



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé :

**Les maladies génétiques à composante mitochondriale :
L'exemple du diabète mitochondrial
Implication du polymorphisme du gène *CYP1A1***

Présenté et soutenu par : MESSIKH Faiza
NESSAIB Imène

Le : 03/07/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr CHAOUI Naouel (MC.A - UFM Constantine I).

Rapporteur : Dr REZGOUNE Mohamed Larbi (MC.B - UFM Constantine I).

Examineur : Melle BENLATRECHE Moufida (MA.A - UFM Constantine I).

**Année universitaire
2016 - 2017**

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Allah, Le Tout Puissant et Le Tout Miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme notre formation Master.

Au **Professeur SATTA Dalila**, responsable du parcours Master Génétique Moléculaire, pour tout ce que vous nous avez légué durant ces deux années, merci pour le savoir, pour la rigueur, le grand merci surtout pour nous avoir transmis votre passion pour la génétique et la recherche scientifique.

Nos vifs remerciements au **Professeur ABADI Noureddine** de nous avoir accueilli au sein du laboratoire de recherche de Biologie et Génétique Moléculaire du CHU Ben Badis, pour les moyens mis à notre disposition ainsi que la liberté qu'il nous a laissé pendant la durée de la partie pratique, et sans qui, la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible.

Nous adressons notre plus profonde reconnaissance et nos plus chaleureux remerciements à notre encadreur **Docteur REZGOUNE Mohamed Larbi** pour nous guider tout au long de la réalisation de ce travail, pour son esprit scientifique, ses précieux conseils et ses encouragements. Soyez assuré de tout notre respect et de notre profonde gratitude.

Nous tenons à exprimer nos meilleurs remerciements aux **Docteur CHAOUI Naouel** qui nous fait l'immense l'honneur de présider notre jury de soutenance, ainsi que **Melle BENLATRECHE Moufida** pour avoir bien voulu examiner et évaluer notre modeste travail de recherche. J'espère, honorables enseignants, que vous allez trouver dans ce manuscrit les fruits de votre formation et de votre dur labeur ces années durant à nos prodiguer, de la meilleurs des façons, les enseignements en sciences biologiques. Nous vous seront éternellement reconnaissantes.

Nous adressons nos vifs remerciements à **toute l'équipe de formation Génétique (Licence et Master)** pour les efforts consentis dans notre formation durant ces années d'études.

Enfin, à tous ceux qui, de près ou de loin, nous ont aidés et encouragés dans la concrétisation de ce travail ... Merci infiniment.

Dédicaces

Je dédie ce travail de mémoire en particulier à ma très chère mère et mon cher père qui m'ont parfaitement guidé depuis mon enfance vers le bon chemin, et m'ont apporté soutien réconfort, tendresse et amour.

À mes sœurs : KHADÎDJA, HALIMA et ZEINEB,

À Mon frère : SOFIANE,

À Ma nièce : CHAHD TASNIM,

À toute ma grande famille sans aucune exception.

À mon binôme IMENE ainsi qu'à tous mes meilleurs amis : MAROUA, SOUMIA et LAMIA.

À toute la section des généticiens, et enfin à toute personne qui m'a aidé de près ou de loin pour terminer ce travail.

... FAIZA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma très chère et douce mère FADILA, mon très cher père MOHAMED à qui m'adresse au ciel les vœux les plus ardents pour la conservation de leur santé et de leur vie.

À mes chers frères : FAYÇAL et LOTFI les meilleurs vœux de réussite spéciale dédicace pour ma grande mère MESSAOUDA qui je la respecte beaucoup.

À tous mes tantes et oncles,

À toute ma famille et à ma collègue: FAIZA,

À tous ceux qui en contribuent de près ou de loin à réaliser ce travail.

... IMEN

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique / **ADNmt** : ADN mitochondrial
ADP : Adénosine Di-Phosphate
AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor
ARNm : ARN messenger / **ARNr** : ARN ribosomal / **ARNt** : ARN de transfert
ATP : Adénosine Tri-Phosphates
BBP : Bleu de Bromo-Phénol
BET : Bromure d'Éthidium
CSB : Conserved Sequence Box
CYP : cytochromes P450
DID : Diabète Insulino-Dépendant
DNID : Diabète Non-Insulino-Dépendant
dNTP : deoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphates
DO : Densité Optique
DT1 et DT2 : Diabète Type 1 et 2
EDTA : Ethylene Diamino Tetracetic Acid
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
FID : Fédération Internationale du Diabète
GEDIAM : Groupe d'Étude des DIABÈTES Mitochondriaux
HLA : Human Leukocyte Antigen
HPL : Hormone Placentaire Lactogène
HSP et LSP : Heavy and Light Strand Promoter
IC : Intervalle de Confiance
IMC : Indice de Masse Corporelle
kDa : kilo-Dalton
MELAS : Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
MERRF : Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
MIDD : Maternally Inherited Diabetes and Deafness
MODY : Maturity Onset Diabetes of the Young
MRP : Mitochondrial RNA Processing
MTRPOL : Mitochondrial RNA polymerase
mtSSB : mitochondrial Single Strand Binding Protein
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OR : Odds Ratio
PCR : Polymerase Chain Reaction
PPi : Préparation Pour injectable
RCAD : Renal Cysts And Diabetes
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS : Sodium Dodécyle Sulfate
SNP : Single Nucleotides Polymorphisms
Taq : *Thermus aquaticus*
TBE : Tris-Borate-EDTA
TE : Tris-EDTA
TFAM : Mitochondrial Transcription Factor A
TFAM et TFBM : Mitochondrial Transcription Factor A et B
VNTR : Variable Number Tandem Repeat

Table des matières

Introduction	01
---------------------------	-----------

Partie bibliographique

Chapitre I : La mitochondrie

1- Origine	03
2- Structure	03
3- Fonctions de la mitochondrie	04
3-1- Le métabolisme énergétique	05
a- La β-oxydation	05
b- Le cycle de Krebs	05
c- La phosphorylation oxydative	05
3-2- L'apoptose	07
3-3- L'homéostasie calcique	07
3-4- Les espèces réactives de l'oxygène	07
4- Génétique mitochondriale	08
4-1- Organisation du génome mitochondrial	08
4-2- Réplication de l'ADN mitochondrial	09
4-3- Expression des gènes mitochondriaux	09
5- Particularités génétiques	10
5-1- Transmission maternelle	10
5-2- Hétéroplasmie et effet de seuil	10
5-3- Ségrégation mitotique	11
5-4- Taux de mutation plus élevé que les gènes nucléaires	11
6- Les maladies mitochondriales	11
6-1- Définition	11
6-2- Classification	12
a- Maladies liées à des mutations dans l'ADNmt	12
b- Maladies liées à des mutations du génome nucléaire	14

Chapitre II : Physio-pathologie du diabète

1- Définition	15
2- Épidémiologie	15
3- Classification et physio-pathologie	16
3-1- Le diabète de type I	16
3-2- Le diabète de type II	17
3-3- Le diabète gestationnel	19
4- Étiologie	19
5- Symptomatologie clinique et biologique	20
6- Génétique des diabètes	21
7- Implications physiopathologiques du métabolisme oxydatif : cytochromes P450	24

Chapitre III : Diabètes mitochondriaux

1- Définition	25
2- Physiopathologie du diabète mitochondrial	25
3- Diagnostic clinique et biologique	26
4- Aspect génétique	28
5- Polymorphisme génétique : le gène <i>CYP11A1</i>	29

Partie pratique

Patients et méthodes

I- Patients et témoins	31
1- Patients	31
2- Témoins	31
II- Étude moléculaire	31
1- Extraction d'ADN à partir de sang total	31
3-1- Le prélèvement sanguin	31
3-2- L'extraction de l'ADN	32
2- Détermination de la concentration, la pureté et de la qualité de l'ADN extrait	33
3- Génotypage du <i>CYP11A1</i>	33
3-1- Amplification de la région 3' non codante du <i>CYP11A1</i>	34
3-2- Digestion et migration sur gel d'agarose	35
a- Principe	35
b- Mode opératoire	36
3-3- Analyse statistique	38

Résultats et discussion	40
-------------------------------	----

Conclusion et perspectives	54
----------------------------------	----

Références bibliographiques	56
-----------------------------------	----

Résumés

Liste des figures

Figure 01 : Schéma descriptif de la structure mitochondriale	03
02 : Organisation de la chaîne de transport des électrons	06
03 : Organisation du génome mitochondrial humain	08
04 : Atteintes multi-viscérales des maladies mitochondriales	12
05 : Cartographie des mutations pathologiques de l'ADNmt	14
06 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète type 1	17
07 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète type 2	18
08 : Représentation schématique du site de restriction de l'enzyme <i>HpaII</i>	36
09 : Représentation schématique du résultat de l'analyse RFLP du polymorphisme du gène <i>CYP11A1</i> sur un fragment PCR digéré par <i>HpaII</i>	37
10 : Arbres généalogiques des familles touchées par diabète mitochondrial	43
11 : Fréquences génotypiques du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i> dans notre population .	48
12 : Fréquences alléliques du polymorphisme T3801C du <i>CYP11A1</i> dans notre population	48

Liste des photographies

Photographie 01 : Profil de restriction des produits de l'amplification partielle de la région 3' non codante du gène <i>CYP11A1</i> après digestion par <i>HpaII</i>	47
--	-----------

Liste des tableaux

Tableau I : Descriptif des polymorphismes communs du gène <i>CYP1A1</i>	30
II : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de la région 3' non codante du gène <i>CYP1A1</i>	34
III : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région 3' non codante du gène <i>CYP1A1</i>	35
IV : Programme du thermocycleur pour l'amplification de la région 3' non codante du gène <i>CYP1A1</i>	35
V : Tableau de contingence croisé type pour une étude cas-témoins	39
VI : Modèles de comparaison utilisés pour notre étude cas-témoins.....	39
VII : Caractéristiques clinico-biologiques des patients avec un diabète mitochondrial	40
VIII : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme T3801C du <i>CYP1A1</i>	47
IX : Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme T3801C du <i>CYP1A1</i>	49

Le diabète est une maladie métabolique chronique qui se caractérise par une hyperglycémie chronique résultante d'un défaut de l'insulino-sécrétion : Diabète Type 1 (DT1), ou d'insulino-sensibilité : Diabète Type 2 (DT2), ou de ces deux anomalies associées. Il se définit par une hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l (7 mmol/l) à deux reprises (**ADA, 2007 ; 2008**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 347 millions de personnes sont diabétiques dans le monde. En 2004, on estimait que 3,4 millions de personnes étaient décédées des conséquences d'une glycémie élevée à jeun. En 2010, le nombre de décès a été comparable. Plus de 80 % des décès par diabète se produisent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire. Le diabète pourrait devenir la 7^{ème} principale cause de décès dans le monde d'ici 2030 (**OMS, 2011**).

Les diabètes mono-géniques représentent 1 à 2 % des diabètes. Il s'agit d'un cadre hétérogène au plan génétique et clinique. Selon leur présentation, on peut les classer en trois groupes :

- Le diabète dit : Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY), de phénotype variable ;
- Le diabète est associé à des atteintes extra-pancréatiques, en particulier une atteinte rénale dans le syndrome dit Renal Cysts And Diabetes (RCAD), ou une surdité et une dystrophie maculaire dans le Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD) dû à une mutation de l'Acide Désoxyribo-Nucléique (ADN) mitochondrial ;
- Le diabète, de survenue très précoce, habituellement de révélation néonatale (**Timsit et al., 2009**).

Le diagnostic précis est important pour des raisons tenant au pronostic, à la prise en charge thérapeutique, à la détection d'anomalies associées au diabète et dans l'éventualité d'un dépistage familial. Avant de réaliser toute analyse génétique, il est nécessaire d'éliminer le diabète de type 1 et le type 2 (**Grimaldi, 2009**).

Le diabète mitochondrial par mutation ou délétion dans l'ADN de cet organelle et une entité pathologique à part caractérisée par une transmission maternelle et un phénotype évocateur : indice de masse corporelle bas, petite taille (chez les seuls patients masculins), atteintes extra-pancréatiques (surdité neurosensorielle, dystrophie maculaire réticulée et atteintes neurologiques). Le diabète se présente cliniquement comme un type 1 ou un type 2 (80 % des cas), et est lié à un déficit primitif de l'insulino-sécrétion secondaire à la dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le diagnostic moléculaire est réalisé principalement à partir de leucocytes sanguins. Près de 20 mutations et des délétions dans le génome mitochondrial, responsables de phénotypes comportant inconstamment un diabète, ont été rapportées à ce jour (**Loubliera et al., 2009**).

L'objectif de ce mémoire de Master est de faire, tout d'abord, une revue bibliographique bien documentée et actualisée sur les diabètes mitochondriaux en mettant l'accent sur les étiologies possibles ainsi que les modes de transmission de ce dysfonctionnement.

Dans la partie pratique de ce mémoire de Master nous allons :

- Réaliser une enquête statistique descriptive, rétrospective (étalée sur une année, de Mars 2016 à Mars 2017) à partir des dossiers de patients diabétiques recrutés au niveau du Service de médecine interne du CHU Ben Badis Constantine et de l'association des diabétiques de Bâb-El-Kantara.
- Apporter des éléments de réponse concernant l'incidence des diabètes mitochondriaux dans la région de Constantine.
- Essayer, par la réalisation d'un questionnaire et/ou recueil des données à partir des dossiers de patients diabétiques, de déterminer les caractéristiques cliniques, biologiques et génétiques du dysfonctionnement étudié.
- Réaliser une étude moléculaire pour prospecter l'implication du polymorphisme T3801C du gène *CYP11A1* dans la survenue du diabète mitochondrial.
- Confronter les résultats obtenus avec les données de la littérature.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LA MITOCHONDRIE

1- Origine :

Le fait que la mitochondrie possède son propre ADN (ADNmt), comme les chloroplastes, indique une origine exogène : il est maintenant admis que les mitochondries proviennent de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie il y a environ 2 milliards d'années. Cette théorie endosymbiotique de l'origine des mitochondries, a été développée et argumentée par *Lynn Margulis* dès 1966, puis a été appuyée par la découverte de l'ADN spécifique des mitochondries en 1980. Il semble qu'au cours de l'évolution l'ADN originel de la bactérie ait subi diverses évolutions, perdu un grand nombre de gènes, parfois transféré dans l'ADN de la cellule hôte. Parallèlement à ce report de la synthèse de certaines protéines vers l'hôte, ce dernier a développé un arsenal de translocases, enzymes permettant le transfert de ces protéines vers la matrice mitochondriale (Grey et al., 2001 ; Wallace et al., 2007).

2- Structure :

Les mitochondries sont des organites cytosolique polymorphes présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des hématies. De forme oblongue, les mitochondries ont une taille qui varie entre 1 à 10 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large et leur nombre varie chez l'homme entre 500 et 2000 mitochondries par cellule et cela en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. La mitochondrie est entourée de 2 membranes, une externe et une interne qui délimitent deux compartiments bien séparés : l'espace inter-membranaire et la matrice (figure 01) (Alberts et al., 2002 ; Callen et Perasso, 2005).

