par les entérovirus pendant la grossesse ont été également associés au plus grand risque de diabète de type 1 pendant l'enfance dans la catégorie d'âge 0-14 ans.

Le risque n'est pas prononcé et peut être approprié aux garçons en particulier ; Le risque peut également être modulé par des facteurs comme quand l'infection se produit (tôt ou tard dans la grossesse), le sexe de l'enfant, aussi bien que le système HLA et d'autres gènes de susceptibilité chez l'enfant et la mère.

En conséquence, des études à grande échelle couvrant la période entière de la grossesse et tenant compte des enfants de tous les âges avec du diabète de type 1 sont justifiées [Maria Elfving et al 2008].

En général le rôle des facteurs environnementaux peut être résumé comme suit :

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

Il a été noté que moins de 5 % des sujets génétiquement prédisposés au DT1 développent la maladie, et que le taux de concordance chez les jumeaux monozygotiques n'est que de 30 à 50 %.

La surprenante augmentation de l'incidence du DT1 durant les dernières décennies ne peut s'expliquer par une susceptibilité génétique accrue de la population.

Il est de ce fait fortement suspecté que des facteurs environnementaux tels que les drogues, toxines, nutriments et virus, joueraient un rôle dans la pathogenèse de la maladie chez des sujets génétiquement prédisposés.

L'implication des virus (ou de tout autre agent infectieux) dans les processus auto-immuns ne date pas d'aujourd'hui, puisque l'évidence clinique et épidémiologique a depuis longtemps associé divers virus à des pathologies auto-immunes spécifiques d'organes, telles que la myocardite auto-immune et la sclérose en plaques, ou encore systémiques telles que le lupus érythémateux et la myasthénie grave.

L'implication des virus dans le DT1 est confortée par les variations de son incidence d'un pays à l'autre et d'une saison à l'autre, ainsi que par les observations relatives à l'association entre l'immigration et le développement de cette maladie.

Parmi les virus qui figurent dans les rangs des suspects, citons les virus de la rubéole ou des oreillons, ainsi que le cytomégalovirus, les rétrovirus et les rotavirus.

Mais les plus fortes présomptions pèsent sur les entérovirus, et particulièrement Coxsackie B CV-B4.

1.4.4 Toxines

Les cellules β -d'îlots pancréatiques sont très sensibles au stress métabolique, des radicaux libres et des cytokines [Debra Margulies 2010]. Cette question a été mise en évidence lors d'une série de cas de tentatives de suicide avec les rodenticides (Vacor contenant de l'urée N-3-pyridylméthyl-N'-p-nitrophényl; RH-787) qui conduisent à une toxicité directe des cellules β et l'apparition du diabète. La Streptozotocine, c'est un antibiotique dérivé de *Streptomyces* spp qui

Chapitre 1 -Synthèse Bibliographique

induit également le DT1 par une action toxique directe des cellules bêta des îlots de Langerhans, dans certaines lignées de souris consanguines [Debra Margulies 2010]. Une modification du protocole d'administration a été développée comme un modèle de diabète auto-immun dans lequel des petites doses répétées de streptozotocine ont été administrés, en vue d'amorcer les réponses immunitaires contre les cellules β . Des constituants chimiques modifiés sont libérés à la suite des lésions tissulaires [Mathieu C, Laureys J, et al 1992].

1.4.5 Les variations saisonnières du diabète de type 1

Le risque de début de DT1 se corrèle avec la variation saisonnière, la proportion la plus grande de cas étant diagnostiquée pendant l'hiver et l'automne et la plus petite en été, particulièrement dans les pays avec des variations saisonnières extrêmes.

Le caractère saisonnier au moment du diagnostic du DT1 suit un modèle sinusoïdal pour toutes les tranches d'âge. Le diagnostic est plus souvent fait en hiver et au début du printemps. Ce profil a été mis en rapport avec les infections virales saisonnières capables de déclencher une dernière poussée auto-immune et de précipiter la carence en insuline.

1.4.6 Les autres causes

1-L'absence congénitale du pancréas ou de cellules des îlots pancréatiques
2-Pancréatectomie ; le DID sucré après dommages pancréatique (ex.la fibrose kystique, la pancréatite chronique, thalassémie majeure, l'hémochromatose, le syndrome hémolytique et urémique)

3-syndrome de Wolfram (diabète insipide, le diabète sucré, atrophie optique, surdité (DIDMOAD).

4-anomalies chromosomiques comme le syndrome de Down, syndrome de Turner, syndrome de Klinefelter, ou le syndrome de Prader-Willi (Le risque est autour de 1% et plus bas dans le cas du syndrome de Turner) [Yoon Jw, Jun Hs 2005].

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

2.1 Echantillonnage

Notre échantillon de patients a été sélectionné parmi des populations de l'ouest Algérien et souffrant du diabète de type 1. Les témoins sont de la même région et en bonne santé.

2.2 Analyses des d'échantillons

Notre échantillon est constitué de 106 Personnes dont 47 femmes et 59 hommes. Parmi les femmes 28 sont atteintes de DT1 et chez les hommes 25. Les diabétiques ne doivent pas avoir de pancréatectomie ni d'autres maladies auto-immunes.

Toutes les personnes participant à cette étude sont informées sur les objectifs et le déroulement du travail, leur consentement leur est demandé.

2.3 Prélèvement du sang

Les prélèvements sanguins ont été effectués chez les 106 individus (diabétiques et sains) retenus pour notre recherche. Les prélèvements d'échantillons sanguins sont toujours effectués dans différents centres médicaux (polycliniques et Hôpitaux) de la région de l'ouest Algérien. Les normes éthiques ont été scrupuleusement respectées (lieu du prélèvement, les conditions sanitaires...etc).

Nous avons collecté chez chaque individu sensibilisé et consentant entre deux à quatre millilitre (2-4 ml) de sang, selon l'âge et l'état de santé de l'individu, par ponction veineuse à l'aide d'une seringue stérile. Le sang est recueilli dans des tubes contenant l'EDTA comme anticoagulant et a été conservé à -4°C.

2.4 Mesure de l'indice de masse corporelle (IMC)

Nous avons mesuré les paramètres de l'IMC. L'IMC se calcule en divisant le poids exprimé en kilogrammes par la taille au carré exprimée en mètres.

IMC = poids (kg) / taille (m²). L'IMC du poids idéal est compris entre 18,5 et 24,9.

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

2.5 Extraction de l'ADN à partir du sang total

Au cours de ces dernières années, la biologie moléculaire a modifié considérablement le diagnostic de routine des maladies infectieuses, génétiques et néoplasiques. Toute étude de génétique moléculaire implique la possession d'échantillons d'acides nucléiques.

Les principaux procédés d'extraction des acides nucléiques se classent en trois principales classes en fonction du principe auquel elles font appel [T. Bienvenu 1999]:

- ✓ les méthodes utilisant des solvants organiques (Méthode au phénol-chloroforme).
- ✓ les méthodes utilisant des solvants non organiques (Méthode au NaCl).
- ✓ les méthodes basées sur l'utilisation de microcolonnes de résines échangeuses d'ions.

Quelle que soit la méthode d'extraction des acides nucléiques utilisée à partir du sang fraîchement recueilli ou décongelé, le sang doit être initialement vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Les solutions de lyse des globules rouges sont nombreuses et variées.

On a testé deux méthodes d'extraction de l'ADN à partir de sang total, pour voir celle qui donne le meilleur rendement en ADN. Le rendement est apprécié par un dosage. Pour nos échantillons, Nous avons testé deux méthodes d'extractions (phénol/chloroforme et NaCl)

2.5.1 Méthode d'extraction au NaCl

Le Protocole :

Le sang est conservé par congélation à -4°C dans des tubes contenant de l'EDTA.

1-Le sang a été décongelé à 37°C (ou over night à + 4°C).

2-Le volume du tube de sang a été complété avec du tampon TE 10/10 jusqu'à 45ml, agité doucement et mis dans la glace pendant 30 mn et enfin centrifugé à 2500 tours /mn pendant 15 mn.

3- Le surnageant est éliminé dans un récipient contenant de l'eau de Javel en utilisant la pompe aspirante. Puis nous avons ajouté au culot, 15ml de TE 10 /10.

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

Le culot est resuspendu avec une pipette stérile de 10 ml, puis le volume est complété à 45 ml de tampon TE 10 /10. Les échantillons sont mis dans la glace pendant 10 mn et centrifugés à 2500 tour /mn pendant 15 mn.

4-Reprenre l'étape n° 3 jusqu'à obtention d'un culot blanchâtres qui correspond à un culot de lymphocytes.

5-Au culot de lymphocytes, on ajoute 5 ml de solution de lyse de globules blancs et 125µl de Protéinase K à (20 mg/ml). La concentration finale de la solution de lyse est à 500ng /ml, puis on homogénéise le culot avec une pipette stérile de 5 ml.

6- Incubation à 37°C toute la nuit dans un bain-marie, sous agitation douce.

7- 2ml de NaCl (5 M) ont été ajouté ensuite agitation vigoureuse et centrifugation à 4000 tours /mn pendant 10 mn.

8-Récupérer le surnageant dans un autre tube, ajouter 2 volumes d'éthanol absolu froid, laisser précipiter l'ADN par retournement du tube (formation de la méduse).

9-Récupérer la méduse par une pipette Pasteur scellée, la placer soit dans un tube Eppendorf, soit dans un tube à fond round (14 ml), la rincer une fois à l'éthanol à 70 %, laisser sécher à l'air libre et la redissoudre dans 200-500 µl de tampon TE 10/1 dans un tube Eppendorf.

Pour une totale dissolution, laisser à température ambiante pendant au moins 24 heures.

Les solutions et tampons utilisés sont décrits en annexe (N°2).

2.5.2- Méthode au phénol/chloroforme

Ce protocole décrit la méthode la plus utilisée pour extraire l'ADN à partir de sang total.

✓ Phase de lyse :

Prendre 2 ml de sang total, ajouter 8 ml de solution de lyse I, et mettre dans la glace pendant 10 minutes, puis centrifuger pendant 10 min à 3000 rpm. Ensuite éliminer le surnageant, et ajouter 1 ml de TBS et 1 ml d'une solution de lyse II. A la fin ajouter 50 µl de la solution de protéinase K et incuber pendant 2 heures à 55 °C dans un bain marie.

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

✓ Phase d'extraction :

Ajouter 1 ml de phénol et 1 ml de chloroforme-alcool isoamylique, agiter manuellement pendant 5 min, puis centrifuger 7 min à 2500 rpm. Prendre la phase aqueuse et ajouter 2 ml de chloroforme/alcool isoamylique, et agiter manuellement pendant 5 min, puis centrifuger 7 min à 2500 rpm.

✓ Phase de précipitation :

Récupérer soigneusement la phase aqueuse contenant l'ADN et la transférer dans un nouveau tube, puis ajouter 625µl d'acétate d'ammonium 10M. Mélanger brièvement par vortex, puis ajouter 6 ml d'éthanol à 96% froid. On voit apparaître la méduse d'ADN.

✓ Conservation de l'ADN :

Centrifuger pendant 30 min à 4000 rpm, et éliminer le surnageant, l'ADN se trouve alors dans le culot. Ensuite laver par 6 ml d'éthanol à 70% tout en agitant, puis centrifuger à 4000 rpm pendant 30 min. Eliminer le surnageant et incuber à 56°C pendant 1 heure pour éliminer toute trace d'alcool.

A la fin, resuspendre l'ADN dans du TE 10 /1.

2.6 Contrôle de la qualité de l'ADN

La vérification du degré de pureté et le dosage de l'ADN ont été réalisés par mesure des DO à 260 et 280 nm au spectrophotomètre. Le dosage est important pour faire la PCR; en effet pour cette technique l'ADN doit être pur. Pour cela nous avons procédé de la manière suivante.

Ajouter 10 microlitres de chaque échantillon à 990 microlitres d' H₂O distillée stérile, bien mélanger, et lire les densités optiques à 260 nm et 280 nm pour déterminer le degré de pureté.

Pour un stockage de l'ADN à plus long terme la congélation (-4°C) est plus souhaitable.

La concentration d'ADN dans la solution mère est calculée comme suit

$$\text{Concentration de l'ADN (mg/ml)} = \{\text{OD}_{260} \times 50 \text{ (facteur de dilution)} \times 50 \text{ mg/ml}\} / 1000$$

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

2.6.1 La pureté de l'ADN

Le rapport DO260/DO280 devrait être déterminé pour évaluer la pureté de l'échantillon.

Si ce rapport est compris entre 1,8 et 2,0, l'absorption est probablement due à des acides nucléiques.

Un ratio inférieur à 1,8 indique qu'il ya peut être des protéines et / ou d'autres absorbeurs d'UV dans l'échantillon, dans ce cas il est conseillé de reprécipiter l'ADN.

Un rapport supérieur à 2,0 indique que l'échantillon peut être contaminé par le chloroforme ou le phénol et devrait être reprécipité avec de l'éthanol.

2.7 PCR: Polymérase Chain Reaction

2.7.1 Le Principe

La réaction de polymérisation en Chaîne connue sous les initiales PCR permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes.

- (1) Il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin.
- (2) borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques.
- (3) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

Cette technique conçue par Kary Mullis en 1985 est une réaction in vitro qui permet d'obtenir une quantité abondante d'ADN spécifique à partir d'un échantillon peu abondant.

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

2.7.2 Échantillon

L'ADN extrait par la méthode phénol-chloroforme et conservé dans un congélateur à -4°C est Décongelé à température ambiante.

Les échantillons d'ADN devraient être dilués pour atteindre une concentration comprise entre 100 et 200ng/µl, avec un rapport 260nm/280nm $\geq 1.8-2$.

2.7.3 Matériels nécessaires Pour la PCR

Matériel biologique

- ✓ Taq polymérase à une concentration de 5U/µl (SIGMA-ALDRICH).
- ✓ Echantillon d'ADN.
- ✓ D'NTP 100mM (Sigma).
- ✓ Primer pour le gène INS-VNTR -23 A/T (SIGMA-ALDRICH).
Sense: F5' TAATGACCCGCTGGTCCTGAGGA3'
Antisense: R5' ACGTGACCAAGAGA AACTTCTT3'
- ✓ Primer pour le gène CTLA4 +49A/T
Sense: F5' - GTC AAG GGA CCA TTA GAA -3 ' et
Antisense: R 5' - CTT TGC AGA AGA CAG GGA TGA A-3'

Matériel non Biologique

- ✓ Thermocycleur programmable (TECHNE FLEXIGENE).
- ✓ Micropipettes ajustables avec des embouts à filtres stériles.
- ✓ Bain de glace ou blocs de refroidissement pour tubes.
- ✓ portoir pour tubes spéciaux du thermocycleur.
- ✓ Vortex pour mixer L'ADN.

2.7.4 Protocole d'amplification (voir l'annexe N°5)

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

2.7.5 Programmes utilisés lors de la PCR

A l'avance

- ✓ Isoler l'ADN génomique de tous les échantillons à tester.
- ✓ Programmer le Thermocycleur : ce programme est le suivant

➤ PCR : programme pour CTLA4

Tableau N°2 : PCR Programme.

Etape 1	Dénaturation	T(C°) 94C°	Durée 3 ,5mn	Nombre de cycles
Etape 2	Dénaturation	94C°	30 s	35
	Hybridation	54C°	60 s	
	Elongation	72C°	60 s	
Etape 3	Elongation	72C°	10 mn	

➤ PCR : programme pour INS-VNTR

Tableau N°3 : PCR Programme

Etape 1	Dénaturation	T(C°) 94C°	Durée 3 ,5mn	Nombre de cycles
Etape 2	Dénaturation	94C°	30 s	35
	Hybridation	55C°	60 s	
	Elongation	72C°	60 s	
Etape 3	Elongation	72C°	10 mn	

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

➤ PCR programme pour HLA-DMB

Tableau N°4: PCR Programme.

Etape 1	Dénaturation	T(C°)	Durée	Nombre de cycles
		94C°	3 ,5mn	
Etape 2	Dénaturation	94C°	30 s	35
	Hybridation	62C°	60 s	
	Elongation	72C°	60 s	
Etape 3	Elongation	72C°	10 mn	

Déroulement de la PCR

- ✓ Allumer le thermocycleur à l'avance.
- ✓ Programmer le thermocycleur.
- ✓ Préparer les surfaces de travail en les nettoyant avec de l'eau de javel à 10%.
- ✓ Retirer les amorces, la Taq Polymérase et suffisamment de réactif de PCR du congélateur et les décongeler à température ambiante.
- ✓ Garder tous les réactifs dans de la glace ou dans un bloc réfrigéré.
- ✓ Préparer le mélange de la réaction PCR (d'NTP, Tp10 X, Mgcl₂, H₂O stérile, Taq polymérase, Amorce 1 forward, Amorce 2 Reverse).
- ✓ Ajouter l'échantillon d'ADN (0.1µl) au mélange de la PCR, Bien mélanger en évitant la formation de bulles d'air
- ✓ Placer les échantillons dans le thermocycleur.
- ✓ Fermer l'appareil puis démarrer le programme.
- ✓ Confirmer l'amplification par l'Electrophorèse qui doit donner seulement la bande spécifique correspondant au gène ciblé.
- ✓ Récupérer l'ADN amplifié et le conserver dans un congélateur à -4°C.

Chapitre 2 -MATERIELS ET METHODES

2.8 Electrophorèse de l'ADN amplifié

L'électrophorèse est une technique biochimique de séparation fondée sur le fait que des molécules portant des charges électriques différentes ou ayant des poids moléculaires ou des conformations différents migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique.

Dans notre cas le tampon d'électrophorèse est le TBE (Tris, Borate, EDTA), c'est une solution contenant du Tris (hydroxyméthyl) amino méthane, du borate et de l'EDTA (Ethylène diamine tétra acétate) ajustée à pH 8,3. Le support de migration est un gel d'agarose dans lequel des puits sont formés à une extrémité pour recevoir les échantillons. L'agarose constitue un milieu plus ou moins poreux : plus sa concentration est forte et plus les pores sont petits. La concentration à utiliser dépend donc de la taille des fragments à séparer.