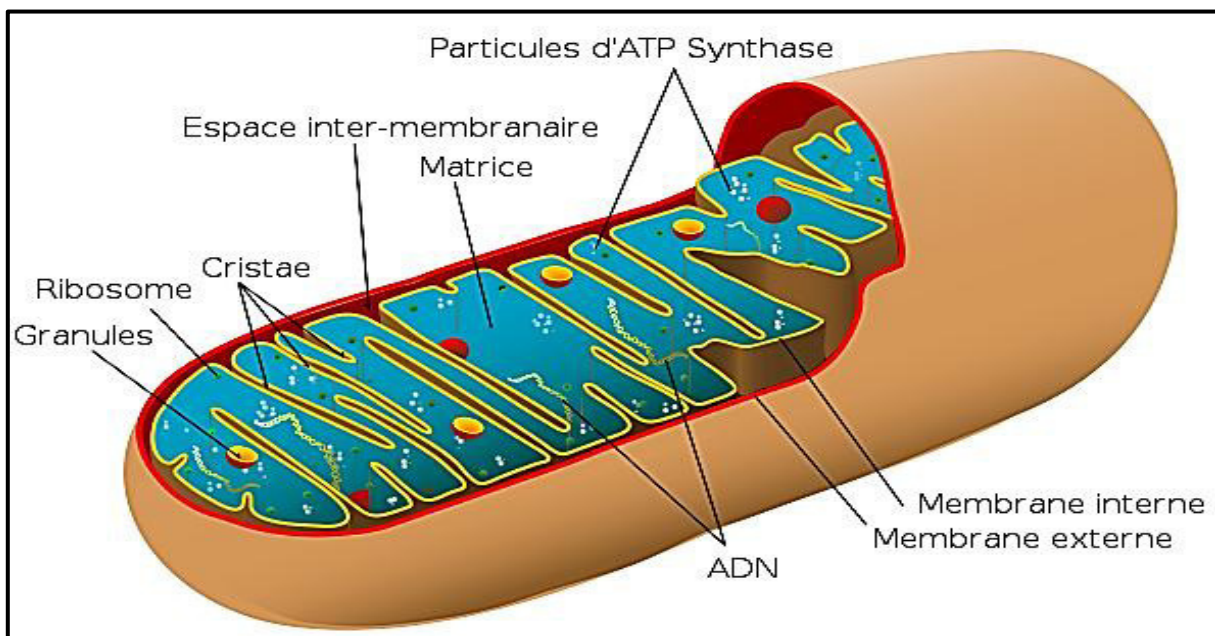


Figure 01 : Schéma descriptif de la structure mitochondriale (Logan, 2006).

La membrane externe est caractérisée par la présence de canaux (porines) la rendant perméable aux molécules de poids inférieur à 10 kilo-Dalton (kDa). Cependant la membrane interne est imperméable et est caractérisée par la présence d'un phospholipide particulier, la cardiolipine. Elle s'invagine, formant les crêtes mitochondriales dont le nombre et l'organisation varient en fonction du type cellulaire. L'espace inter-membranaire possède une composition proche du cytosol et est chargé positivement grâce à sa richesse en protons. La matrice, compartiment interne de la mitochondrie, est le siège de nombreuses voies métaboliques tels que la β -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs, et renferme l'ADNmt, les ribosomes mitochondriaux et des ARN de transfert (ARNt). La morphologie et la localisation intracellulaire diffèrent également selon les tissus. Le nombre de mitochondries par cellule est très variable, de un à plusieurs milliers. En effet, les tissus neurologiques, musculaires et cardiaques, plus nécessitent en énergie, possèdent beaucoup plus de mitochondries par cellule. Ce nombre peut également varier selon les besoins énergétiques. Par exemple, un muscle squelettique peut augmenter de cinq à dix fois sa masse mitochondriale lorsqu'il passe du repos à un effort nécessitant une stimulation intense. Ces organites particuliers forment un réseau dynamique complexe au niveau du cytoplasme de chaque cellule. Ce réseau est en constant équilibre entre une forme dite granuleuse et une autre qualifiée de filamenteuse. Ce remodelage continu est régi par deux mécanismes qui sont la fusion, à l'origine de l'état filamenteux, et la fission, entraînant la formation d'un réseau fragmenté. Grâce à cet équilibre entre fusion et fission, les mitochondries peuvent s'adapter aux différentes conditions cellulaires. Leur demi-vie est de l'ordre de 6 à 10 jours suivant les cellules (Alberts *et al.*, 2002 ; Scheffler, 2008).

3- Fonctions de la mitochondrie :

Les mitochondries participent à de nombreuses fonctions au sein de la cellule. Elles occupent une place primordiale dans le métabolisme énergétique cellulaire mais participent également à d'autres processus biologiques. Parmi les fonctions les plus importantes, on retrouve également un rôle dans le cycle de Krebs, l'oxydation de tous les substrats énergétiques issus des glucides, des lipides (β -oxydation) et des acides aminés (transaminases, cycle de l'urée et cycle de Krebs), la synthèse de nombreux composés indispensables (cholestérol, hormones stéroïdes, hème et centres Fer-Soufre), l'homéostasie calcique, la modulation de la mort cellulaire, la production et la neutralisation des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et la thermogénèse. Certaines de ces fonctions ne sont présentes que dans les mitochondries de certains tissus montrant la spécialisation de ces organelles en fonction des organes : par exemple thermogénèse dans le tissu adipeux brun, cycle de l'urée dans le foie et partiellement le rein, synthèses hormonales dans la surrénale (Alberts *et al.*, 2002 ; Scheffler, 2008).

3-1- Le métabolisme énergétique :

La mitochondrie peut être définie comme la centrale énergétique de la cellule. Elle est, en effet, le siège des voies métaboliques terminales de dégradation des molécules énergétiques et de la phosphorylation oxydative. La mitochondrie produit l'essentiel de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphates) qui est le principal intermédiaire donneur d'énergie dans les systèmes biologiques. Le taux de renouvellement de l'ATP est très important : les besoins quotidiens sont estimés à 70 kgalors que sa demi-vie n'est que de quelques minutes (Lescuyer, 2002).

a- La β -oxydation :

Les acides gras sont stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides. Ils sont libérés par l'action de lipases puis activés en acyl-coenzyme A (acyl-CoA) par l'acyl-CoA synthétase, en présence d'ATP et de coenzyme A. Les acides gras activés doivent ensuite pénétrer dans la matrice mitochondriale pour y être dégradés. Dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA sont dégradés par un cycle récurrent de 4 réactions : la β -oxydation. La première étape est une oxydation liée au FAD (Flavine Adénine Dinucléotide). Les trois réactions suivantes correspondent à une hydratation, une oxydation liée au NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et une réaction de thiolyse par le groupe thiol d'une molécule de coenzyme A. Cette dernière réaction, catalysée par la β -cétothiolase, libère une molécule d'acétyl-CoA et un acyl-CoA amputé de 2 atomes de carbone. À chaque cycle, la chaîne est ainsi réduite de 2 carbones produisant de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs ainsi que 2 coenzymes réduits : NADH et FADH₂ (Houten et Wanders, 2010).

b- Le cycle de Krebs :

Le cycle de Krebs aussi appelé cycle de l'acide citrique fait intervenir des enzymes attachées à la membrane interne de la mitochondrie, et d'autres dans la matrice mitochondriale. À la fin des huit étapes du cycle, pour chaque molécule d'acétyl CoA, 3 molécules de NADH, une de FADH₂, et une molécule d'ATP sont produites, et il y a production de deux molécules de dioxyde de carbone. L'énergie contenue dans les transporteurs d'électron NADH et FADH₂ ne sera libérée qu'à l'étape suivante par la chaîne de transport des électrons (Lanza et Nair, 2010).

c- La phosphorylation oxydative :

La chaîne de transport des électrons consiste en une série de transporteurs d'électrons associés à des protéines qui sont imbriquées de part et d'autre de la membrane interne des mitochondries. Ces transporteurs sont positionnés en série dans la membrane en ordre croissant d'affinité pour les électrons (Albert et al., 2002).

Les électrons, passant d'un transporteur à l'autre, relâchent de l'énergie qui est harnachée pour produire de l'ATP. Ce processus de production de l'ATP à partir du transport des électrons est appelé la phosphorylation oxydative. Les complexes de la chaîne respiratoire sont spécialisés dans les réactions d'oxydo-réduction permettant le transport des électrons issus de l'oxydation du NADH et du succinate (générés par le cycle de Krebs) vers l'oxygène moléculaire. En effet, le NADH est oxydé au niveau du complexe I et le succinate au niveau du complexe II permettant le transfert d'électrons vers une molécule liposoluble et mobile, l'ubiquinone. Le complexe III assure ensuite le transfert des électrons de l'ubiquinol (forme réduite de l'ubiquinone) vers le cytochrome c qui, une fois réduit, transporte les électrons jusqu'au complexe IV où ils sont transférés à l'oxygène moléculaire. Le transfert d'électrons au niveau du complexe I, II et III est accompagné d'une expulsion de protons vers l'espace inter-membranaire ce qui crée un potentiel membranaire électrochimique et par la suite un gradient de pH à travers la membrane interne mitochondriale et provoque l'acidification de l'espace inter-membranaire. Le retour des protons vers la matrice active l'ATP synthase ou complexe V qui catalyse la synthèse de l'ATP étape ainsi nommée la phosphorylation oxydative (figure 02) (Lodish et al., 2005).

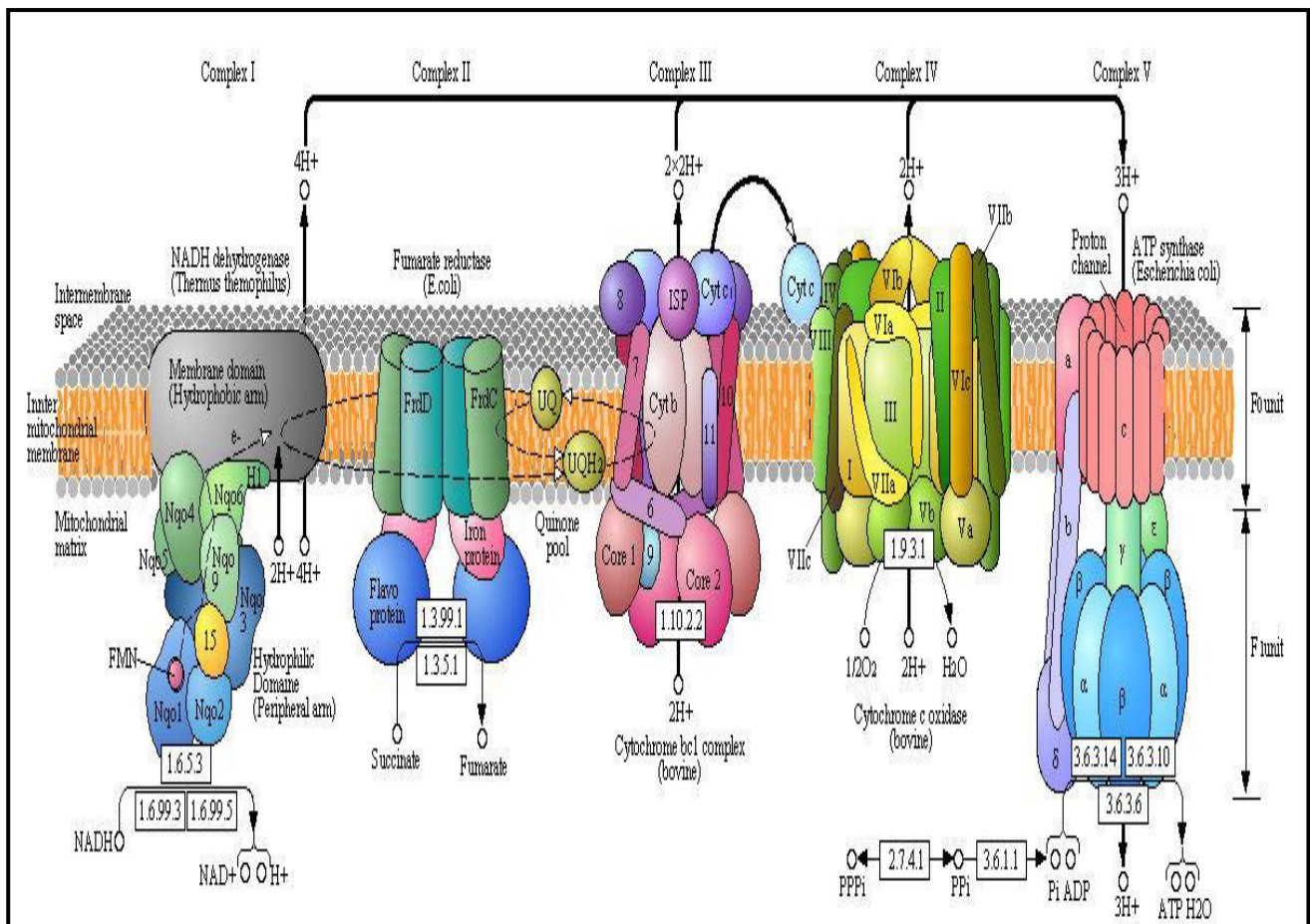


Figure 02 : Organisation de la chaîne de transport des électrons (Gabaldon et Huynen, 2005).

3-2- L'apoptose

La mitochondrie est impliquée dans les mécanismes induisant l'apoptose ; elle en est l'effecteur indispensable par le biais de la libération de nombreux facteurs pro-apoptotiques localisés dans l'espace inter-membranaire. L'apoptose peut être déclenchée par des signaux qui suivent deux voies, extrinsèque et intrinsèque, qui diffèrent par leurs étapes précoces mais ils convergent pour activer une famille d'enzymes protéolytiques, ou caspases (Gilleron, 2014).

3-3- Homéostasie calcique :

La mitochondrie intervient dans la régulation de la concentration cytoplasmique de calcium. Le pool cytoplasmique de Ca^{2+} est très limité et sa concentration est généralement maintenue entre 0,05 et 0,5 μM . La mitochondrie est capable de réagir très rapidement à des variations de concentration cytoplasmique liées soit à des échanges au travers de la membrane plasmique soit à un relargage du réticulum endoplasmique, lequel est situé à proximité des mitochondries dans la plupart des cellules. Le seuil maximal d'accumulation mitochondriale en calcium est d'environ 0,5 μM dans la plupart des cellules. Pour répondre rapidement aux variations de concentration calcique, il existe des transporteurs sur les membranes externe et interne mitochondriales. Au niveau de la membrane externe, le canal anionique voltage dépendant permet de réguler l'entrée de l'ion calcique dans l'espace inter-membranaire. Il existe plusieurs transporteurs calciques dans la membrane interne mitochondriale : des échangeurs calcium contre Na^+ et/ou H^+ qui servent pour l'efflux calcique et l'uniporteur calcique qui a été récemment identifié (Glancy et Balaban, 2012).

3-4- Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène est indispensable à la production d'énergie par de nombreuses formes de vie. Cette production se fait notamment par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons. Lors du métabolisme normal, la réduction tétravalente de l'oxygène en eau se fait en plusieurs étapes successives qui donnent naissance à des intermédiaires potentiellement réduits, appelés ERO, car ces entités radicalaires et moléculaires sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance. La dégradation de ces radicaux est contrôlée par des systèmes de défense, les antioxydants, qui s'adaptent au taux de radicaux présents. Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production d'ERO et les capacités cellulaires anti-oxydantes. Les ERO ont longtemps été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme normal de l'oxygène et impliquées dans de nombreuses pathologies. Cependant, depuis plusieurs années, la production contrôlée de radicaux apparaît comme un mécanisme essentiel de la signalisation cellulaire qui participe au maintien de l'homéostasie de la cellule (Turrensetal., 2003).

4- Génétique mitochondriale :

4-1- Organisation du génome mitochondrial :

Les mitochondries possèdent leur propre génome ou ADNmt et sont capables de la réplication et de la transcription de cet ADN d'une manière semi-autonome. L'ADNmt chez l'homme est circulaire, double brin, d'environ 16 569 pb et présent en 10^3 à 10^4 copies dans les cellules humaines et représente environ 1 % de l'ADN cellulaire total. Il code pour 2 ARNr (12S et 16S), 22 ARNt et 13 parmi les 90 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Les deux brins de l'ADNmt diffèrent par leur contenu en G+T avec un brin lourd (H: Heavy strand) et un brin léger (L: Light strand). L'ADNmt est dépourvu d'introns et la seule région non-codante, la D-loop (Displacement-loop), contient les éléments qui contrôlent sa réplication et sa transcription. En effet, la D-loop (1121 bp) est une région régulatrice contenant les promoteurs bidirectionnels, HSP et LSP (Heavy and Light Strand Promoter), pour la transcription respective du brin lourd et du brin léger ainsi que le point d'origine (OH) de la synthèse du brin lourd par où commence la réplication de l'ADNmt. Une autre séquence de régulation, de 30 pb, contient l'origine de réplication du brin léger (figure 03) (Anderson *et al.*, 1981 ; Andrews *et al.*, 1999).

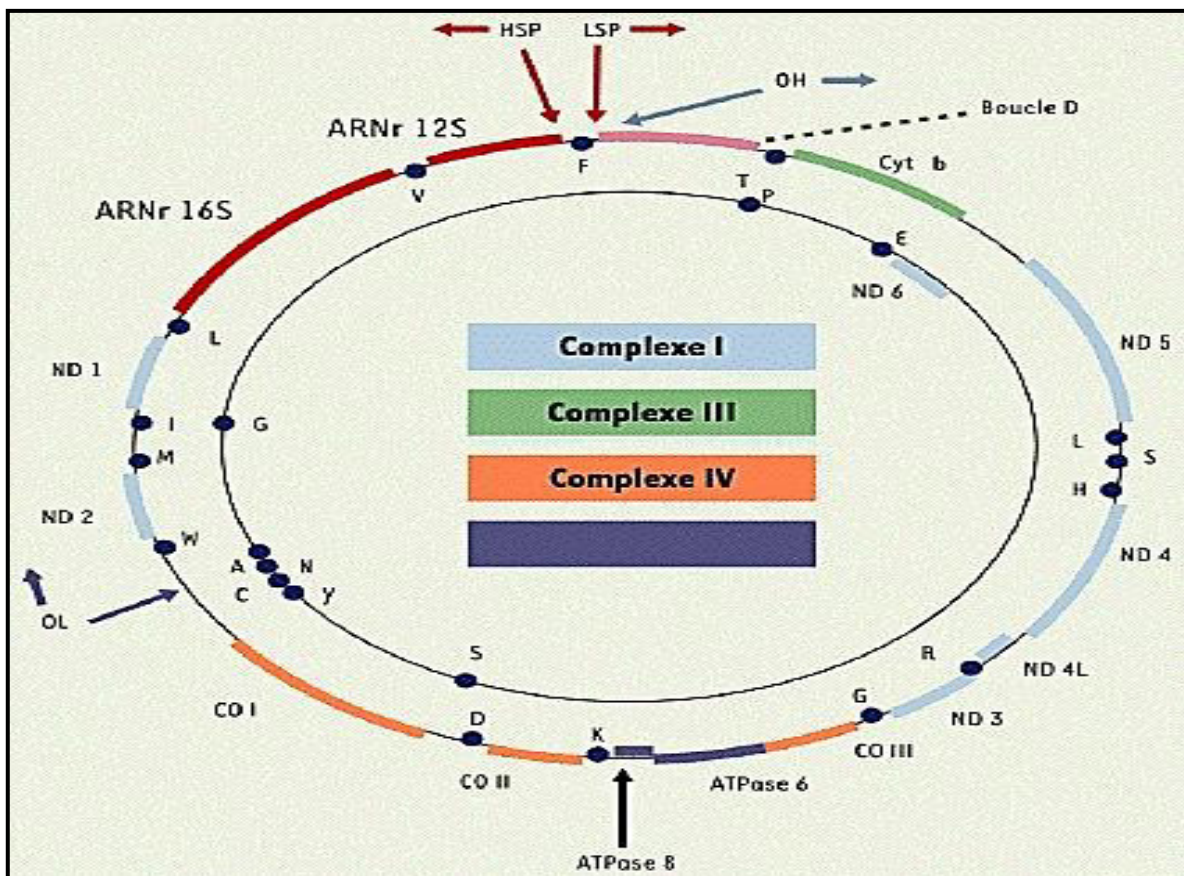


Figure 03 :Organisation du génome mitochondrial humain(May-Panloup *et al.*, 2004).

4-2- Réplication de l'ADN mitochondrial :

Les deux brins H et L de l'ADN mitochondrial sont répliqués de manière asynchrone et asymétrique à partir de deux origines de réplication distinctes OH et OL. La réplication fait intervenir une ADN polymérase gamma spécifique de la mitochondrie, la première étape est la production d'une amorce ARN par transcription du brin léger, l'amorce ribonucléotidique forme un hybride ARN/ADN stable, appelé R-Loop (au niveau des régions CSB (Conserved Sequence Box) localisées dans la D-Loop). L'amorce ARN est clivée par la RNase MRP (Mitochondrial RNA Processing). L'ADN polymérase gamma prend alors le relais pour synthétiser le néo-brin H. L'élongation du brin H néo-synthétisé crée une boucle de déplacement au niveau de laquelle le brin lourd est sous forme simple brin. Lorsque cette boucle arrive au niveau de l'origine de réplication OL, celle-ci adopte une conformation en épingle à cheveux reconnue par une ADN primase qui synthétise une amorce ARN. La boucle est riche en nucléotides T et la transition ARN/ADN se fait au niveau d'une séquence riche en GC à la base de l'épingle. Les structures d'ADN simple brin générées lors de la réplication sont stabilisées par la protéine mtSSB (mitochondrial Single Strand Binding Protein) qui fixe l'ADN sous forme d'un tétramère (Lescuyer, 2002 ; Thevès, 2006). Un autre modèle de réplication synchrone et symétrique a été récemment proposé. Ce mécanisme serait comparable à celui de l'ADN nucléaire avec une fourche de réplication bidirectionnelle et une synthèse discontinue du brin L par fragments d'Okasaki successifs. Les deux modes de réplication, synchrone et asynchrone, coexisteraient dans la cellule et l'utilisation de l'un ou l'autre pourrait dépendre des conditions physiologiques (Lescuyer, 2002 ; Thevès, 2006).

4-3- Expression des gènes mitochondriaux :

La transcription de l'ADN mt humain débute au niveau de la région non codante qui contient les promoteurs HSP et LSP et est réalisée par la polymérase MTRPOL (Mitochondrial RNA POLYmerase). Si la polymérase reconnaît spécifiquement les promoteurs HSP et LSP, l'initiation de la transcription ne peut se faire qu'en présence de facteurs de la transcription TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A) et TFBM (Mitochondrial Transcription Factor B). La maturation de ces différents ARN repose sur le clivage des ARNt, les ARN messagers (ARNm) sont ensuite polyadénylés en 3' et les ARNt subissent des modifications post-transcriptionnelles sur certaines de leurs bases. La traduction mitochondriale ressemble à celle des procaryotes. Elle utilise un code génétique différent du code génétique universel. Elle n'utilise que 22 ARNt contre 30 pour la traduction cytoplasmique. Les deux codons stop sont AGA et AGG au lieu de UGA, UAA

etUAG. UGAcode par contre pour le tryptophane. AUA code pour la méthionine et non pourl'isoleucine(**Thevès, 2006**).

La machinerie traductionnelle mitochondriale comprend des facteurs d'initiation,d'élongation et de terminaison de la traduction, des protéines mitochondriales ribosomales,des synthétases aminoacyl-tRNA synthétases et une methionyl-tRNA transformylase. Le protéome mitochondrial humain comporte environ 1 500 protéines dont la plupartsont codées par le génome nucléaire. Comme nous l'avons vu précédemment, l'ADNmitochondrial code seulement pour 13 protéines. Elles appartiennent aux complexes I, III, IVet V. Il s'agit des sous-unités ND1 à ND6 et ND4L du complexe I, du cytochrome b ducomplexe III, des sous-unités COX I à III du complexe IV et des sous-unités ATP 6 et 8 ducomplexe V(**Steffann, 2006**).

La biogénèse mitochondriale nécessite donc la coordination de l'expression des deuxgénomes, nucléaire et mitochondrial, ainsi qu'un système efficace d'importation etd'assemblage des protéines. Parmi les protéinesmitochondriales codées par l'ADN nucléaire, se trouvent de nombreux enzymes et facteursimpliqués dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN nucléaire, des sous-unitésde tous les complexes de la chaîne respiratoire, des facteurs d'assemblage et desprotéines chaperonnes(**Lescuyer, 2002 ; Thevès, 2006**).

5- Particularités génétiques :

5-1- Transmission maternelle :

La transmission maternelle non mendélienne de l'ADNmt est une des particularités dela génétique mitochondriale. En effet, il existe des mécanismes dereconnaissance et de destruction des mitochondries paternelles suite à des processusd'ubiquitinylation démarrés au cours de la spermatogénèse. La destruction de l'ADNmt paternel est effectuée par le protéasome ovarien au plus tard lors de la troisièmedivision embryonnaire. De plus le nombre de copies d'ADNmt dans lespermatozoïde varie de 10 à 100 contre 50000 à 400000 dans l'ovule(**May-Panloupetal., 2004**).

5-2- Hétéroplasmie, effet de seuil :

L'hétéroplasmie correspond à la coexistence dans une même cellule de deux espèces d'ADN mitochondrial. Cette notion est notamment importante en cas de présence d'une mutation pathologique car en fonction du pourcentage d'ADN muté, l'impact sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la capacité à produire de l'ATP sera variable(**Lescuyer, 2002**).

L'effet de seuil correspond au pourcentage d'ADN muté à partir duquel un tissu ou un organe ne peut plus assurer la production d'énergie minimale permettant de maintenir ses fonctions normales. L'expression phénotypique d'une mutation pathologique de l'ADN mitochondrial, au niveau d'un

tissu ou d'un organe donné dépendra donc d'une part, de ses besoins énergétiques, et d'autre part, du rapport ADN normal/ADN muté(Thevès, 2006).

5-3- Ségrégation mitotique :

Au cours des mitoses, les mitochondries ne se répartissent pas de manière homogène dans les cellules filles. Ainsi, à partir d'une cellule présentant 2 types de populations mitochondriales, des cellules filles avec des taux variables de chacune des 2 populations peuvent être obtenues. Ce phénomène appelé ségrégation mitotique explique qu'à partir d'un ovule contenant une proportion donnée d'ADNmt normaux et mutés, un individu peut avoir des rapports ADN normal/ADN muté très variables dans ses différents tissus et organes. Associé à l'effet de seuil, ce phénomène explique la grande hétérogénéité de l'expression clinique des maladies liées à l'ADNmt(Di Mauro, 2004).

5-4- Taux de mutation plus élevé que les gènes nucléaires :

Le génome mitochondrial présente un taux de mutations en moyenne 10 fois plus élevé que celui du génome nucléaire, plusieurs éléments peuvent expliquer cette caractéristique. En effet, avec un système de réparation de l'ADN moins efficace que dans le noyau et l'absence de protection par des protéines de type histone ainsi que la proximité de la chaîne respiratoire qui génère des quantités importantes d'EROs ; tous ces éléments exposent le génome mitochondrial à des dommages oxydatifs(Lescuyer, 2002 ; Thevès, 2006).

6- Les maladies mitochondriales

6-1- Définition :

Les maladies mitochondriales, quelle que puisse être leur cause, génétique ou non, englobent un ensemble de pathologies disparates en rapport avec des dysfonctionnements de la mitochondrie qui se traduisent par un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale et une production insuffisante d'ATP. Ce sont des pathologies génétiques qui touchent 2,5 personnes sur 10000, ce qui les classe au premier rang des maladies métaboliques. Les mitochondries étant présentes dans toutes les cellules de l'organisme, une atteinte de la chaîne respiratoire peut s'exprimer de manière multi-systémique. Ainsi, un déficit de la chaîne respiratoire peut toucher tous les tissus et les organes et entraîner un spectre très variable de symptômes ; les organes les plus touchés étant ceux qui ont une forte demande énergétique comme le cerveau, les muscles squelettiques, le cœur ou le foie. Les symptômes engendrés peuvent s'aggraver dans les situations d'hyper-catabolisme et de besoins énergétiques accrus. L'expression clinique de ces pathologies est très hétérogène et très

variable en raison du caractère ubiquitaire de la chaîne respiratoire (Rötig et Munnich, 2003 ; DiMauro et Schon, 2003).

On observe une multitude de symptômes, les plus fréquents étant : une encéphalopathie, une cardiomyopathie, une myopathie, une atrophie optique, un retard mental, une épilepsie, un diabète, une surdité, une cécité, une insuffisance hépatique. Les mitochondriopathies peuvent se manifester à tout âge, allant de formes létales en période néonatale jusqu'à des formes modérées chez l'adulte(figure 04)(Alonso, 2016).