Le protocole suivi lors de l'électrophorèse est décrit en annexe №3

Préparation du gel d'agarose.

- ✓ Préparer un gel d'agarose à 2% avec du TBE 1X.
- ✓ Ajouter du BET (Bromure d'Ethidium) à 10mg/ml, Homogénéiser.
- ✓ Ajouter aux échantillons le tampon de charge 20/40 (Bleu de Boromo phénol +sucrose).
- ✓ Préparer le marqueur de taille.
- ✓ Préparer l'ADN amplifié.

Dépôts des produits d'amplification.

- ✓ Mélanger 4µl d'ADN amplifié et 4µl de tampon de charge
 - ✓ Déposer dans les puits les échantillons et le marqueur de taille le 100 Pb
 - ✓ Laisser migrer à 100 Volts pendant 30mn.
- Observer le gel sous UV.

Avertissement :

- Lorsque l'essai est terminé, Jeter le matériel comme déchet dangereux et décontaminer le matériel réutilisable avec 10% d'eau de javel ou un autre agent inactivateur de l'ADN.

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

3. 1 Analyses statistiques

Le diabète constitue la deuxième maladie la plus répandue en Algérie après l'Hypertension artérielle et le diabète de type 1 est celui qui suscite le plus l'attention des chercheurs vues les causes très diverses de son déclenchement. Cette maladie n'a pas été beaucoup décrite en Algérie, pour cela nous avons entrepris ce travail qui comporte une partie épidémiologique et une ébauche de l'étude moléculaire de certains gènes de susceptibilité dans une population de l'ouest Algérien.

Pour l'ensemble de nos analyses statistiques, nous avons utilisé le logiciel STATISTICA version 5; nous avons traité nos échantillons par le test d'indépendance le Khi-deux (test de χ^2).

Dans cette partie nous avons essayé de voir l'influence de différents paramètres (le sexe, la consanguinité et l'indice de masse corporelle) sur le déclenchement du diabète de type 1.

3.1.1 Effet du sexe sur le déclenchement du diabète de type 1

Dans ce cas nous voulons voir si le sexe à un effet sur le déclenchement du DT1 grâce au test Khi 2 avec un risque de 5%. La figure 5 est une présentation par les fréquences, de la population que nous avons étudiée. Pour l'analyse statistique, une présentation des échantillons est mentionnée dans le tableau 5.

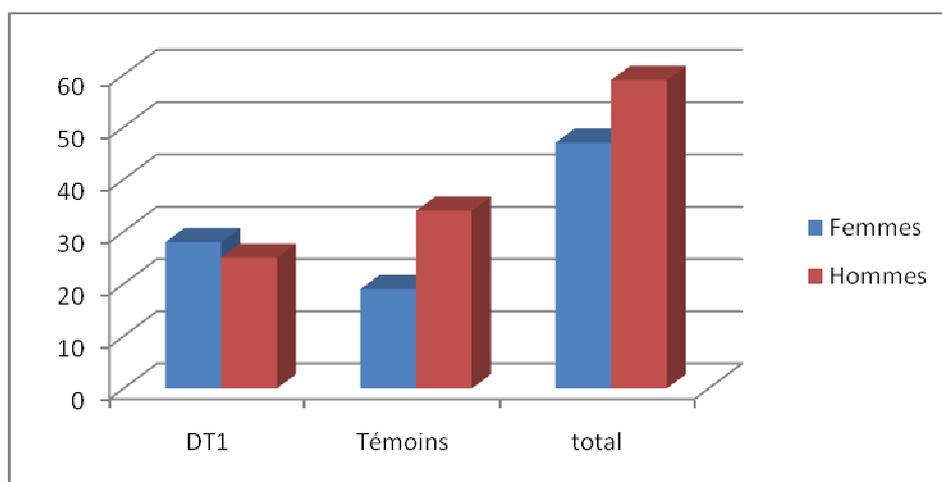


Figure 5

Distribution des diabétiques de type 1 et des témoins en fonction du sexe

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 5
Nombre et fréquences de nos échantillons

SEXE	DT1	Témoins	total
Femmes	28 (59,58%)	19 (40,42%)	47
Hommes	25 (42,37%)	34 (57,23%)	59
Total	53	53	106

(NS): $p \geq 0.05$; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$

$X^2 = 3.0$ dl =1 $p > 0,05$ la différence est Non significative

Le teste d'indépendance (Khi deux) est Non significatif. Le pourcentage de la distribution du DT1 selon le sexe, dans notre échantillon, est Non différent.

Le diabète de Type 1 est décrit, dans la majorité des populations étudiées dans le monde, comme plus fréquent chez les hommes que chez les femmes [Aneela Naureen Hussain et al 2010] et la cause est la prévalence des auto-anticorps insuline à l'apparition de diabète de type 1 qui est plus élevée chez les hommes que chez les femmes durant l'adolescence [Devasenan Devendra 2004].

3.1.2 Effet de la consanguinité sur le déclenchement du diabète de type 1

Nous avons aussi essayé de voir l'impact de la consanguinité sur le déclenchement du DT1. La figure 6 présente la distribution des individus de notre population selon la consanguinité (premier et deuxième degrés). Les échantillons analysés sont présentés dans le tableau 6.

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

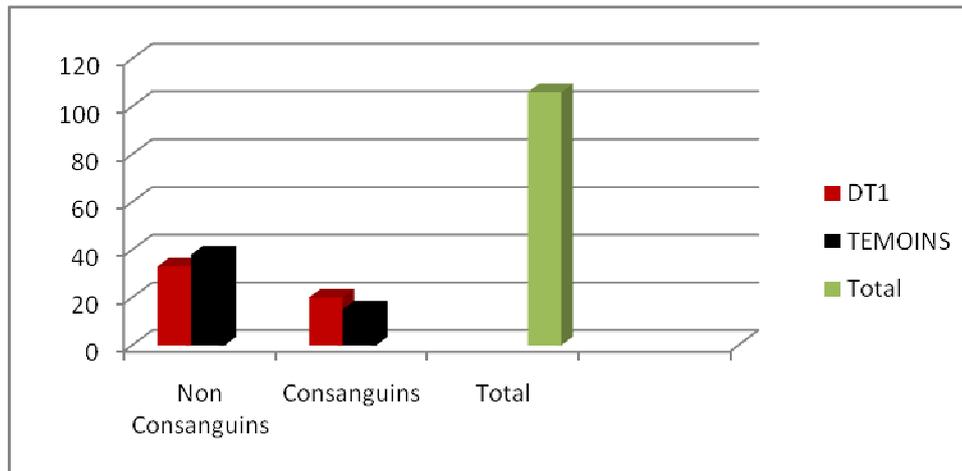


Figure 6

la distribution des individus selon la consanguinité chez les diabétiques de Type 1 et les TémoinS.

Tableau 6

Fréquence de la consanguinité.

Consanguinité	DT1	TémoinS	Total
Consanguins	20 (37.7%)	15 (28.3%)	35
Non Consanguins	33 (62.2%)	38 (71.7%)	71
Total	53	53	106

(NS): $p \geq 0.05$; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$

$X^2 = 2,324561$ dl = 1 $p < 0,127356$ Non significatif

Le teste d'indépendance (Khi deux) ne révèle pas des relations significative entre la consanguinité et le diabète de type 1 $p < 0,127356$. Nous pouvons dire que, la consanguinité ne semble exercer aucun effet sur le diabète de type 1. Ces résultats rejoignent les données de la littérature à savoir qu'El Mouzan MI et al 2008 qui ont pu montrer que la consanguinité n'a aucun effet sur le diabète de Type 1. Cependant la consanguinité est présente à un taux de 33% dans notre population dont 37,7% chez les diabétiques de type 1 et 28,3% chez les témoins. Dans une autre étude réalisée par [Salah Zaoui et al 2007] sur une population de l'ouest Algérien, il a été montré que le taux de consanguinité est élevé, 30,6 % en milieu

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

urbain et 40,5 % en milieu rural. Cette étude laisse penser à une relation éventuelle entre diabète et consanguinité, ce qui n'est pas en accord avec la plupart des études réalisées.

Les événements familiaux du diabète de type 1 ont été longtemps étudiés. Le frère d'un diabétique de type 1 a un risque de 5 à 10% de développer lui aussi la maladie. Ce risque est peut-être de 12 à 100 fois plus élevé que celui de la population générale (0.1% à 0.4%). Il a été constaté une concordance plus grande entre des jumeaux monozygotes par rapport aux jumeaux dizygotes [M. Alan Permutt et al 2005].

Nous pouvons donc dire que la consanguinité n'a aucune relation sur l'apparition du diabète de type 1 chez nos individus comme démontré aussi par la plupart des études réalisées.

3.1.3 Effet de l'indice de masse corporelle sur l'apparition du diabète de type 1

L'obésité est décrite comme n'ayant aucun effet sur l'apparition du diabète de type 1 [Lynn B Jorde et al 2004] mais nous devons prendre ce paramètre en considération vue son incidence sur les résultats de certains tests. Les résultats obtenus sont décrits dans la figure 7 et le tableau 7.