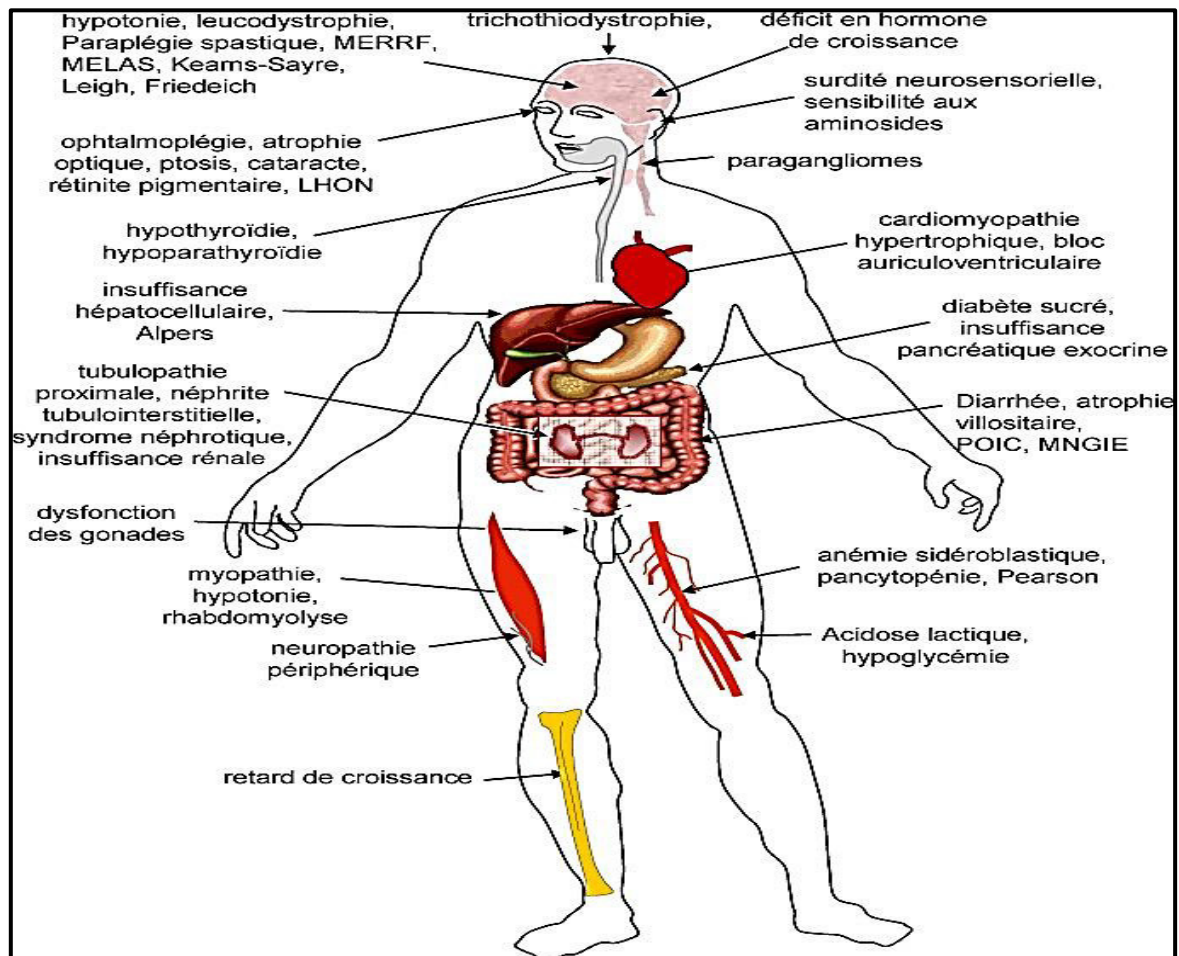


Figure 04 :Atteintes multi-viscérales des maladies mitochondriales(Loubliera et al., 2009).

6-2- Classification :

a- Maladies liées à des mutations dans l'ADNmt :

Les anomalies de l'ADNmt sont à l'origine d'environ 20% des maladies mitochondriales. Bien qu'il code pour un petit nombre de gènes, les mutations de cet ADN sont fréquentes. Ces anomalies de l'ADNmt sont dans la plupart des cas hétéroplasmiques et sont transmises selon un mode maternel mais peuvent être *de novo*. Les principales altérations de l'ADNmt responsables de

maladies mitochondriales correspondent à des délétions uniques ou à des mutations ponctuelles (Mao et Holt, 2009).

Des anomalies qualitatives : délétions multiples de l'ADNmt, ou quantitatives : dues à une diminution du nombre de copie de l'ADNmt, appelées déplétions, peuvent exister et sont le plus souvent liées à des mutations dans des gènes nucléaires impliqués dans le maintien de l'ADNmt (DiMauro, 2004 ; Loubliera *et al.*, 2009).

➤ **Délétions de l'ADNmt** : les délétions uniques de l'ADNmt sont de grands réarrangements qui entraînent la perte d'une partie de l'ADNmt et de l'information génétique qu'il contient. La taille du fragment délété varie de 1 à 10 kb et se situe le plus souvent entre les deux origines de réplication de l'ADNmt (OH et OL), impliquant des gènes codant des sous-unités de la chaîne respiratoire et des ARNt mitochondriaux. Les bornes de la délétion correspondent dans 85 % des cas à des séquences répétées. Contrairement aux délétions multiples, les délétions uniques sont généralement sporadiques et apparaissent de façon accidentelle dans la lignée germinale suite à des erreurs de réparation ou de réplication du génome mitochondrial. Elles sont toujours hétéroplasmiques. Les mères atteintes transmettent rarement ce type d'anomalie et la récurrence dans les fratries est faible. Les délétions uniques entraînent un spectre de symptômes cliniques qui regroupe essentiellement trois pathologies : le syndrome de Kearns-Sayre, le syndrome de Pearson et l'ophtalmoplégie externe progressive avec parfois des atteintes chevauchantes (DiMauro et Schon, 2001).

Mutations ponctuelles de l'ADNmt : on peut diviser cette catégorie en deux groupes : les pathologies liées à des mutations dans des gènes de structure (codant pour les ARNt et plus rarement pour les ARNr mitochondriaux) et celles liées à des mutations dans les gènes codant pour les 13 sous-unités de la chaîne respiratoire. Aujourd'hui des mutations pathogènes sont identifiées dans plus de 30 gènes sur les 37 gènes mitochondriaux. Les mutations ponctuelles de l'ADNmt sont parfois associées à des syndromes caractéristiques dont les atteintes dépendent du taux d'hétéroplasmie dans un tissu donné. Le phénotype clinique s'exprime généralement à partir de 80% de molécules mutantes. Certaines de ces mutations sont récurrentes et correspondent à des tableaux cliniques spécifiques. Elles constituent de véritables "hot-spots" mutationnels et sont souvent recherchées en première intention quand on suspecte une pathologie mitochondriale. Par exemple, les syndromes MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) et MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers) sont respectivement dus à des mutations qui touchent les ARNt^{leu} (m.3243A>G) et ARNt^{lys} (m.8344A>G) mitochondriaux. L'atrophie optique de Leber est due à des mutations

CHAPITRE II

PHYSIO-PATHOLOGIE DU DIABÈTE

1- Définition :

Le diabète est défini comme étant un trouble glucidique lié à un déficit d'insuline, et à une résistance anormale des tissus à cette hormone. Il en résulte une concentration exagérée de glucose dans le sang. Des troubles du métabolisme protidique et surtout lipidique y sont souvent associés. La nomenclature internationale actuelle distingue le diabète de type I, et le diabète de type II. À ces deux formes majeures, il convient d'associer le diabète gestationnel beaucoup moins fréquent, ainsi qu'une catégorie regroupant tous les autres cas qui ne peuvent être classés ni dans le type I, ni dans le type II (**Grimaldi, 2009**). Le diabète sucré est une affection qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou que l'organisme ne peut utiliser de manière efficace l'insuline qui est produite. Il se reconnaît par une élévation chronique de la glycémie qui s'accompagne par une polydipsie, polyurie, asthénie, polyphagie, amaigrissement ou obésité, et des troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel (**Raccah, 2004 ; Calop et al., 2008**). C'est un groupe de maladies métaboliques, d'étiologie diverse, caractérisées par une hyperglycémie chronique, accompagnées d'une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique, résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées. Cette hyperglycémie chronique est associée, à des degrés divers, à des complications à long terme, touchant en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (**OMS, 1999 ; Rodier, 2001 ; ADA, 2008**). Le diabète sucré se définit aussi par une hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l (7 mmol/l) ou une glycémie supérieure à 2 g/l (11,1 mmol/l) à n'importe quel moment ou lors d'une hyperglycémie provoquée par voie orale à deux reprises. Cette définition est fondée sur le seuil glycémique à risque de micro-angiopathie, en particulier à risque de rétinopathie (**ADA, 2007 ; 2008**).

2- Épidémiologie :

Le diabète est un problème de santé majeur présent partout dans le monde. Les études épidémiologiques ont montré qu'il frappe indistinctement toutes les populations et tous les groupes d'âge. À l'échelle mondiale, le nombre de diabétiques est en augmentation spectaculaire ces dernières années. En 2011, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a enregistré 356 millions diabétiques de par le monde (**OMS, 2011**). De même, en 2010, la Fédération Internationale du Diabète (FID) a enregistré un million 632 milles diabétiques en Algérie. Ce chiffre peut atteindre jusqu'à 2 millions 850 milles en 2030, avec une augmentation de 61 milles nouveaux cas recensés par an. La prévalence mondiale, déclarée par FID, était de 8,5 % et la prévalence nationale était de 7,4 %. Elle peut augmenter à plus 9,3 % en 2030 (**Whiting, 2011**).

Il est intéressant de noter que la fréquence du diabète de type II est très variable d'un pays à l'autre (1% au Japon contre 6 % aux USA), en France elle est évaluée à environ 2 % de la population. Elle dépend donc de l'origine ethnique (35 % pour les indiens Pimas aux USA) et de l'environnement (habitudes alimentaires) : les obèses de plus de 40 ans ayant des antécédents diabétiques dans leur famille, n'ont que peu de chances d'échapper au diabète de type II. L'OMS a estimé à plus de 200 millions de personnes la population atteinte de diabète de type II à travers le monde (**De Menthière, 1999**).

3- Classification et physio-pathologie :

3-1- Le diabète de type I :

Le diabète de type I est observé le plus souvent chez le sujet jeune. Il apparaît soudainement, généralement avant l'âge de 15 ans. Il provient d'une destruction des cellules bêta des îlots pancréatiques, productrices de l'insuline. Ce diabète est appelé insulino-dépendant car l'administration d'insuline est le seul moyen de survivre à cette pathologie (**Grimaldi, 2009**).

Pour la plupart des chercheurs, cette destruction serait d'origine auto-immune, apparaissant à la suite d'une infection sur un terrain génétique favorable. En effet, il a été observé que les cas de DT1 augmentent de manière très significative après les épidémies virales. Les virus impliqués seraient ceux des oreillons, de la rougeole et de la poliomyélite. Dans les affections auto-immunes, le système immunitaire qui normalement protège l'individu en éliminant tout ce qui est du non soi, se retourne contre l'organisme lui-même ne reconnaissant plus certaines de ses composantes comme appartenant au soi. Ceci entraîne l'intervention de lymphocytes et d'auto-anticorps qui détruisent les cellules non tolérées. Dans le cas du DT1, un corps étranger que l'organisme a reconnu comme ennemi, peut posséder sur son enveloppe des protéines semblables à des protéines membranaires présentes à la surface des cellules bêta. Dans ces conditions, le système immunitaire élimine à la fois l'envahisseur et les cellules alors reconnues comme étant infectées. Une autre possibilité est que l'infection virale modifie la structure des auto-antigènes portés par les cellules pancréatiques : ces dernières n'étant plus reconnues sont tuées (**De Menthière, 1999 ; Boyer, 2016**).

Le diabète de type I ne présente pas de difficulté majeure en ce qui concerne son diagnostic, qui se pose sur un tableau clinique sévère et évocateur : des anomalies biologiques hautement spécifiques, comme une glycémie très élevée, la présence de corps cétoniques dans les urines sont révélateurs d'un diabète de type I (**figure 06**). Les personnes atteintes de DT1 doivent s'administrer quotidiennement une ou plusieurs injections sous-cutanées d'insuline afin de contenir l'acidocétose et l'hyperglycémie (**ADA, 2007 ; 2008 ; Grimaldi, 2009**).

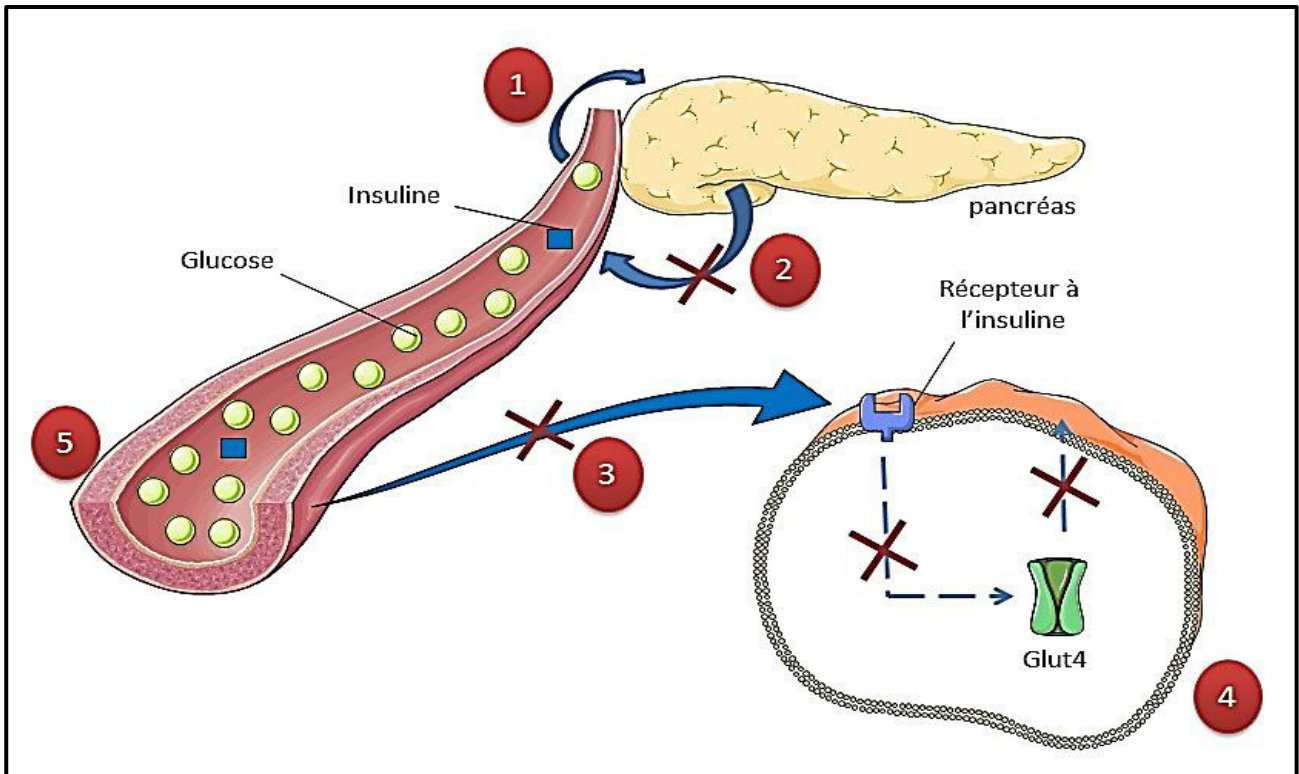


Figure 06 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète type 1 (Boyer, 2016).

1) La présence de glucose va stimuler les cellules du pancréas pour libérer de l'insuline. 2) Les cellules β du pancréas ne produisent pas ou très peu d'insuline. 3) et 4) Défaut de transduction du signal induit par l'insuline et défaut de la translocation du transporteur de glucose (GLUT4) ce qui conduit à un défaut de la captation du glucose par les cellules musculaire lisses, les adipocytes ou le foie. 5) Hyperglycémie résultant d'une accumulation de glucose dans le sang.

3-2- Le diabète de type II :

Le diabète de type II représente environ 90 % de la population diabétique et touche essentiellement des personnes de plus de 40 ans ; il est considéré comme une maladie de l'âge mur. Ce type de diabète est en fait divisé en deux sous-types : le IIa (non obèse, 15 % des diabètes de type II) et le IIb (obèse, poids > 120 % du poids idéal). Contrairement au DT1, les patients atteints de DT2 produisent de l'insuline mais en quantité insuffisante, rendant inadéquat la réponse compensatoire de l'hormone à des élévations du taux de glucose, et aboutissant ainsi à une hyperglycémie rapide (**figure 07**). À cette anomalie de l'insulino-sécrétion, est associée une insulino-résistance des tissus périphériques dont la capacité à utiliser le glucose est amoindrie. Il est à noter que l'hyperglycémie associée au diabète de type II, si elle n'est pas traitée, tend à en accentuer le déficit de sécrétion d'insuline (ADA, 2007 ; 2008 ; Grimaldi, 2009).

En effet, des taux élevés de glucose circulant sont toxiques (gluco-toxicité) et entraînent, à la fois, une diminution de la fonction sécrétrice des cellules bêta et une augmentation de la résistance à l'insuline (Boyer, 2016).

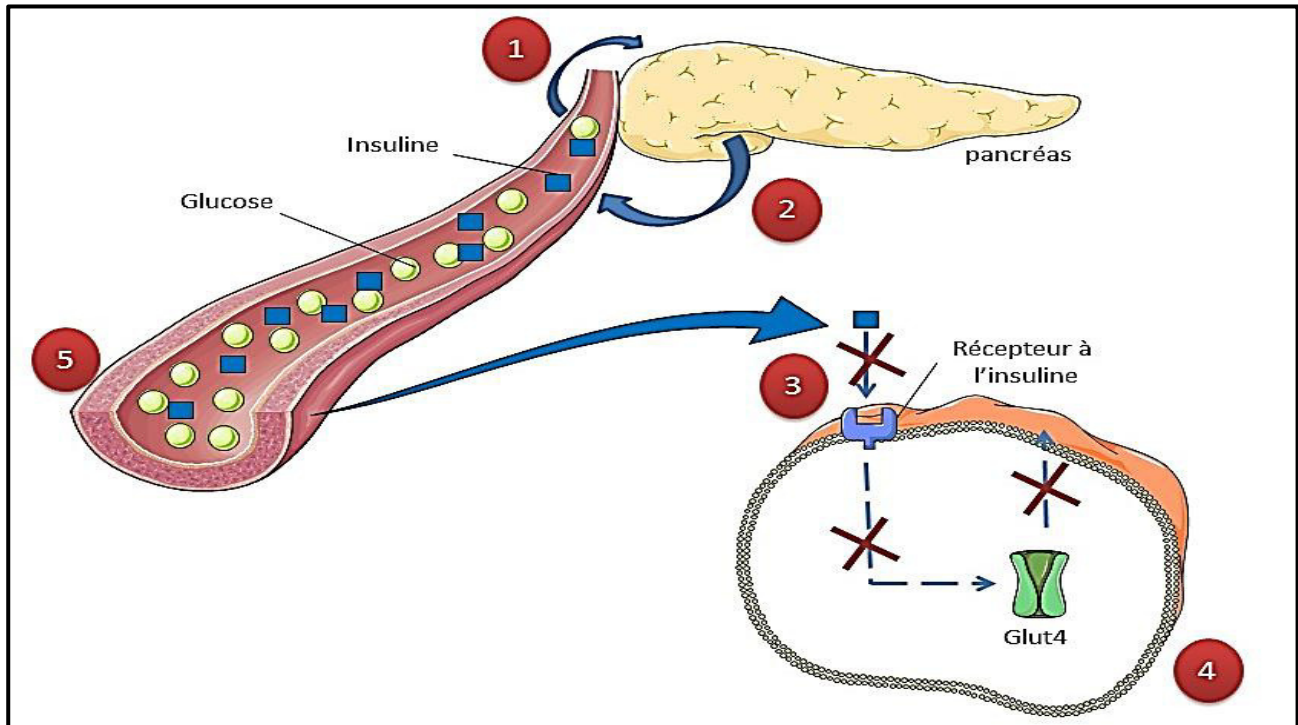


Figure 07 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète type 2 (Boyer, 2016).

1) La présence de glucose va stimuler les cellules du pancréas pour libérer de l'insuline.
 2) Production d'insuline par les cellules β -pancréatiques. 3) et 4) L'insuline ne fonctionne pas correctement et on a une défaillance de la transduction du signal induit par l'insuline et un défaut de la translocation du transporteur de glucose (GLUT4) ce qui conduit à une mauvaise captation du glucose par les cellules musculaire lisses, les adipocytes ou le foie. 5) Hyperglycémie résultant d'une accumulation de glucose dans le sang.

L'expression phénotypique du diabète de type II résulte d'une combinaison d'une prédisposition génétique et de facteurs environnementaux. Le mode de transmission serait polygénique dans une population importante et génétiquement hétérogène (monde occidental), et plus probablement mono-génique dans les isolats humains à très haut risque (indiens Pimas de l'Arizona ou habitants de certaines îles du Pacifique sud). L'hérédité est une composante importante dans l'apparition du DT2 : parmi une paire de jumeaux homozygotes, si l'un des jumeaux est atteint, le risque pour l'autre jumeau de développer la maladie est de 95 %. D'autre part, des analyses génétiques et le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis d'identifier de nombreuses mutations et polymorphismes dans des gènes candidats (De Menthière, 1999).

L'environnement aussi, peut conduire à des situations métaboliques que l'organisme ne peut plus contrôler. Ainsi, une alimentation riche en graisses animales et en sucre, pauvre en fibres, telle que nous la connaissons dans les pays développés, peut conduire à l'obésité reconnue depuis longtemps comme favorisant l'apparition du DT1. Comme tous les obèses ne sont pas diabétiques, il est probable qu'un facteur différent de celui de l'obésité soit nécessaire quant au développement de ce type de diabète (**Boyer, 2016**).

Le diabète de type II est le plus souvent asymptomatique. Il peut être présent depuis plus de 10 ans lors du diagnostic. Les symptômes apparaissent graduellement. On retiendra malgré tout qu'il est souvent associé à une hypertension (61 % des porteurs de diabète de type II non diagnostiqués), à une dyslipidémie et à une obésité androïde (abdominale). Le patient présentera des sensations de fatigue, de soif exacerbée, d'engourdissement et de picotement des pieds et des mains. Il sera confronté à des problèmes dermatologiques fréquents (sécheresse, démangeaisons et lésions) avec lenteur de cicatrisation ; il sera également sujet à une envie d'uriner fréquente particulièrement la nuit, à de nombreuses infections, et présentera des troubles de la vision (**ADA, 2007 ; 2008**).

Le diabète constitue un facteur de risque cardio-vasculaire et neurologique important. Selon l'OMS, le DT2 représente plus de 45 % des causes d'amputations non traumatiques, 13 % des cécités et de 13 à 30 % des insuffisances rénales au stade de la dialyse (**OMS, 2011**).

La thérapeutique utilisée consiste en l'administration d'hypoglycémifiants oraux, qui peuvent être regroupés en trois classes : les biguanides, les sulfonylurées et les inhibiteurs des alpha-glucosidases (**Grimaldi, 2009**).

3-3- Le diabète gestationnel :

Le diabète gestationnel est un diabète qui survient lors de la grossesse, généralement vers le 2^{ème} ou 3^{ème} trimestre. Il est parfois révélateur d'un diabète préexistant. Ce trouble peut provenir de l'inhibition exercée par les hormones produites par le placenta, dont l'Hormone Placentaire Lactogène (HPL), sur l'action de l'insuline et à l'origine d'une insulino-résistance. Il concerne 1 à 4 % des grossesses et peut évoluer vers un diabète de type 2 (**Buyschaert et al., 1998**).

4- Étiologie :

Les causes du DT1 sont mal connues. On ne connaît donc pas les raisons qui mènent l'organisme à fabriquer des anticorps. Il semblerait que la réaction auto-immune soit déclenchée par des facteurs environnementaux, infectieux, alimentaires ou psychologiques. Il existe également une prédisposition génétique mais elle est moindre que pour le diabète de type 2. Actuellement, il est impossible de prévenir ce type de diabète (**Grimaldi, 2009**).

Dans le cas du DT2, il n'y a pas une seule cause précise mais un ensemble de facteurs. Le facteur génétique est bien présent. Ainsi, 30 % des enfants dont un parent est atteint par un diabète de type II seront diabétiques à leur tour en vieillissant. Le mode de vie occupe une place importante dans la survenue de la maladie. Elle survient le plus souvent chez les sujets en surpoids, ne pratiquant aucune activité physique et ayant une alimentation déséquilibrée. Les personnes en surpoids ont cinq fois plus de risque d'être diabétique que celles de corpulence normale. Chez les obèses (surpoids extrême), ce risque est multiplié par dix. Il est à noter que certains médicaments (corticoïdes, certains neuroleptiques, immunosuppresseurs), des maladies inflammatoires du pancréas (alcool, calculs) et des dérèglements endocriniens peuvent aussi causer du diabète. On parle alors de diabète secondaire (Boyer, 2016 ; Grimaldi, 2009).

5- Symptomatologie clinique et biologique :

Le DT1 se manifeste par les signes majeurs suivants : soif, urines abondantes, amaigrissement massif, fatigue, hyperglycémie, glycosurie massive et cétonurie. Quant au diabète de type 2, il se manifeste par une hyperglycémie modérée et asymptomatique. Ce diabète se caractérise classiquement par une hyperglycémie, une polyphagie, un syndrome polyuro-polydypsique. La symptomatologie biologique repose sur la détermination de plusieurs paramètres :

- **La glycosurie :** hormis les rares états pour lesquels une glycosurie est présente malgré une glycémie normale, situation dite "de diabète rénal" (anomalie tubulaire rénale) ou durant la grossesse, la présence d'une glycosurie signe l'existence d'un diabète. En revanche l'absence de glycosurie n'exclut pas le diagnostic de diabète puisque le seuil de réabsorption du glucose peut être élevé. Néanmoins, cette méthode de dépistage, très peu sensible, reste très spécifique. Son utilisation en médecine générale et en médecine du travail (souvent à l'origine du diagnostic initial de diabète) à n'importe quel moment de la journée est susceptible d'accroître sensiblement le nombre des diagnostics. De plus, ce simple examen urinaire offre la possibilité d'une recherche d'acétonurie et de protéinurie, examens dont on sait combien ils sont utiles dans la gestion et le traitement du diabète de type II et ses complications.
- **La glycémie :** celle-ci peut être aujourd'hui déterminée par mesure sur sang total ou plasma au laboratoire ou par mesure capillaire sur sang total.
- **L'hémoglobine glycolysée ou glyquée (HbA1c) :** résultat de la réaction non enzymatique entre une protéine (l'hémoglobine) et le glucose dans le sang, elle reflète l'équilibre glycémique moyen de chaque individu durant les 8 à 12 semaines précédentes. Il existe donc des valeurs normales pour le sujet non diabétique et normo-tolérant au glucose et des valeurs pathologiques chez le diabétique avéré (Amadou, 2007).

6- Génétique des diabètes :

Le DT1 est 15 fois plus fréquent dans les familles comportant un sujet atteint (6 %) que dans la population générale (0,4 %). Sa transmission obéit à un modèle complexe, reflétant son caractère multigénique ; 4 gènes de susceptibilité au diabète de type 1 sont actuellement identifiés et une quinzaine de régions de susceptibilité ont été définies par tour de génome, demandant confirmation (**Concannon et al., 2009**).

- **Gènes HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe II** : la région des gènes HLA de classe II contribue pour 50 % au risque génétique de diabète type 1. Deux haplotypes sont associés au diabète de type 1 : DR3 (DRB1*03-DQB1*0201) et DR4 (DRB1*04-DQB1*0302), avec un risque maximal lorsque les deux sont présents. Chez les caucasiens, 80 à 95 % des patients portent l'un ou l'autre de ces haplotypes (contre 40 % dans la population générale). À l'inverse, l'haplotype DR15 (DRB1*15-DQB1*0602) exerce une protection dominante. La susceptibilité induite par certains allèles a été attribuée au rôle joué par les molécules HLA de classe II dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Les molécules diabétogènes seraient celles permettant l'activation lymphocytaire vis-à-vis d'autoantigènes insulaires.
- **VNTR (Variable Number Tandem Repeat) du gène de l'insuline** : le VNTR du gène de l'insuline contribue pour 10 % à la susceptibilité génétique au diabète de type 1. Situé dans la région promotrice du gène, il est composé d'un nombre variable de répétitions de base nucléotidiques en tandem, distinguant deux types d'allèles : courts (ou de classe I) et longs (ou de classe III). Les allèles de classe I ont été associés au diabète de type 1, avec un risque relatif de 3 à 5, les allèles de classe III conférant à l'inverse une protection dominante. La susceptibilité induite par le VNTR a été rapportée à son rôle régulateur dans l'expression du gène de l'insuline : les allèles de classe I, associés à une faible expression de l'insuline au niveau du thymus, favoriseraient la sélection et le passage en périphérie de lymphocytes T dirigés contre l'insuline.
- **Les gènes *CTLA4* (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) et *PTPN22* (Protein Tyrosin Phosphatase 22)** : contribuent respectivement pour 3 % et 1 % à la prédisposition génétique au diabète de type 1. Impliqués dans les phénomènes d'activation lymphocytaire, ils sont associés à une immunité plus diffuse (thyroïdites). Des polymorphismes des gènes du récepteur de la vitamine D, de l'interleukine 12 et du récepteur de l'interleukine 1 ont également été associés au diabète de type 1 (**Concannon et al., 2009 ; Amagara, 2010**).