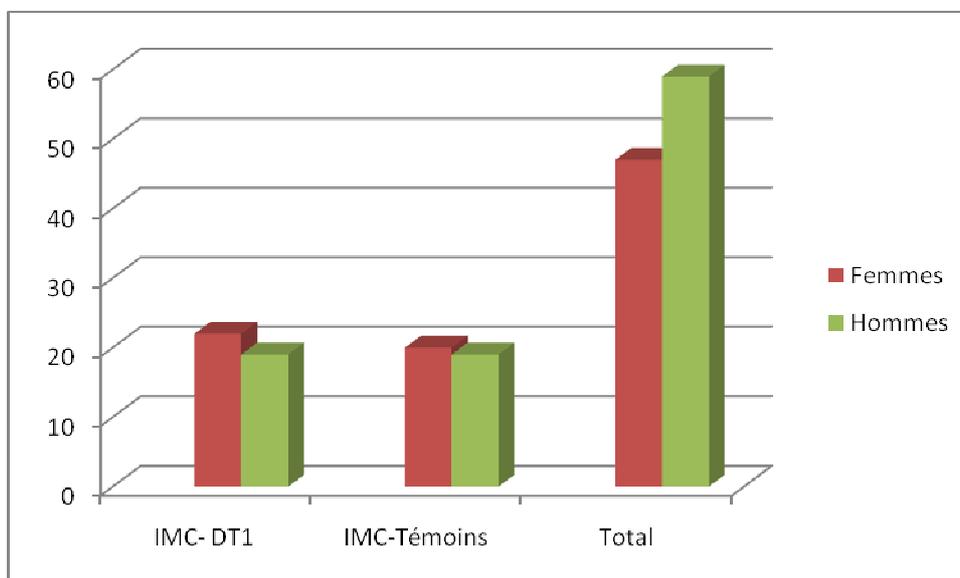


Figure 7

la distribution de l'IMC dans notre échantillon.

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 7

Moyenne générale de distribution de l'IMC

IMC	DT1	Témoins
Femmes	\bar{x} 22	\bar{x} 20
Hommes	\bar{x} 19	\bar{x} 19

(NS): $p \geq 0.05$; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$

$\chi^2 = 0,2000000$ dl = 1 $p < 0,654724$

Le teste d'indépendance (Khi deux) ne révèle pas des relations significative entre l'indice de masse corporelle et le diabète de type 1.

Le but pour lequel, nous avons pris en considération l'IMC est la liaison qui existe entre le SNP -23Hph1 du gène INS-VNTR et l'obésité qui affecte les études moléculaires [Knerr I. et al 2005]. Les individus obèses doivent être éliminés de l'échantillon des patients. Chez des enfants non diabétiques en Angleterre, le génotype INS VNTR class III/III a été associé à une augmentation globale de l'IMC. De même, chez les enfants obèses français mais dont l'INS-VNTR est de la classe I /I, plutôt que de la classe III/III, ont été associées à des IMC élevés. La plupart des personnes obèses ont une insulino-résistance et 5 à 10% développent un dysfonctionnement cellulaire (cellules β du pancréas) et deviennent diabétiques de type 1 [Baum Jd et al 1975, Virtanen Sm 2000, Barbara Heude 2006, Knerr I. et al 2005]. La masse de graisse se répartit différemment chez l'homme et la femme. Elle représente 10 à 15 % du poids corporel de l'homme et 20 à 25 % du poids de la femme.

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

3.2 Analyse Moléculaire

3.2.1 Extraction d'ADN

Nous avons utilisé dans un premier temps la méthode d'extraction de l'ADN au NaCl pour sa facilité d'utilisation mais aussi parce qu'elle ne nécessite pas l'utilisation de produits toxiques (phénol et chloroforme) ; Cependant cette technique présente un inconvénient majeur qui est les grandes concentrations de protéinase K (125 μ l à une concentration de 20mg/ml).

En ce qui concerne le volume de sang nécessaire pour cette technique il est de 10 ml ce qui est beaucoup surtout pour des enfants malades et même pour les individus témoins, par contre pour la deuxième technique utilisée, un volume de 2 ml de sang est suffisant pour faire l'extraction d'ADN. La figure 8 montre un aspect des résultats obtenus après électrophorèse.



Figure 8

Exemple de résultats obtenus par extraction au phénol

La taille des fragments a été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8 %.

2 à 5 μ l de la solution d'ADN ont été déposés dans chaque puits d'un gel d'agarose à 0,8 % soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 2 h. Cette analyse permet, par ailleurs, d'observer une éventuelle dégradation de l'ADN survenue au cours de l'extraction.

La technique au phénol chloroforme offre un autre grand avantage qui est la pureté de l'ADN récupéré après l'extraction surtout que nous devons poursuivre notre étude sur de l'ADN pur.

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

De plus, la bibliographie [116] montre l'énorme différence entre les deux méthodes. La pureté de l'ADN à partir de 2ml de sang total par la méthode au Phénol-Chloroforme, est meilleure puisqu'elle donne une bonne concentration en ADN pur.

La méthode d'extraction au phénol chloroforme est donc plus adapté en amont de la PCR et plus économique puisque la quantité de réactifs consommables est plus faible. : Par exemple 50µl de Protéinase K à la concentration de 20mg /ml pour chaque échantillon au lieu de 125 µl.

➤ 3.2.2 la concentration et la pureté de l'ADN

Le dosage des échantillons d'ADN à 260nm donne en moyenne une concentration comprise entre 100 et 200 ng/µl.

Le rapport de pureté dans le cas de la technique d'extraction au phénol chloroforme est de $DO_{260}/DO_{280} = 1.72 \pm 0.11$ par rapport à la méthode d'extraction au NaCl (1,9).

Concernant la pureté de nos échantillons d'ADN. Le rapport $DO_{260nm} / DO_{280 nm}$ est égal à 1.8 en moyenne.

➤ 3.2.3 La PCR

La technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique.

Le choix des gènes pour la suite de notre travail, a été dicté par l'absence d'études sur les gènes de susceptibilités au DT1 dans les populations algériennes mais aussi parce que nous ne pouvions pas faire le balayage de tous les SNPs des gènes susceptibles du diabète de type 1 décrits.

Dans notre cas, nous avons réalisé l'amplification du (SNP +49 de l'exon 1) du gène CTLA4 qui est situé sur le chromosome 2 bras long bande 33 Chr.2q33) et le SNP -23 Hph1 (INS-VNTR) du gène d'insuline sur le chromosome 11p15.5. Afin d'en obtenir une quantité suffisante pour les détecter et les étudier.

Nous avons donc choisi les déséquilibres de liaisons les plus associés au DT1.

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de ce type d'études servent en général à établir des diagnostics précis sur ce type de maladies pour bien cerner les causes afin de mieux les contrer par des traitements adaptés.

Les données génotypiques:

L'ADN a été préparé à partir de 2 ml de sang total, en réalisant l'extraction au phénol-chloroforme.

- L'Amplification, de la séquence d'ADN cible le polymorphisme A/G de SNP +49 du gène CTLA 4 et le polymorphisme A/T de SNP -23Hph1 du gène INS-VNTR, a été réalisée en utilisant la PCR avec les amorces spécifiques (voir l'Annexe 7).

La réaction a été réalisée dans un volume final de 25µl (voir l'annexe5).

Le programme de {TECHNE FLEXIGENE thermocycleur} se composait de 35 cycles des trois étapes :

- Dénaturation de l'ADN à 94 °C pendant 3mn 30 s.
- Hybridation des amorces à (55 °C INS-VNTR et 54°C pour CTLA4) pendant 60 s.
- Elongation à 72°C pendant 60 s.

L'ADN amplifié était de 685pb et 789pb de longueur (figure 9) et a été visualisé sur un gel d'agarose à 2% et coloré au Bleu de Boromophénol (voir l'annexe 6).

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

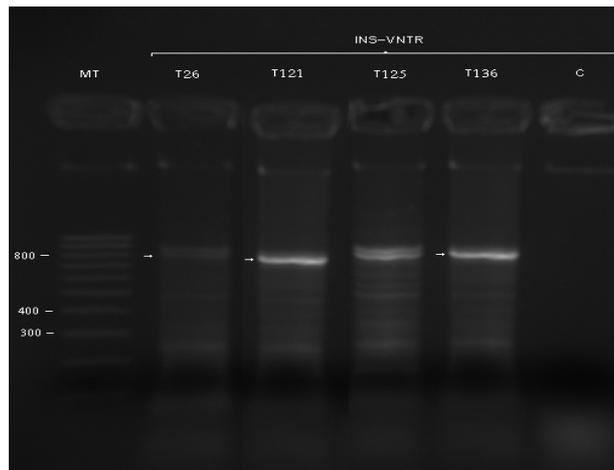


Figure 9

Electrophorèse après amplification du SNP -23 Hph1 du gène INS-VNTR (Température d'hybridation des amorces 55°C)

La migration de nos ADN amplifiés montre que les bandes spécifiques très claires correspondent à 789pb, poids Moléculaire de ce SNP. Cependant, nous observons la présence de bandes aspécifiques dans tous les échantillons. L'absence de bande d'ADN dans le dernier échantillon C (contrôle) (sans ADN) confirme qu'il n'y a pas eu contamination lors de l'expérimentation.