- **Les formes non auto-Immunes du diabète ou diabète MODY** : cette forme particulière de diabète type 2 survient chez le sujet jeune et se transmet de façon mendélienne sur un mode autosomique dominant et qui se caractérise par une anomalie primitive de l'insulino-sécrétion. Plusieurs gènes sont responsables de cette forme : le gène *HNF4α* localisé sur le chromosome 20q (MODY1), le gène de la Gluco-Kinase (*GCK*) localisé sur le chromosome 7p (MODY2), le gène *HNF1α* localisé sur le chromosome 12q (MODY3), le gène *IPF1* (Insulin Promoter Factor 1) situé sur le chromosome 13q (MODY4) et le gène *TCF2* situé sur le chromosome 17q codant *HNF-1 β* (MODY5) (**Lacquemant, 2000**).

Le diabète de type II possède aussi une forte composante génétique. À titre d'exemple, le risque de développer le diabète de type II est augmenté à près de 30 % pour les personnes dont un des parents est diabétique et de 70 % si les deux parents sont atteints du diabète de type II. Il est très rare que la cause soit mono-génique, c'est-à-dire que son développement soit la conséquence d'un seul gène. Dans de tel cas, il est souvent référé au terme MODY puisqu'il se développe en bas âge et démontre des traits phénotypiques du diabète de type I ou II présents chez l'adulte. Toutefois, ces mutations expriment un phénotype différent du diabète de type II, car elles présentent généralement un défaut de sécrétion d'insuline, mais gardent une sensibilité à l'insuline normale. La composante génétique du diabète de type II serait plutôt polygénique, c'est-à-dire qu'elle nécessite la présence d'un ensemble de gènes. Toutefois, avec la prévalence élevée du diabète de type II, les gènes de susceptibilité seraient très nombreux, fréquents et avec un faible impact phénotypique. C'est pourquoi il est très difficile d'identifier précisément des gènes de susceptibilité dans la population (**Winter et al., 1999**).

À titre d'exemple, notons le variant Prol2Ala pour le gène *PPARG* impliqué dans la différenciation et la fonction des adipocytes de même que le variant Glu32Lys pour le gène *KCNJ11* codant pour un canal potassique ATP dépendant crucial pour la stimulation de la sécrétion de l'insuline par le glucose. Bien qu'ils ne soient pas suffisants pour induire le diabète de type II, ils sont tous deux des SNP (Single Nucleotides Polymorphisms) associés à l'augmentation du risque de développer le diabète de type II (**Cheyssac et al., 2006**). À l'opposé, certaines mutations ou certains ensembles de mutations peuvent avoir un effet protecteur. Par exemple, la tyrosine phosphatase-IB (*PTP1B*) inactive les récepteurs de l'insuline en catalysant la déphosphorylation de tyrosine phosphorylé. Une mutation diminuant l'activité de cette protéine aurait comme influence d'augmenter la sensibilité de l'insuline et par le fait même protéger contre le développement du diabète de type II (**Dedoussis et al., 2007**).

Néanmoins, lorsqu'on parle de la composante génétique, il est plus juste de parler de gènes ou d'un ensemble de gènes qui, en présence de facteurs de risque environnementaux tels l'obésité, l'inactivité physique et un régime riche en gras et en sucre, vont accentuer le risque de développer le diabète de type II. L'influence de l'environnement sur les facteurs génétiques est particulièrement bien illustrée par la variation de la prévalence du diabète de type II entre différents groupes ethniques. Les Indiens Pimas en sont un très bon exemple. C'est dans cette population que la prévalence du diabète de type II est la plus importante. Brièvement, ils ont connu une période de famine où seuls les individus possédant des gènes leur donnant la capacité de stocker l'énergie plus efficacement ont survécu. Toutefois, dans un environnement d'excès alimentaire, les Indiens Pimas sont plus susceptibles de devenir obèses et de développer le diabète de type II. C'est donc la balance entre des facteurs environnementaux ainsi qu'un ensemble de gènes de résistance et de prédisposition qui va déterminer le développement du diabète de type II (**Dedoussis et al., 2007**). Si le rôle des facteurs génétiques dans l'étiopathogénie du diabète est indéniable, le mode de transmission familiale de la maladie n'est pas toujours clairement défini comme c'est le cas pour MODY. En effet, les aspects de la pathologie sont très hétérogènes, même dans les formes simples du MODY, et il est probable que les altérations primaires du diabète de type II sont multiples, avec l'existence d'une multi-génicité et d'une hétérogénéité génétique. Ainsi, si l'hyperglycémie chronique suffit à définir ce type, ses caractéristiques cliniques sont considérablement hétérogènes d'une ethnie à l'autre, et au sein même d'une population donnée (**Dedoussis et al., 2007 ; Jafar-Mohammadi et McCarthy, 2008**).

En simulant plusieurs modèles de transmission génétique, seul le modèle polygénique pourrait correspondre aux observations épidémiologiques : un gène « majeur », responsable de la maladie dans une proportion importante de malades et/ou qui explique une part majeure de la variance de la glycémie et quelques oligo-gènes ou gènes « mineurs », ainsi que des facteurs non génétiques. Il serait donc nécessaire que plusieurs gènes soient mutés ou du moins présents conjointement sous certaines formes alléliques pour que les anomalies de la sécrétion ou de l'action de l'insuline apparaissent et conduisent, en des circonstances favorables, au diabète. D'ailleurs, chez les Mexicains Américains d'Arizona, population plutôt isolée et homogène. Ont pu localiser, au sein de quelques centaines de familles atteintes, un locus majeur du diabète type 2 sur le chromosome 2q (*NIDDM1*) qui n'expliquerait la variance phénotypique de la tolérance au glucose qu'à hauteur de 30 % dans cette population indiquant que d'autres diabéto-gènes, agissant seuls ou simultanément pour prédisposer au développement du diabète type 2, restent encore à mettre en évidence (**Jafar-Mohammadi et McCarthy, 2008**).

7- Implications physiopathologiques du métabolisme oxydatif : cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) forment une superfamille multigénique d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant aussi bien des xénobiotiques (médicaments, pesticides, toxiques et cancérigènes) que des substances endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras et vitamines). Chez l'homme, les cytochromes P450 sont présents dans presque tous les tissus, sauf le muscle, les os et les globules rouges. Les organes particulièrement riches en cytochromes P450 sont le foie et les glandes surrénales. Les réactions de bio-transformation des xénobiotiques catalysées par les CYP s'inscrivent dans un processus de détoxification évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme. Une des caractéristiques de ces enzymes est leur inductibilité, en particulier par certaines hormones, médicaments ou polluants chimiques. Paradoxalement ces enzymes peuvent parfois catalyser l'activation de certains composés et produire des métabolites toxiques, mutagènes voire cancérigènes. Chez l'homme, les formes quantitativement prépondérantes sont les CYP1, CYP2C et CYP3A. Ils constituent une superfamille de produits d'une centaine de gènes qui ont la possibilité de fonctionner en tant que peroxydases et réductases (**Ortiz de Montellano, 2004**).

Plusieurs études indiquent que certains CYP contribuent à la production d'EROs au cours du métabolisme de différents substrats. Il est possible que ces EROs participent à la pathogénie de certaines maladies. Le diabète sucré s'accompagne d'un stress oxydant et d'une production de radicaux libres par divers mécanismes. Ce stress oxydant se trouve impliqué dans l'aggravation de la maladie ainsi que dans l'apparition des complications chroniques. Le diabète est accompagné d'une augmentation de la production de radicaux libres responsables de l'oxydation des cellules et de leurs composés et de la perturbation du système de défense antioxydant. Les mitochondries jouent un rôle clef dans l'équilibre entre les antioxydants et les pro-oxydants. C'est durant la respiration qu'une partie de l'oxygène s'échappe de cette chaîne de réactions biochimiques pour former des radicaux libres. En excès, le glucose augmente la production de radicaux libres, car les mitochondries sont surchargées et leur système de contrôle est perturbé. Parallèlement, le stockage d'un excès de glucose sous forme de graisse est à l'origine de processus inflammatoires qui vont également augmenter la production d'EROs. En outre, l'organisme est constamment agressé par des sources supplémentaires de radicaux libres, comme le tabac et la pollution urbaine. Face à un excès de radicaux libres, l'équilibre est perturbé. Des situations physiologiques comme le jeûne ou une alimentation riche en glucides modifient l'expression des CYP. Par ailleurs, des situations pathologiques comme les hépatites et les cirrhoses la diminuent. Le diabète a un effet similaire à celui du jeûne, au moins chez l'animal, et il a été montré que les cytokines, elles aussi, réprimaient l'expression des principaux CYP (**Ortiz de Montellano, 2004 ; Robin, 2005**).

CHAPITRE III

DIABÈTES MITOCHONDRIAUX

1- Définition :

Certaines formes de diabète sucré sont secondaires à des mutations et à des délétions de l'ADNmt. Le MIDD, acronyme de Maternally Inherited Diabetes and Deafness, en est la forme la plus fréquente : un diabète de transmission maternelle avec surdité. Isolé en 1992, le MIDD est caractérisé par sa transmission maternelle et l'atteinte multi-organe associée : troubles de l'audition, altérations de l'épithélium pigmentaire rétinien, troubles neurologiques. Le MIDD co-ségrège avec une mutation ponctuelle A>G en position 3243 de l'ADNmt, qui code l'Acide Ribo-Nucléique (ARN) de transfert de la leucine [ARNt^{Leu} (UUR)], initialement trouvée dans le MELAS. D'autres mutations et des délétions de l'ADNmt ont été aussi rapportées en association avec un diabète (**Guillausseau et al., 2005**).

La fréquence du diabète mitochondrial par mutation 3243 est variable selon les populations étudiées. Sa prévalence semble néanmoins plus élevée chez les patients diabétiques d'Asie, surtout japonais (0,9 à 5,9 %) que chez les patients diabétiques caucasiens (0,13 à 0,42 %). Le MIDD est caractérisé par l'association d'un diabète de transmission maternelle, d'une surdité présente dans 90 % des cas et d'une dystrophie maculaire, présente, en France dans 86 % des cas. Il s'agit d'une anomalie maculaire non spécifique, caractérisée par la présence de dépôts pigmentés sous-rétiens, disposés en réseau dans la région maculaire et autour de la papille, associés à des altérations atrophiques de l'épithélium pigmentaire au niveau du pôle postérieur. L'acuité visuelle est le plus souvent normale. Mais dans certains cas plus sévères, cette dystrophie peut évoluer vers une atrophie maculaire et une perte de la vue. Chez les patients atteints de MIDD, la rétinopathie diabétique serait moins fréquente en présence de dystrophie maculaire que chez les patients diabétiques présentant un diabète de type 2 classique (**Massin et al., 2008**).

2- Physiopathologie du diabète mitochondrial :

Le MIDD se présente cliniquement selon deux phénotypes. Dans les deux conformations, il est remarquable par un Indice de Masse Corporelle (IMC) étrangement bas. Le MIDD1, dans 20 % des cas, a la présentation d'un diabète de type 1 d'emblée, avec une acidocétose inaugurale une fois sur deux, un âge de début précoce, 30 ans en moyenne, et un IMC très bas, inférieur à 18 kg/m². En parallèle, le MIDD2, de découverte par examen systématique dans une majorité de cas, emprunte le phénotype du diabète de type 2 dans sa forme habituelle. Il apparaît plus tardivement que le MIDD1, quelquefois après 40 ans, une IMC plus élevée, supérieure à 21 kg/m², est très souvent signalée. Comme le diabète de type 2, il évolue vers l'insulinodépendance en 10 ans en moyenne (**Guillausseau et al., 2005**).

Le traitement du MIDD2 repose sur le régime et les sulfonylurées, la metformine étant contre-indiquée en raison du risque théorique d'acidose lactique. Une fréquence identique d'antécédents maternels de diabète dans le MIDD1 (73 %) et le MIDD2 (71 %) semble écarter le rôle de l'exposition *in utero* à l'hyperglycémie dans la plus grande sévérité et la précocité de l'insulinopénie du MIDD1. Initialement incriminé pour expliquer l'hyperglycémie du MIDD, le métabolisme musculaire n'est en réalité pas sévèrement altéré et l'insulino-sensibilité est normale, en dehors de l'insulino-résistance induite par le déséquilibre glycémique. L'hyperglycémie est secondaire à un déficit primitif de l'insulino-sécrétion. La mutation A3243G est présente dans les cellules β des îlots de Langerhans dans tous les cas où elle a été cherchée. Une diminution des cellules α et β et de la masse insulaire, sans signe d'insulite ni d'apoptose, est observée. La recherche des stigmates d'une agression immunitaire vis-à-vis des cellules β est négative. Les anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale sont à l'origine des troubles de la glycorégulation. Elles modifient le rapport ATP/ADP (Adénosine Di-Phosphate). Elles sont ainsi susceptibles d'altérer la transduction du signal glucose au niveau de la glucokinase, avec pour conséquence une élévation du seuil de sensibilité au glucose, comme dans le MODY2. Le rapport ATP/ADP conditionne aussi la probabilité d'ouverture des canaux K^+ ATP, impliqués dans l'insulino-sécrétion. Le rôle central de l'ADNmt dans l'insulino-sécrétion est attesté par plusieurs travaux. Dans des cellules β dont l'ADNmt a été réduit par un agent mutagène, la réponse de l'insuline au glucose est abolie, alors que la réponse aux sulfonylurées qui ferment directement les canaux K^+ ATP est conservée. L'invalidation de l'ADNmt dans ces cellules abolit l'insulino-sécrétion en réponse au glucose. Chez la souris, l'invalidation spécifique dans les cellules β du gène TFAM, qui contrôle l'expression et la protection de l'ADNmt, entraîne un diabète insulino-prive. Le déficit de l'insulino-sécrétion est absent avant l'apparition d'un trouble de la glycorégulation chez les porteurs asymptomatiques de la mutation A3243G. Les troubles de la glycorégulation apparaissent entre 20 et 40 ans, et s'aggravent avec l'âge. Une augmentation du degré d'hétéroplasmie dans les cellules β pourrait être en cause (Suzuki et al., 2003 ; Guillausseau et al., 2005).

3- Diagnostic clinique et biologique :

Les diabètes mitochondriaux se présentent le plus souvent avec un tableau clinique d'expressivité variable. Néanmoins, un certain nombre de critères peuvent être en faveur de l'orientation vers ce choix de diagnostic :

- Le diabète peut survenir à n'importe quel âge mais en général atteint plus volontiers le sujet jeune (avant 40 ans).

- Le plus souvent, ce diabète est non insulino-dépendant. On ne retrouve pas d'anticorps anti-îlots de Langerhans, ni résistance à l'insuline. Mais, il semblerait que la sécrétion insulinoïque soit amoindrie.
- Une surdité accompagne ce diabète. Il s'agit d'une surdité neurosensorielle en rapport avec des lésions cochléaires. Elle est bilatérale et acquise.
- Une rétinopathie pigmentaire est assez fréquente. Elle atteint la macula et respecte la périphérie rétinienne. Paradoxalement, elle n'entraîne pas de baisse de l'acuité visuelle.
- D'autres signes peuvent accompagner ce diabète : fatigabilité, crampes à l'effort, parfois une cardiomyopathie (**Guillausseau et al., 2005**).