La présence de bandes aspécifiques est due soit à une température d'hybridation non adapté et/ou à un problème d'amorces.

Donc nous devons tester d'autres températures afin de déterminer celle qui est adéquate c'est-à-dire celle qui permettra d'obtenir des bandes spécifiques seulement.

Pour le deuxième programme de la PCR, nous l'avons réalisé dans les mêmes conditions que le premier sauf que la température d'hybridation est de 54 °C (figure 10).

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

CTLA4 +49A/G

INS-VNTR -23Hph1 T/A



Figure 10

Electrophorèse après amplification de différents gènes

Tm d'hybridation des amorces 54C°.

Nous avons le gel d'agarose qui montre la présence des bandes pour les deux SNPs

+49A/G du gène CTLA4 et -23Hph1 T/A du gène d'INS-VNTR.

- ✓ Dans le puits T14, nous n'observons pas de bandes d'ADN, dans les deux types de SNPs ce qui indique qu'il y a eu un problème de manipulation.
- ✓ La présence de Bandes d'ADN dans les échantillons T26, T121et T129 correspond à la Bande spécifique de -23Hph1 de l'INS-VNTR.
- ✓ L'apparition de Bandes d'ADN de plus petite taille par rapport aux deux SNPs étudiés CTLA4 et INS-VNTR. Il s'agit de bandes aspécifiques ou d'un problème avec la température d'hybridation qui n'est pas optimale et doit être résolue pour obtenir seulement la bande d'ADN spécifique.

Donc nous devons tester d'autres températures afin de déterminer celle qui est adéquate c'est-à-dire celle qui permettra d'obtenir des bandes spécifiques seulement.

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

La troisième PCR a été réalisée à la température d'hybridation 54.5°C en présence de DMSO (figure 11). Pour l'optimisation de la PCR, les primers doivent être riches en GC. Le DMSO a pour effet de diminuer les structures secondaires dans la matrice d'ADN. Mais aussi de réduire considérablement l'activité de la Taq polymérase (50%) ce qui aura pour effet d'éviter la formation de bandes aspécifiques.

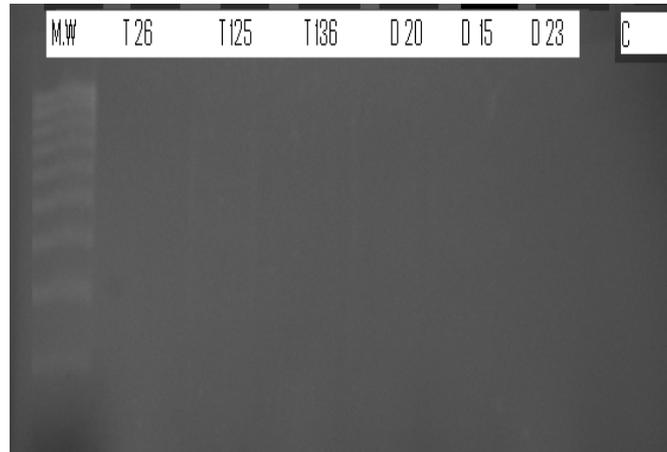


Figure 11

Electrophorèse après amplification de différents gènes (CTLA-4et INS-VNTR)

T_m d'hybridation des amorces 54,5°C.

Nous n'avons observé aucune bande d'ADN pour tous les échantillons testés sauf dans le cas du marqueur de taille, nous pensons que la température d'hybridation n'est pas adaptée pour ces amorces. Il faut donc réajuster le programme de la PCR et particulièrement la température d'hybridation progressivement, soit plus ou moins de 54.5 °C c'est-à-dire proche de la température initiale.

Le quatrième essai de la PCR a été réalisé en utilisant une température d'hybridation de 53°C (figure 12).

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

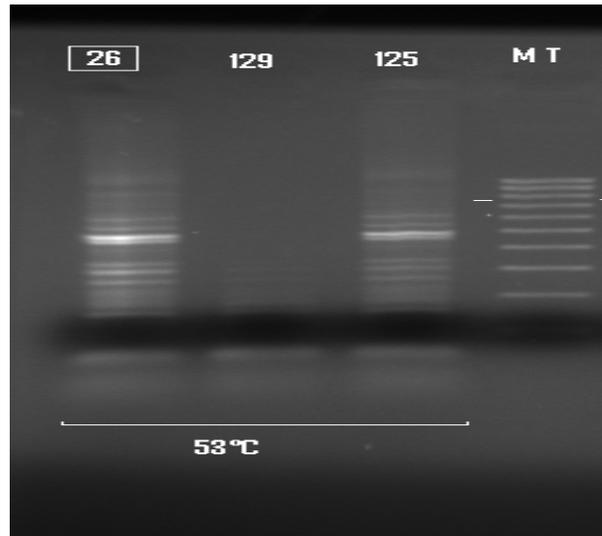


Figure 12

Electrophorèse après amplification du gène INS-VNTR

T_m d'hybridation des amorces 53°C

Nous observons dans ce cas :

- Une bande plus claire dans le cas des échantillons 26 et 125 qui correspond à un fragment de 400 Pb.
- Des bandes aspécifiques fines.

Par contre la bande spécifique de SNPs-23Hph1 est absente.

Ce résultat montre que la température 53°C n'est pas adaptée pour cette amorce.

Après toutes les températures d'hybridation testées, nous pensons que le problème de l'apparition de bandes aspécifiques vient très probablement de notre échantillon d'ADN (degré de pureté) ou des séquences des amorces. Pour ce deuxième cas une vérification des séquences des amorces et un réajustement des températures nous permettrons de mieux cibler le problème qui se pose.

Afin de vérifier la pureté de notre ADN, un autre gène a été amplifié. On a utilisé le gène HLA-DMB dont le protocole de préparation de la PCR est le même que CTLA4 et INS-VNTR sauf la température d'hybridation qui est de 62°C. Le résultat obtenu est illustré par la

Chapitre 3 -RESULTATS ET DISCUSSION

figure 13. Le contrôle de l'amplification s'effectué par migration sur gel d'agarose 2% en présence d'un marqueur de taille (Phi X 174).



Figure 13

Electrophorèse après amplification du gène HLA-DMB

T_m d'hybridation des amorces 62°C

La présence d'une seule bande spécifique correspondant à un fragment de 340pb a été observée dans tous les échantillons. Ce qui confirme que la présence de bandes aspécifiques dans les essais qui concernent les gènes CTLA4 et INS-VNTR est due aux séquences des amorces et non à la pureté de l'ADN. Nos échantillons ainsi amplifiés peuvent être utilisés pour des études ultérieures (exemple Les RFLP).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le diabète constitue une des maladies les plus répandues dans le monde et la deuxième en Algérie et ses symptômes apparaissent chez les individus longtemps après le déclenchement des causes. Cet aspect de la maladie entraîne une détérioration rapide de la santé des patients et la nécessité de l'administration de l'insuline. Les études effectuées sur le plan moléculaire tentent de trouver des gènes de susceptibilité à cette maladie ce qui permettra un diagnostic et une identification précoce des individus à risque.

Nous avons réalisé notre étude sur un échantillon de 106 personnes dont 47 femmes et 59 hommes. Parmi les femmes 28 sont atteintes de diabète de type 1 et chez les hommes 25. Nous pouvons conclure que l'analyse statistique, par le test khi deux, de notre échantillon montre qu'il n'y a aucun effet de la consanguinité ni de l'indice de masse corporelle ni l'effet du sexe sur le déclenchement du diabète de type 1.

En effet la littérature mentionne que les causes exactes de l'apparition du diabète de type 1 demeurent inconnues. Des facteurs environnementaux pourraient être impliqués. Cependant certains gènes de susceptibilité ont été décrits. Ces derniers diffèrent d'une population à une autre.

L'analyse moléculaire est la solution ultime pour la révélation des gènes susceptibles du DT1. Pour cela dans notre travail nous avons réalisé des extractions d'ADN puis des amplifications des gènes CTLA-4 et INS-VNTR.

Les extractions d'ADN ont été réalisées selon deux méthodes, sur un certain nombre d'échantillons, en vue d'une comparaison (extraction au phénol-chloroforme ou au NaCl). La première méthode est celle qui nous a donné satisfaction (volume de sang très petit, économique en produits et permet d'obtenir de l'ADN à un haut degré de pureté) et pour cela nous l'avons adopté pour l'ensemble des échantillons et la suite de notre étude.