Devant un patient se présentant comme un diabète de type 2 (87 % des cas), ou plus rarement comme un diabète de type 1 (13 % des cas), certains éléments ont une valeur d'orientation positive pour la recherche d'une mutation de l'ADNmt (dans la majorité des cas la mutation 3243). Ce sont :

- L'absence d'obésité ($IMC < 30 \text{ kg/m}^2$) (sensibilité 100 %, spécificité 73,3 %).
- La dystrophie maculaire réticulée (sensibilité 86 %, spécificité 100 %).
- Un antécédent maternel de diabète (sensibilité 72,5 %, spécificité 71,4 %) (**Chen et al., 2000**).

La recherche de mutation est réalisée habituellement à partir des leucocytes du sang périphérique. La recherche de la mutation 3243 peut être négative en dépit d'un phénotype évocateur. En effet, le pourcentage d'ADNmt muté varie énormément d'un tissu à l'autre et les leucocytes sont parmi les types cellulaires les moins informatifs. En cas de forte suspicion clinique avec absence de la mutation 3243 dans le sang, il est conseillé de rechercher cette mutation à partir de cellules de la muqueuse buccale et de follicules pileux. Des protocoles de recherche sont en cours afin de rationaliser le choix des cellules optimales pour la recherche de la mutation (**Narbonne et al., 2004**).

En France, et en 2001, en accord avec la législation, un groupe multidisciplinaire pour l'étude génétique des personnes cliniquement indemnes, mais susceptibles d'être porteuses de mutations de l'ADN mitochondrial, a été constitué ; Équipe du GEDIAM (Groupe d'Étude des DIABètes Mitochondriaux). Les protocoles actuels du GEDIAM sont les suivants :

- Étude de la grossesse des femmes atteintes d'un MIDD ou simplement porteuses de la mutation 3243 de l'ADNmt
- Description de la myocardiopathie.
- Dépistage du diabète mitochondrial devant une dystrophie maculaire réticulée (**Massin et al., 1999 ; 2008**).

4- Aspect génétique :

Les mitochondries sont d'origine maternelle, d'où la transmission maternelle de la maladie, mais il existe des mutations *de novo*. Chez les patients atteints de MIDD, un antécédent maternel de diabète est trouvé dans 72 % des cas. Chez 109 porteurs néerlandais de la mutation A3243G, le trouble de la glycorégulation survient entre 20 et 40 ans, et pratiquement dans tous les cas avant 70 ans, ce qui implique une pénétrance complète de la maladie à cet âge. Plusieurs cytopathies mitochondriales et syndromes causés par des mutations ponctuelles, délétions ou duplications de l'ADNmt et caractérisés par une diminution de la phosphorylation oxydative sont associés à un diabète. Plus de 40 mutations ponctuelles de l'ADNmt ont été identifiées chez des sujets et au sein de familles montrant une transmission maternelle du diabète. La plus commune étant la mutation T3243A dans le gène codant un ARNt^{Leu} (UUR) (Guillausseau et al., 2005).

Cette mutation, a, cependant, la particularité d'être associée à deux phénotypes distincts : MIDD et MELAS ; syndrome associant myopathie mitochondriale, encéphalopathie, acidose lactique et accidents vasculaires, souvent accompagné de diabète et de surdité. Au contraire du MIDD, le MELAS a un pronostic défavorable par atteinte cérébrale ou cardiomyopathie. La dystrophie maculaire est commune au MIDD et au MELAS, et absente dans les diabètes liés à des mutations différentes ou à des délétions de l'ADNmt. L'hétéroplasmie est l'une des hypothèses avancées, les patients de phénotype MELAS ayant davantage de mitochondries mutées dans les cellules cérébrales. Des auteurs proposent d'expliquer la survenue d'un MELAS par la rupture de l'apport énergétique aux cellules cérébrales. L'atteinte cérébrale résulterait d'un déficit sévère en ATP lié aux anomalies de la phosphorylation oxydative. Une encéphalopathie aiguë a été observée après un jeûne glucidique de 1 à 3 jours chez huit des 14 MELAS de la série japonaise qui avaient initialement un phénotype MIDD. Même si cette hypothèse n'a pas reçu de confirmation, on peut (sans risque) chercher à prévenir ces accidents en informant les patients des risques potentiels du sevrage glucidique, en leur remettant une carte indiquant les précautions à observer, et en les perfusant avec du soluté glucosé en situation de jeûne (Massin et al., 2008). Les mécanismes sous-tendant ces expressions phénotypiques différentes sont encore inconnus, mais pourraient s'expliquer par un degré variable d'hétéroplasmie dans les tissus concernés. Les patients porteurs de la mutation A3243G présentent des caractéristiques cliniques variables sur le plan métabolique, allant d'une tolérance au glucose normale à un diabète insulino-requérant ; cependant, des anomalies de l'insulino-sécrétion sont retrouvées chez tous les sujets avec MIDD, même chez ceux présentant une tolérance au glucose normal (Chen et al., 2000 ; Narbonne et al., 2004).

Un diabète est inconstamment associé à des maladies liées à des délétions ou à diverses mutations de l'ADNmt, et qui comportent le plus souvent des anomalies neurologiques et/ou musculaires. Des délétions de l'ADNmt peuvent être associées à un phénotype voisin du MIDD, avec un diabète de transmission maternelle et une surdité. En revanche, l'atteinte rétinienne de ces formes est une rétinopathie " poivre et sel ", et non une dystrophie maculaire réticulée. Près de vingt mutations ponctuelles de l'ADNmt, co-ségrégant avec des phénotypes comportant un diabète sucré, ont été rapportées. Le diabète est fréquent ou au premier plan dans dix de ces formes, associé à une surdité dans huit d'entre elles : 3254 C>A (ARNt^{Leu}), 3256 C>T (ARNt^{Leu}) (phénotype de MELAS ou de MERRF), 3260 A > G (ARNt^{Leu}), 3264 T>C (ARNt^{Leu}), 3316 G>A, 3394 C>T (NADH déshydrogénase), 3398 T>C (NADH déshydrogénase), 8296 A > G (ARNt^{Lys}) et 14577 T>C (Chen et al., 2000 ; Narbonne et al., 2004).

Ailleurs, le diabète est au second plan, comme dans le MERRF par mutation ponctuelle 8344 A>G. Les mutations rapportées sont 3252 A>G (ARNt^{Leu}), 3271 T>C (ARNt^{Leu}) (myopathie, MELAS), 7472 insertC, 8356 T>C (ARNt^{Lys}) (surdité, MERRF), 12258 C>A (ARNt^{Ser}) (surdité, cataracte, ataxie), 14709 T > C (ARNt^{Glu}) (surdité, myopathie, encéphalopathie) et 16189 T>C. Le syndrome de Kearns-Sayre, lié à des délétions de l'ADNmt, est défini par la triade ophtalmoplégie chronique progressive, rétinite pigmentaire, début avant 20 ans, et l'un au moins des troubles suivants : troubles de la conduction cardiaque, hyper-protéïnorachie (> 1 g/l), anomalies cérébelleuses. Des déficits endocriniens (hypogonadisme, hypo-parathyroïdie, déficit somatotrope) et un diabète sucré (12 à 15 % des cas) peuvent être associés. Un diabète a aussi été inconstamment signalé dans le syndrome de Pearson, dû à des délétions de l'ADNmt, et qui associe anémie réfractaire sidéroblastique et insuffisance pancréatique externe (Suzuki et al., 2003).

5- Polymorphisme génétique : le gène *CYP1A1*

CYP1A1 est un membre de la famille des CYP1 et participe au métabolisme d'un grand nombre de xénobiotiques et de substrats endogènes. Les substrats endogènes comprennent les hormones estradiol 17 β , la mélatonine, les médiateurs de l'inflammation, l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque. Les substrats exogènes comprennent des substrats alimentaires et les carcinogènes environnementaux. Chez l'homme, *CYP1A1* est localisé sur le chromosome 15 (15q22-q24), Il contient 7 exons et 6 introns. Il s'étale sur 5 810 paires de base. Il est localisé à 25 kb du *CYP1A2*. Ce gène code pour une mono-oxygénase impliquée dans le métabolisme xénobiotique et dans celui du cholestérol, des stéroïdes et d'autres lipides. Cette protéine est localisée dans le réticulum endoplasmique. Son expression, à prédominance extra-hépatique, est induite par des hydrocarbures polycycliques aromatiques (Williams et al., 2000).

Les intermédiaires métaboliques des CYPs ont un potentiel carcinogène. Ce gène est sous le contrôle d'un facteur de transcription, dit le récepteur des hydrocarbures aromatiques AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor). Plusieurs polymorphismes répertoriés dans les banques de données. Ces derniers affectent l'inductibilité de *CYP1A1* par les hydrocarbures polycycliques (fumée, produits de combustion, dioxine). Quatre d'entre eux, les plus communs, sont très étudiés pour leurs implications en pathologie (**tableau I**) (Masson *et al.*, 2005).

Tableau I : Descriptif des polymorphismes communs du gène *CYP1A1* (Bartsch et Nair, 2000).

Désignation	Localisation	Point de la mutation	Changement protéine	Changement de restriction	Identification du SNP
CYP1A1*2 CYP1A1*2A M1	Région non codante en 3' en <u>aval</u> du site de poly-adénylation	Substitution de T en C : 3801T>C	Aucun	Apparition d'un nouveau site de restriction <i>MspI</i>	rs4646903
CYP1A1*2C M2	Exon 7 Codon 46	Substitution de A en G : 2455A>G	Ile462Val	Disparition d'un site de restriction <i>BsrDI</i>	rs1048943
CYP1A1*3 M3	Région non codante en 3' en <u>amont</u> du site de poly-adénylation	Substitution de T en C : 3205T>C	Aucun	Apparition d'un nouveau site de restriction <i>MspI</i>	---
CYP1A1*4 M4	Exon 7 codon 461	Substitution de C en A : 2453C>A	Thr461Asn	Disparition d'un site de restriction <i>BsaI</i>	rs1799814

De nombreuses publications associent le polymorphisme M1 du gène *CYP1A1* avec le risque de cancer. Ainsi, ce polymorphisme est impliqué dans les cancers du poumon, du sein, du pancréas, de l'appareil digestif mais également dans certaines leucémies. Ce polymorphisme pourrait également être associé aux maladies cardiovasculaires et métaboliques notamment au DNID. Dans la population générale européenne, la fréquence allèle de l'allèle rare C est de 11 % (Raza *et al.*, 2004).

Partie pratique

Patients et méthodes

I- Patients et témoins :

1- Patients :

Les personnes incluses dans notre étude sont des individus diagnostiqués avec un authentique diabète mitochondriale, recrutés au niveau du service de médecine interne du CHU Ben Badis Constantine et de l'association des diabétiques de Bâb-El-Kantara de la ville de Constantine. Tous ces individus, après lecture et explications, ont signé un consentement éclairé nous autorisant à l'utilisation de leurs données clinico-biologiques et de leur matériel génétique (ADN) dans la réalisation de cette étude (**annexe I**). Ces patients ont répondu également un questionnaire (**annexe I**) visant à recueillir les données cliniques et biologiques en rapport avec le dysfonctionnement étudié. Le recrutement des patients en vue de l'analyse génétique s'est étendu de Mars 2017 à Mai 2017. Dans cette étude, nous avons inclus 04 patients présentant le dysfonctionnement étudié. La confirmation du diabète mitochondrial s'est faite en concertation avec les médecins cliniciens des structures de santé mentionnées précédemment et ce en utilisant les critères du groupe GEDIAM. Le seul critère d'exclusion retenu dans notre étude est l'atteinte par un diabète de types 1 ou 2 sans la présence d'une transmission matrilinéaire de diabète.

2- Témoins :

Un total de 84 personnes en bonne santé apparente, après réalisation d'un questionnaire, ont été enrôlés comme témoins dans cette étude. L'analyse génétique de ces témoins a été faite dans le cadre d'études précédentes du diverses thématiques. Les données génétiques de ces témoins appartiennent au laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire du CHU Ben Badis

II- Étude moléculaire :

1- Extraction d'ADN à partir de sang total :

a- Le prélèvement sanguin : le prélèvement sanguin est recueilli, par des infirmiers, dans des conditions stériles, par ponction veineuse, dans un tube vacutainer contenant de l'EDTA (Ethylene Diamino Tetracetic Acid) comme anticoagulant, en quantité de 5 à 10 ml. L'EDTA est un chélateur de cations bivalents (Mg^{++} , Ca^{++}) nécessaires au fonctionnement des ADNase. Il est donc utilisé également comme inhibiteur indirect des nucléases. L'extraction de l'ADN est lancée immédiatement ou, si les conditions ne le permettent pas, dans les 3 à 5 jours qui suivent le prélèvement conservé à $+4^{\circ}C$.

b- L'extraction de l'ADN : les leucocytes représentent la source d'ADN la plus facilement exploitable. Plusieurs techniques d'extraction peuvent être utilisées (au chlorure de guanidine, au phénol-chloroforme). Celle employée dans le laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire du CHU Ben Badis est une approche qui se fait sur un prélèvement de sang total et en utilisant un solvant inorganique, le NaCl. L'extraction se fait en trois étapes : la préparation des leucocytes, l'extraction de l'ADN proprement dite et enfin la solubilisation.

- **Préparation des leucocytes :** les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique des érythrocytes dans un tampon Tris-EDTA (TE) 20:5 pendant 10 minutes dans la glace (**annexe II**). Après lavage, le culot est remis en suspension dans le TE 20:5.
- **Extraction de l'ADN :** se fait par ajout d'un tampon de lyse (**annexe II**), du Sodium Dodécyle Sulfate (SDS) à 10 % (détergent à action lytique sur les membranes cellulaires qui dénature les protéines et inhibe l'action des nucléases) et de la protéinase K à 10 milligramme (mg)/ millilitre (ml) (enzyme qui dénature et dégrade les protéines). Les tubes tournent sur une roue à 27°C une nuit et sont refroidis le lendemain dans la glace pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 1 ml de NaCl 4M pour permettre la libération de l'ADN nucléaire dans le lysat ainsi que la digestion et l'élimination des protéines qui lui sont associées par précipitation avec le NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol pur. Une fois la pelote d'ADN récupérée avec une pipette Pasteur[®], elle est rincée deux fois dans l'éthanol à 70 % et mise dans un tube Nunc[®] de 1,5 ml.
- **Solubilisation :** l'ADN ainsi obtenu est solubilisé en phase aqueuse en ajoutant 300 à 1000 microlitre (µl) d'eau Préparation Pour injectable (PPi) selon la grosseur de la pelote d'ADN formée. On laisse 2 à 3 jours sur agitateur-rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jour).