L'amplification par PCR des deux SNPs étudiés, après une optimisation de la technique à plusieurs températures, nous a permis d'obtenir des échantillons qui pourront être utilisés dans des analyses ultérieures par RFLP. Les associations alléliques déterminées pourront servir de marqueurs pour une caractérisation moléculaire de notre population. Cette caractérisation aura pour but une meilleure prise en charge des individus et surtout l'identification précoce des individus à risque.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A. Doria, J. Lee, J. H. Warram and A. S. Krolewski: Cannot Be Positively Mapped to The VNTR Locus of the Insulin Gene. *Diabetologia* 1996;V39:594–599.
- Abdulbari Bener, Amer Alsaied, Maryam Ghanim Al-Ali et al: CD4-3 Vitamin D Deficiency In The Young Population With Type 1 Diabetes. *Diabetes research and clinical practice* [0168-8227] Bener yr:2008 vol:79 iss:1 pg:3
- Achenbach P, Warncke K, Reiter J, et al. :stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 2004; 53(2):384-392.
- Alison M Paterson & Arlene H. Sharpe: Taming Tissue-Specific T Cells: CTLA-4 Reins in self-reactive T Cells. (2010) *Nature Immunology* Volume: 11, Pages: 109–111 Year published:
- American Diabetes Association, Clinical Practice Recommendations, *Diabetes Care*, VOL 49, NO 2, SUPPL 2 FEBRUARY 2007
- Aouar Metri A. et al. : Caractérisation anthropo-génétique de la population de Oulhaca dans l'ouest algérien analyse comparative du polymorphisme des dermatoglyphes et des groupes sanguins ABO, Rhésus, MNS et Duffy à l'échelle de la méditerranée :2009. *Antropo*, 20, 57-70.
- Appleman Lj, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis Va.:CD28 Costimulation Mediates T cell expansion via IL-2-Independent and Il-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol* 2000; 164: 144–51.
- Ashton-Rickardt, P.G., Bandeira, A., Delaney, J.R., Van Kaer, L., Pircher, H.-P., Zinkernagel, R.M., and Tonegawa, S.: Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. (1994) *Cell* 76, 651–663.
- Bain et al: Insulin gene region–encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA–DR4–positive individuals. *Nat Genet.* 1992 Nov;2(3):212-5.
- Barratt et al : Remapping the Insulin Gene/IDDM2 Locus in Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2004 Jul;53(7):1884-9.
- Baum Jd, Ounsted M, Smith Ma. : Weight gain in infancy and subsequent development of diabetes mellitus in childhood. *lancet* 1975. 2(7940):866
- Belhadj M, Daoud A, Khalfa S, Malek R. : le Diabète en Algérie Présentation au deuxième Congrès Maghrébin d'endocrinologie Diabétologie Nutrition. Fèz, 24-27 Novembre 2005, Pages 34-40.
- Bell et al: A Polymorphic Locus near the Human Insulin Gene is Associated with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Diabetes* 1984; 33:176–183.
- Bennett & Todd: Human Type 1 Diabetes and the Insulin Gene: Principles of Mapping Polygenes. *Annu Rev Genet* 30:343-370. 1996
- Bennett et al: Susceptibility to Human Type 1 Diabetes at IDDM2 Is Determined by Tandem Repeat Variation at the Insulin Gene Minisatellite Locus. *Nat Genet* 9:284–292 .1995

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bhalla Ak, Amento Ep, Clemens Tl, Holick Mf, Krane Sm. :Specific High-Affinity Receptors For 1,25-Dihydroxyvitamin D3 In Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Presence In Monocytes and Induction In T Lymphocytes Following activation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983; 57(6):1308–1310.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S. et al: A Functional Variant Of Lymphoid Tyrosine Phosphatase Is Associated with Type 1 Diabetes. *Nat Genet* 2004; 36: 337–338.
- Carsten Geisler: Vitamin D Crucial To Activating Immune Defenses. *Nature Immunology*, 2010. doi:10.1038/ni.1851
- Chentoufi & Polychronakos. Insulin Expression Levels in the Thymus Modulate Insulin-Specific Autoreactive T-Cell Tolerance. *Diabetes* May 2002 vol. 51 no. 5 1383-1390
- Christen et al: Role for TNF-Alpha in Type 1 Diabetes. *Journal of Immunology*, 2001, 166: 7023-7032
- Concannon P, Gogolin-Ewens Kj, Hinds D, Wapelhorst B, Morrison Va, Stirling B, Mitra M, Farmer J, Williams Sr, Cox Nj, Bell Gi, Risch N, Spielman Rs: A Second-Generation Screen Of The Human Genome For Susceptibility To Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, *Nat Genet* 1998; 19: 292–296.
- D. Kantárová, M. Buc: Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus in Humans. *Physiol* 2007. Res. 56: 255-266.
- Danze et al: VNTR Alleles at The IDDM2 Locus. *Nat Genet* 1997; 15, 289 292.
- Debra Margulies, Berrin Ergun-Longmire, Svetlana Ten, Noel Maclaren, :*Endocrinology, Autoimmune Endocrine Disorders* .2010. Chapter 5 – Diabetes Mellitus
- Derbinski et al Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. Promiscuous Gene Expression In Medullary Thymic Epithelial Cells Mirrors The Peripheral Self. *nat. Immunol.* 2: 2001; 1032–1039.
- Devasenan Devendra, Edwin Liu, and George S Eisenbarth: Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 2004;328;750-754)
- Djoulah S.; Khalil I.; Beressi J. P.; Benhamamouch S.; Bessaoud K.; Deschamps I. ; Degos L.; Hors J.: The HLA-DRB1*0405 Haplotype is most Strongly Associated with IDDM in Algerians. *European Journal of Immun-Genetics*, 1992, 19: 381-89.
- Doria A, Lee J, Warram Jh, Krolewski As: Diabetes Susceptibility at IDDM2. *Diabetologia.* 1996 May;39(5):594-9.
- Elad Goldberga and Ilan Kraus: *Autoimmunity Reviews* Volume 8, Issue 8, July 2009, Pages 682-686.
- Erik Biros, Margaret A. Jordan and Alan G.: Baxter Genes Mediating Environment Interactions +In Type 1 Diabetes. *Rev Diabet Stud*, 2005, 2(4):192-207
- Faas & Trucco : the Genes Influencing the Susceptibility to IDDM in Humans. *J Endocrinol Invest* ;1994,17: 477-495.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Faas & Trucco Faas S, Trucco M.: The Genes Influencing the Susceptibility to IDDM in Humans. *J Endocrinol Invest* 1994; 17: 477-95.
- Feeney Sj, Myers Ma, Mackay Ir, Zimmet Pz, Howard N, Verge Cf, Rowley Mj: Evaluation of ICA512as in combination with other islet cell autoantibodies at the onset of IDDM. *Diabetes Care* September 1997 vol. 20 no. 9 1403-1407
- Fishman Ja, Rubin Rh. : La infection dans organe-transplantent des destinataires, 1998 N Angleterre *J Med* 338 (24): 1741-51.
- Frantisek Saudek, Tereza Havrdova, Petr Boucek, Ludmila Karasova, Peter Novota and Jelena Skibova: The Review of Diabetic Studie. Summer 2004, Vol. 1, Issue 2-
- Gerstein Hc.: cow's milk exposure and type 1 diabetes mellitus. a critical overview of the clinical literature. *diabetes care* 1994;17:13-9.
- Grimaldi, A. *Traité de diabétologie* Paris : Flammarion-Sciences, 2008
- Guy GORCHOV, Thomas PAPO: *Immunologie*, InterMed, 2000, 3-43
- H. Rifkin & D. Porte Jr., Ellenberg and Rifkin's « Diabetes Mellitus »: Theory and Practice, Elsevier, 1997, 4 ed., New York.
- Hanahan D. Peripheral-Antigenexpressing Cells in Thymic Medulla: Factors In Self-Tolerance And Autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol* 1998; 10:656–662.
- Heinz Feneis, Wolfgang Dauber: *Atlas of Human Anatomy* 2000.
- Heude et al.:The Insulin Gene Variable Number of Tandem Repeat: Associations and Interactions with Childhood Body Fat Mass and Insulin Secretion in Normal Children. 2006. 91 (7): 2770
- J. M. S. Bartlett and D. Stirling: *Methods in Molecular Biology*, 2003, Vol. 226, p65: PCR Protocols, Second Edition.
- Jjk Lutale, H Thordarson, Pi Holm, Ge Eide and K Vetvik: Islet Cell Autoantibodies In African Patients With Type 1 and Type 2 Diabetes In Dar Es Salaam Tanzania: A Cross Sectional Study; *Journal of Autoimmune Diseases* 2007, 4:4
- José Timsit. :The Eurodiab-Substudy-2 Study Group. Infections and Vaccinations As Risk Factors for Childhood Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: A Multicentre Case-Control Investigation. *Diabetologia* 2000; 43:47-53.
- Julier C, Lucassen A, Villedieu et al: multiple DNA variant association analysis: application to the insulin gene region in type 1 diabetes, 1994 *am j hum genet* 55:1247–1254
- Julier et al.: Insulin-IGF2 Region on Chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *nature*, 1991,354 : 155-159.
- Kennedy et al: the minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *nat genet* 9:293–298, 1995;
- Knip M, Veijola R, Virtanen Sm, Hyoty H, Vaarala O, Akerblom Hk.:Environmental Triggers and Determinants of Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2:S125-36.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Knip M. natural course of preclinical type1diabetes. *Horm Res* 2002 ;(suppl 1):6-11
- L. Vija,D. Farge,et al. :Mesenchymal Stem Cells: Stem Cell Therapy Perspectives for Type 1 Diabetes 2009. Volume: 35, Issue: 2, Pages: 85-93
- Ladner Mb, Bottini N, Valdes Am, Noble Ja: Association Of The Single Nucleotide Polymorphismc1858t Of The Ptpn22 Gene With T1D. *Hum Immunol* 2005; 66: 60–64.
- Larsen JI « Transplantation De Pancréas : Indications et Conséquences. August 17, 2004, doi: 10.1210/er.2002-0036
- Le Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière Algérie en collaboration avec L'office National des statistiques et des Représentations des Nations Unies A Alger 2009.
- Levy-Marchal C, Karjalainen J, Dubois F, Karges W, Czernichow P, Dosch Hm. :Antibodies Against Bovine Albumin and Other Diabetes Markers In French Children. *Diabetes Care* 1995; 18:1089-94.
- Lew A, Rutter Wj, Kennedy Gc: unusual DNA structure of the diabetes susceptibility locus IDDM2 and its effect on transcription by the insulin Promoter Factor Pur-1/Maz. 2000 *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12508–12512
- Linda K.Clayton et al :T-Cell Receptor Ligation by Peptide/Mhc Induces Activation Of A Caspase In Immature Thymocytes. , 1997 *Embo Journal* Vol.16 No.9 Pp.2282–2293
- Lucassen et al: susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR, 1993*nat genet* 4:305ec310.
- Lucassen et al: susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of dna spanning the insulin gene and associated VNTR. *nat genet* 4:305ec310, 1993 .
- Luppi P, Alexander A, Bertera S, Noonan K, Trucco M.: The same HLA-DQ alleles determine either susceptibility or resistance to different coxsackievirus-mediated autoimmune diseases. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1999;13:14–26.
- Lynn B Jorde et al. *Génétique médicale*; 2004; cha.12 p 319
- M. Alan Permutt, Jonathon Wasson, and Nancy Cox: Genetic epidemiology of diabetes . *J Clin Invest*. 2005;115(6):1431–1439.
- M.J. Simmonds and S.C.L. Gough :Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity, *British Medical Bulletin* 2005; 71: 93–113
- Maria Elfving et al.:Maternal Enterovirus Infection during Pregnancy as a Risk Factor in Offspring Diagnosed with Type 1 Diabetes between 15 and 30 Years of Age,Experimental. *Diabetes Research* Published online July 28. doi: 10.1155/2008/271958.
- Marika Kuuskeri. : Beta-Cell Autoimmunity Ab-HLA Conterrd Susceptibility to Type 1 Diabetes among Finnish Children, 2005; Pages 120.
- Marque O, Gough S, Heward J « HLA, CTLA-4 et PTPN22 : La Maître-Clef Génétique Partagée a L'autoimmunité *Revue Expertes Dans La Médecine Moléculaire* 7 (2007) (23): 1–15.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mathieu C, Laureys J, et al: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Prevents Insulinitis In nod Mice. *Diabetes*. 1992; 41(11):1491–1495.
- Mein Ca, Esposito L, Dunn Mg, et al: A Search for Type 1 Diabetes Susceptibility, Genes in Families from the United Kingdom. *nat Genet* 1998; 19:297-300.
- Mohamed A. Abdullah, Frcp, Frcp.: Epidemiology of Type 1 Diabetes Mellitus among Arab Children 2005, vol. 26, no6, pp. 911-917 [7 page(s) (article)] (72 ref.).
- Mourad Aribi. : HLA-DR Phenotypic Frequencies and Genetic Risk of Type 1 Diabetes in West Region of Algeria, Tlemcen 2004.
- National Diabetes Data Group. :Classification and diagnosis of Diabetes Mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 1979, 28, 1039-57.
- Nistico L et al: The CTLA-4 gene region of Chromosome. *Hum. Mol. Genet.* (1996) 5 (7): 1075-1080.
- Owerbach et Gabbay : Linkage Of The VNTR/Insulin-Gene and Type I Diabetes Mellitus: Increased Gene Sharing In Affected Sibling Pairs. *am. J. Hum. Genet.* 1994,54:909-912,.
- Oyarzun A, Santos JI et al. :Bovine Serum Albumin (Bsa) Antibodies In Children With Recently Diagnosed Type 1 Diabetes With Breast Feeding And Milk Exposition. *Rev Med Chil* 2003; 131:865-72.
- Paquette, J., Giannoukakis, N., Polychronakos, C., Vafiadis, P. & Deal, C.: The Ins 5' Variable Number Of Tandem Repeats Is Associated With IGF2 Expression In Humans. *Journal of Biology Chemistry*; 1998; 273, 14158–14164.
- Pouvert C. : *Immunologie*, 1991 Volume 6, Issue 5, Pages 25-30.
- Pugliese et al: the insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *nat genet*, 1997, 15 : 293-297.
- R. Fakfak, S. Haddouk et al: pancreatic autoantibodies in tunisian children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pathologie Biologie* May 2008, Volume 56, Issue 3, Pages 130-132.
- Rich, Surmin: Blockade of Insulin-Like Growth Factor I– estimated proliferation of Human osteosarcoma Cells; 1990. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1349-1353.
- S.Caillat-Zucman: *Approche Immunogénétique du Diabète de Type1 Chez L'homme* 2000
- Salah Zaoui, Christian Biemont, Kaoual Meguenni. : *Approche Epidémiologique du Diabète en Milieux Urbain et Rural dans la Région de Tlemcen (Ouest Algérien)* .2007 *Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé* . Volume 17, Numéro 1, 15-21.
- Scheipers P, Reiser H. : Fas-independent death of activated CD4(+) T Lymphocytes Induced by CTLA-4 cross linking. *proc natl acad sci USA* 1998; 95:10083–8.
- Smith et al.: Pancreatic Gene Expression in Rare Cells of Thymic Medulla: Evidence For Functional Contribution To T Cell Tolerance. 1997 *Int Immunol* 9:1355ec1365.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Stead et al: influence of allele lineage on the role of the insulin minisatellite in susceptibility to type 1 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* (2000) 9 (20): 2929-2935.
- T. Bienvenu, C. Meunier, S. Bousquet, S. et al : *Annales de Biologie Clinique.* , Janvier - Février 1999, Volume 57, Numéro 1, 77-84 Pratique quotidienne.
- The Eurodiab Substudy 2 Study Group.: Vitamin D Supplement in Early Childhood And Risk For Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus. *Diabetologia.* 1999; 42(1):51–54.
- Thebault-Baumont Ket al : Acceleration Of Type 1 Diabetes Mellitus In Proinsulin 2-Deficient Nod Mice. *J Clin Invest* 2003; 111: 851– 857.
- Tong Sun et al: Functional Genetic Variations in Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 and Susceptibility to multiple types of Cancer. 2010, Volume 25, Number 1, 39-45
- Tony Merriman: vers une Compréhension des Causes Génétiques du Diabète. Mars 2004 Volume 49 ; Numéro 1.
- Toussirot E, Wendling D. Les Voies de Co-Stimulation Lymphocytaire : Rôles Dans La Réponse Immunitaire et les Pathologies Auto-Immunes. *Réflexions Rhumatologiques.* 2005, N°84; 18-23.
- Undlien et al Undlien De, Bennett St, Todd Ja et al. insulin gene region-encoded susceptibility to IDDM maps upstream of the insulin gene. *Diabetes*, 1995, 44: 620-625.
- Vafiadis P et al : insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR Alleles at The IDDM2 Locus. 1997 *Nat Genet* 15:289–292
- Virtanen S et al : Cow's Milk Consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. childhood diabetes in finland study group. *Diabetes* 2000;49:912-7.
- Y. Park, G.S. Eisenbarth, S. Taylor, D. Leroith, J. Olefsky (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.: *Diabetes Mellitus A Fundamental and Clinical Text*, Second ed., Pp. 347–362, 2000.
- Yoon JW, Jun HS, Santamaria P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity* 1998; 27: 109-122.
- Yoon Jw, Jun Hs. Autoimmune Destruction of Pancreatic Beta Cells. *Am J Ther.* 2005 Nov-Dec;12(6):580-91.
- Yu-Ching Weng et al: CT60 Single Nucleotide Polymorphism of The CTLA-4 Gene Is Associated with Susceptibility to Graves' disease In the Taiwanese Population. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 35:259-264 (2005)

CONSENTEMENT A L'ETUDE ET AUX PRELEVEMENTS SANGUINS
A VISEE DE RECHERCHE GENETIQUE

PATIENT

Je soussigné (e)
NOM.....Prénom.....

Date de naissance.....

Adresse.....

Téléphone

Certifie avoir reçu et compris toutes les informations concernant ce programme de recherche
sur la (diabète type1) du Docteur

NOM.....Prénom.....

Signature du Médecin

1- Projet de recherche :

- J'accepte de subir des prélèvements sanguins afin d'analyser mon ADN pour l'étude de la prédisposition au (diabète)... . Les recherches qui seront entreprises auront pour but d'étudier les mécanismes de survenue et l'existence d'un éventuel terrain génétique. Aucune autre étude ne pourra être réalisée sans mon accord.
• Je consens au recueil, à la saisie et au traitement des données contenues dans mon dossier médical par des personnes tenues au secret professionnel. Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles.
• Je consens au transfert de données anonymes et d'échantillons d'acides nucléiques aux membres du consortium international, dans le cadre de ce programme de recherche.
• Je consens à être contacté par téléphone par un enquêteur soumis au secret professionnel, dans le cadre de ce programme de recherche. OUI NON

2- Dans la mesure où ces recherches peuvent permettre d'obtenir des informations médicales utiles (identification d'une caractéristique génétique en rapport avec le diabète) me concernant :

Oui, je souhaite être contacté afin que ces résultats me soient personnellement communiqués et expliqués. Ces résultats relèvent du secret médical et ne seront transmis qu'à moi même et en aucun cas à un autre membre de ma famille.

Non, je ne souhaite pas être contacté

J'ai reçu une information écrite me permettant de prendre cette décision en toute connaissance et de comprendre les implications de ma démarche, tant pour moi-même que pour ma famille.

Fait à Le.....
Signature.....

Extraction de l'ADN

Composition des solutions d'extraction de l'ADN du NaCl

➤ TE 10/10 pH 8.0.

1. Composition :
Tris/HCL 10 mM pH 8.0
2. Préparation 1L :
10ml Tris/HCL 1M pH8.0
20ml EDTA 0, 5M pH 8.0
H₂O qsp 1L

➤ Solution de lyse des Globule Blanc.

1. Composition :
Tris/HCL 10 mM pH 8.0
EDTA 0.1mM pH8.0
SDS 0.5%
2. Préparation 100 ml :
1ml Tris/HCL 1M pH8.0

20ml EDTA 0, 5M pH 8.0
5ml SDS 10%
H₂O qsp 100ml

La solution mère: NaCl 5 M

Composition des solutions d'extraction de l'ADN du phénol/chloroforme :

➤ Tampon de lyse I

10 ml de Tris-HCl 1M pH 7,5
0,584 g de NaCl
0,61 g MgCl₂, 6H₂O
H₂O MILLI-Q distillé : 1l

➤ Tampon de lyse II

40 ml d'EDTA 0,5M pH8
80 ml de Tris-HCl 1M pH8
60 ml de H₂O MILLI-Q
Ajuster avec 20 ml de SDS 10%

➤ TBS

Pour 100 ml

20 mM Tris pH 7,5 (peser 0,242 g de Tris) + 150 mM NaCl (peser 0,876 g NaCl)

Ajuster à 100 ml avec de l'eau

TE (1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl)

Pour 100 ml : peser 0,121 g de Tris et 0,0372 g d'EDTA

Mélanger 1 ml Tris-HCl 1M pH8 et 0,2 ml EDTA 0,5M pH8

Electrophorèses Gel d'agarose :➤ Préparation de gel d'agarose

-Préparer un gel d'agarose 2%

-Ajouter 4µl de BET (Bromo d'Ethidium) 10mg/ml, Homogénéiser

-Positionner le peigne

➤ Préparation de tampon de migration (TBE 10 X)

-Tris/HCL 0.89 M

- Acide Borique 0.89 M

-EDTA Na² 25mM

- PH=8

➤ Préparation du tampon de charge (Bleu de Boromo phénol /sucrose 20/40)

1. composition de Bleu

*Tris /HCL 0.2M pH 7.6

*EDTA 0.2MpH 8.0

* Bleu de Boromo phénol 0.4%

Composition de sucrose 40%

PCR :➤ **Amorces**

- ✓ Primer pour le gène INS-VNTR -23 A/T (SIGMA-ALDRICH).

Sense: F5' TAATGACCCGCTGGTCCTGAGGA3'

Antisense: R5' ACGTGACCAAGAGAACTTCTT3'

- ✓ Primer pour le gène CTLA4 +49A/T

Sense: F5'- GTC AAG GGA CCA TTA GAA -3 ' et

Antisense: R 5'- CTT TGC AGA AGA CAG GGA TGA A -3'

➤ **Protocole d'amplification CTLA4**

Solution	concentration	Quantité (µl)
DNA	(100-200)ng	1,5
dNTP	(20mM)	2,5
Buffer	(10X)	2,5
Forward	(42nmol)	1,75
Revers	(40 nmol)	1,75
Mgcl2	(25mM)	1,75
Taq Poly,	(5U)	0,3
H2O st		12,95

➤ **Protocole d'amplification INS-VNTR**

Solution	concentration	Quantité (µl)
DNA	(100-200 ng)	1
dNTP	(10mM)	0,5
Buffer	(10X)	2,5
Forward	(200ng/µl)	0,5
Revers	(200ng/µl)	0,5
Mgcl2	(50mM)	0,5
Taq Poly,	(5U)	0,3
H2O st		19,2

➤ **Protocole d'amplification HLA-DMB**

Solution	concentration	Quantité (µl)
DNA	(100-200)ng	1,5
dNTP	(20mM)	2,5
Buffer	(10X)	2,5
Forward	(10mM)	1,75
Revers	(10 mM)	1,75
Mgcl2	(25mM)	1,75
Taq Poly,	(5U)	0,5
H2O st		12,75

الخلاصة:

الوراثة الجزيئية والتقنيات المستخدمة فيها صارت هي الآن صاحبة الحلول للمعرفة في الدراسات الحيوية ولما لها من فوائد ومردود زاهر من المعرفة الدقيقة للهدف المدروس فقد تبيننا دراسة الإشكال المتنوعة للمورثات الجزيئية عند مرض السكر من النوع الأول في الغرب الجزائري . الدراسة الإحصائية شملت 106 شخص 47 أنثى منهن 28 مصابات بالمرض و59 ذكر منهم 25 شخص مصاب أيضا بمرض السكر النوع الأول لتحديد العلاقة بين المرض و صلة القرابة والجنس وكتلة الجسم وخلصنا إلى هذه العوامل لم تساهم في ظهور هذا المرض. الدراسة الجزيئية تهدف لمعرفة مشاركة المورثات في التسبب بهذا المرض أو النفي وذلك باستخلاص الحمض النووي للعينات المراد دراستها ومعرفة نقائه وقابليته لمواصلة الدراسة ومضاعفة الجزء المطلوب من المورثات باستخدام التقنيات الجزيئية عن طريق تفاعل البلمرة ، وأخيرا، فإن تضاعف أجزاء من مورثتين الجينات باستخدام طريقة تفاعل البلمرة .

الكلمات المفتاحية: عينه من الناس من الغرب الجزائري ، صلة القرابة ، الجنس، مؤشر كتلة الجسم ، الحمض النووي ، تعدد إشكال المورثة ، مرض السكري النوع الأول ، مورثة الأنسولين ، مورثة التسمم الخلوي للمفاوي نوع ت، تفاعل البلمرة.

Résumé:

Les techniques de biologie moléculaire représentent l'ultime solution utilisée pour les études biologiques fines. En raison de leurs avantages et bénéfiques dans l'exploration des différents polymorphismes liés aux gènes de susceptibilité du diabète de type I, nous avons procédé à l'étude du polymorphisme du gène de l'insuline (INS-VNTR) et du gène CTLA4 dans la population de l'ouest Algérien.

L'étude statistique, a porté sur un échantillon de 106 personnes dont 47 femmes et 59 hommes. Parmi les femmes 28 sont atteintes de DT1 et 25 chez les hommes. L'étude de l'effet de la consanguinité, du sexe et de l' indice de masse corporelle sur l'apparition de DT1. Nous a permis de conclure que n'est pas de la relation sur l'apparition de DT1 avec ces paramétrés épidémiologique.

L'analyse moléculaire pour étudier l'association des gènes de susceptibilité à cette maladie, a été entamée par l'extraction de l'ADN des échantillons recueillis, puis leur dosage spectrophotométrique afin de vérifier la pureté de nos échantillons, et enfin l'amplification de certaines parties de deux gènes par la méthode de PCR.

Mots-clés: population ouest Algérienne, consanguinité, le sexe, l'IMC, polymorphisme, diabète type 1, ADN, INS-VNTR, CTLA-4, PCR.

Summary:

The techniques of molecular biology represent the ultimate solution used for the fine biological studies. Because of their advantages and benefit in browsing various polymorphisms related to susceptibility genes of the type 1 diabetes mellitus, we preceded investigations about polymorphism of the insulin gene (INS-VNTR) and CTLA4 gene in the population of the west-Algeria.

The statistical study, examined a sample of 106 persons including 59 men and 47 femmes. Among women with T1D and 28 are males 25 to determined the relationship or the effect of consanguinity, sex, body mass, with T1D. We concluded that T1D affects both sexes without discrimination.

The Molecular analysis to study the association of susceptibility genes with type 1 diabetes mellitus, we started by the DNA extraction of the samples collected, then we carried out the spectrophotometric dosage in order to check the purity of our samples, and to estimate the possibility of continuing the amplification step by PCR.

Thereafter, The amplification of sequence of two genes by PCR method.

Keywords: west Algeria population, Consanguinity, sex, body mass polymorphism, type 1 diabetes, DNA, INS-VNTR, CTLA-4, PCR.