2- Détermination de la concentration, la pureté et de la qualité de l'ADN extrait :

La pureté ainsi que la concentration de l'ADN sont déterminées par spectrophotométrie à Ultra-Violet (UV) avec un Nanodrop[®], spectrophotomètre qui ne nécessite pas l'utilisation de cuvette. Un volume de 2 µl de l'échantillon est déposé directement à l'extrémité d'un câble de fibre optique. Lorsque celui-ci est mis en contact avec un second câble par fermeture de l'appareil, l'échantillon est maintenu par une tension de surface et traversé par un signal lumineux. Il est possible ainsi de mesurer et de quantifier l'ADN double ou simple brin. L'un des inconvénients majeurs de ce type de mesure réside dans le fait que toute molécule parasite qui absorbe la lumière est prise en compte dans la mesure de la concentration. L'analyse de l'absorbance se fait par un logiciel (Nanodrop[®] 1000 v3.7) installé sur un ordinateur relié à l'appareil. L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines qui représentent les témoins de contamination absorbent à 280 nm. L'absorption, absorbance ou Densité Optique (DO) est mesurée à 2 longueurs d'ondes différentes (260 et 280) et un rapport est établi (260 / 280) calculé automatiquement par le logiciel. En effectuant le rapport de DO 260 nm / DO 280 nm, la pureté de l'ADN est déterminée en vérifiant une éventuelle contamination par les protéines ou par les ARN.

On considère que : l'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$), l'ADN est contaminé par les protéines si $R < 1,6$ et que l'ADN est contaminé par les ARN si $R > 2$. La concentration de l'ADN est donnée directement en nanogramme (ng) par µl et doit être idéalement supérieure à 50 ng/µl pour optimiser la réalisation d'une PCR.

3- Génotypage du *CYP1A1* :

Afin de génotyper notre population pour le polymorphisme d'intérêt du gène *CYP1A1* nous avons été amené à réaliser une technique de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) ou PCR/digestion. Cette technique est basée sur le fait que la présence de l'allèle muté crée ou entraîne la disparition d'un site de coupure pour une enzyme de restriction donnée. On amplifie, par PCR, un segment d'ADN spécifique de la région d'intérêt contenant la mutation ponctuelle étudiée. Le produit d'amplification est ensuite digéré par une enzyme de restriction adéquate et les produits de digestion sont séparés par électrophorèse. Le profil électrophorétique de digestion ainsi obtenu permet de constater la présence ou l'absence d'une coupure enzymatique du produit amplifié, révélant la présence ou l'absence du polymorphisme.

3-1- Amplification de la région 3' non codante du *CYP1A1* :

Pour prospecter le polymorphisme T3801C (rs4646903) de région 3' non codante du gène *CYP1A1*, connu également sous la désignation de l'allèle m1, nous avons amplifié, par PCR, une portion de la région 3' non codante en utilisant une paire d'amorces spécifiques.

Matériel :

- Micropipettes et pointes,
- Eppendorfs[®],
- Vortex,
- Petite centrifugeuse,
- Tubes de PCR,
- Thermocycleur (Techne[®] iCycler).

Réactifs :

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau ci-dessous. La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait dans la glace.

Tableau II : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de la région 3' non codante du gène *CYP1A1*.

Réactif	Vol/tube (µl)
ADN (~50ng)	1
Tampon 10X (Sans MgCl ₂)	5
deoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphate (dNTP) 2Mm	5
MgCl ₂ 50Mm	3
<i>Thermus aquaticus</i> (Taq) Polymerase (Bioline [®] 250U)	0,4
H ₂ O distillée (PPi)	35,2
Amorces (F : Forward)	0,2
Amorces (R : Reverse)	0,2
	50

Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région 3' non codante du gène *CYP1A1*.

Amorces	Séquence (5'→3')	Taille de la région amplifiée (pb)
<i>CYP1A1</i> (F)	CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT	340
<i>CYP1A1</i> (R)	TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT	

Tableau IV : Programme du thermocycleur pour l'amplification de la région 3' non codante du gène *CYP1A1* (durée : 108 minutes).

Processus	Température (°C)	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95	4 minutes	1
Dénaturation	95	30 secondes	40
Hybridation	61	30 secondes	
Élongation	72	30 secondes	
Élongation finale	72	4 minutes	1

3-2- Digestion et migration sur gel d'agarose :

a- Principe :

Pour la mise en évidence du polymorphisme recherché, les produits de PCR sont soumis à une digestion enzymatique en clivant les molécules à des points précis appelés sites de restriction. Une modification par mutation dans la séquence du site de restriction pourrait entraîner ou empêcher l'action de l'enzyme ; autrement dit : faire disparaître ou apparaître un site de restriction spécifique. Ces modifications de l'ADN sont détectées par des variations du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique. Dans cette technique, connue sous l'appellation RFLP, le profil électrophorétique ainsi obtenu est appelé profil de restriction.

Le polymorphisme T3801C fait apparaître un site de restriction supplémentaire pour *HpaII* (**figure 08**) enzyme extraite de la bactérie *Haemophilus parainfluenzae* (American Type Culture Collection (ATCC) 49669) ou celui de son isoschizomère *MspI* extraite de bactéries du genre *Moraxella* (ATCC 49670).

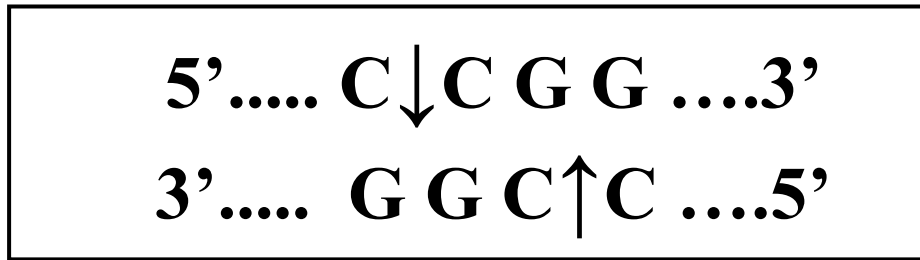


Figure 08 : Représentation schématique du site de restriction de l'enzyme *HpaII*.

Matériel :

- Support pour le moulage,
- Étuve,
- Erlenmeyer[®],
- Micro-onde,
- Cuve d'électrophorèse et peigne,
- Plaques pour coloration,
- Pipette,
- Générateur de courant,
- Chambre avec lampe UV munie d'un système de photographie-impression.

Réactifs :

- Enzyme de restriction *HpaII* (Kit BioLabs[®]),
- Tampon de digestion 1X (CutSmart[®] Buffer) (Kit BioLabs[®]),
- Gel d'agarose (UltraPure[™] Agarose) (3 %),
- Tris-Borate EDTA (TBE) 1X (100 ml par gel),
- BET (Bromure d'Éthidium),
- BBP (Bleu de Bromo-Phénol) (dilué au ½ dans le TBE1X),
- Marqueur de taille (100 à 600 pb) (**annexe III**).

b- Mode opératoire :

Après préparation du milieu réactionnel de la digestion (**annexe II**), les produits de PCR sont mis en incubation pendant 5 heures à 37°C dans l'étuve. La digestion est stoppée par immersion dans un bain marie à 80°C pendant 20 minutes. La migration se fait à 100V et pendant 2 heures. Cette migration génère des profils permettant la distinction entre les homozygotes (TT et CC) et l'hétérozygote (TC).

Pour le génotype TT on observe une seule bande qui correspond au fragment de 340 pb. Pour le génotype TC on obtient 3 bandes qui correspondent aux fragments de 140, 200 et 340 pb. Enfin, pour le génotype CC, on observe deux bandes correspondantes à deux fragments de 140 et 200 pb (**figure 09**).

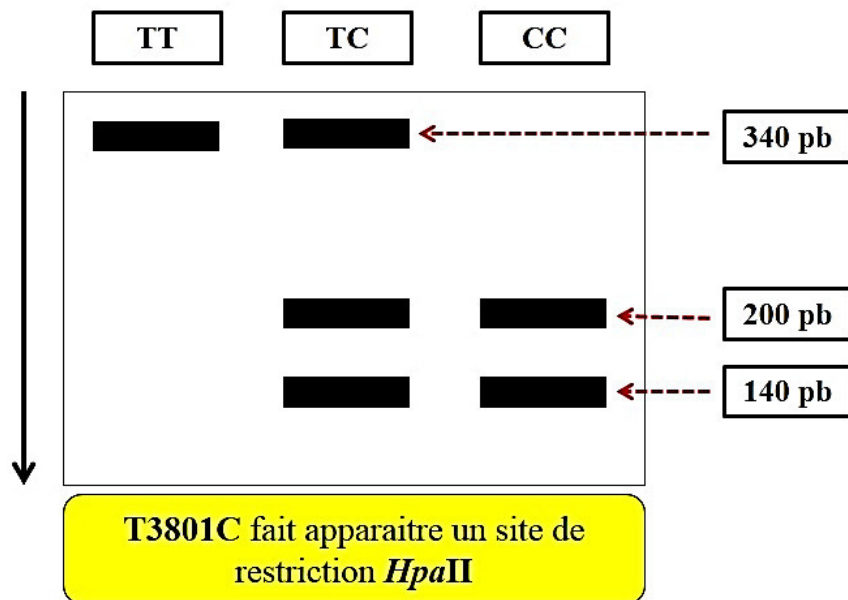


Figure 09 : Représentation schématique du résultat de l'analyse par RFLP du polymorphisme T3801C du *CYP1A1* sur un fragment PCR digéré par *HpaII*.

3-3- Analyse statistique :

Dans ce travail de recherche nous avons réalisé une prospection statistique visant à examiner l'association entre le variant allélique T3801C du gène *CYP11A1* et la survenue du diabète mitochondrial. Nous avons procédé à une étude transversale de type cas-témoins pour explorer une possible différence de distribution d'un polymorphisme génétique entre une population de cas (patients atteints de diabète mitochondrial), constituée d'individus enregistrés avec le trouble d'intérêt, et une population constituée de témoins, présumés sains, choisis dans la population générale et qui ne sont *a priori* pas atteints du dysfonctionnement étudié. La visée de cette étude est de inspecter, sur un « échantillon aussi représentatif que possible » de la population algérienne, des données rapportées dans la littérature qui indique qu'un polymorphisme supposé délétère d'un des gènes CYP pourrait contribuer à un risque accru de genèse d'un diabète mitochondrial.

Avant la mise en route d'une étude statistique de type cas-témoins, il est essentiel de réaliser une évaluation de l'équilibre de *Hardy-Weinberg* pour éviter de possibles erreurs dues à un biais de génotypage et/ou de sélection. Pour évaluer si une population est en équilibre d'*Hardy-Weinberg*, l'emploi du test du χ^2 standard est recommandé. Néanmoins, cette appréciation classique du χ^2 est possible uniquement lorsque les effectifs sont supérieurs à 5. Dans le cas contraire, il est indispensable d'utiliser le χ^2 corrigé avec la correction de *Fisher*, recevable lorsque la représentativité d'un génotype est inférieure à 3. Cela a été fait en utilisant une macro Excel (Microsoft Office® 2010) téléchargées sur le site : <http://www.anastats.fr/outils.php>. Si la valeur de p (p -value) calculée est $< 0,05$, cela permet de conclure que notre population d'étude n'est pas en équilibre d'*Hardy-Weinberg*. Cette valeur a été déterminée pour les cohortes de témoins et de celle des diabétiques enrôlés dans cette étude.

L'étude statistique d'association réalisée par l'utilisation du test du χ^2 , aussi appelé test de *Pearson*, est basée sur le calcul de l'Odds Ratio (OR) et la valeur p dans le but de déterminer s'il existe une association significative entre le variant allélique et la pathologie étudiée. Tous les calculs ont été faits sur le logiciel EPI-info 7.0TM ; logiciel de statistiques appliquées à l'épidémiologie disponible en accès et téléchargement gratuit à l'adresse : <http://www.epiconcept.fr>.

Pour le calcul des valeurs de l'OR nous avons établi un tableau de contingence présenté sous la forme d'un tableau croisé 2x2. Le statut malade/témoin des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé au facteur de risque en ligne. L'OR = (a/b)/(c/d). L'Intervalle de Confiance (IC) fixé est de 95 % (ou 0,95) (**tableau V**).

Tableau V : Tableau de contingence croisé type pour une étude cas-témoins.

	Diabétiques	Témoins	Total
Exposés (Présence du facteur préssumé de risque de la maladie)	a	b	a + b
Non-exposés (Absence du facteur préssumé de risque de la maladie)	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Pour la valeur p , le seuil critique que nous avons fixé est de 0,05 (vu que la valeur de l'IC pour l'OR est de 95 %). Si la valeur de p calculée est inférieure au seuil fixé, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

Afin d'évaluer toutes les contributions possibles de l'allèle muté C dans la survenue du syndrome des OPK, nous avons analysé différents effets possibles de l'allèle muté sur notre population de femmes OPK en comparaison avec nos témoins (**tableau VI**).

Tableau VI : Modèles de comparaison utilisés pour notre étude cas-témoins.

Modèle de comparaison	Fréquences comparées
Modèle dominant	TT <i>versus</i> TC+CC
Modèle récessif	CC <i>versus</i> TC+TT
Modèle homozygote	CC <i>versus</i> TT
Modèle hétérozygote	CC <i>versus</i> TC
Modèle allélique	C <i>versus</i> T

Résultats
et
discussions

Résultats et discussions

I- Description clinique et biologique des cas :

Dans ce modeste travail de recherche réalisé dans le cadre d'un mémoire de Master en Génétique Moléculaire, nous avons essayé de mener une enquête statistique descriptive, rétrospective, d'une période d'une année, allant de Mars 2016 à Mars 2017, construite à partir des dossiers de patients diabétiques recrutés au niveau du service de médecine interne du CHU Ben Badis Constantine et de l'association des diabétiques de Bâb-El-Kantara. À travers cette enquête, nous avons essayé d'avoir des éléments de réponse quant à l'incidence des diabètes mitochondriaux dans la région de Constantine.

Nous avons recensé, au niveau des structures de santé susmentionnées, durant la période mentionnée ci-dessus, 60 nouveaux cas de diabétiques de type 2 : 29 femmes et 31 hommes. Après la réalisation d'un questionnaire et d'un examen clinique approfondi par les médecins cliniciens affiliés à ces structures, après la réalisation d'un bilan biologique standard pour un diabétique et interprétation des résultats, nous avons relevé quatre authentiques cas qui présentent un diabète mitochondrial. Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII : Caractéristiques clinico-biologiques des patients avec un diabète mitochondrial.

	Sexe	Age de découverte	Circonstance de découverte du diabète	HbA1c du premier bilan (%)	IMC du premier bilan (kg/m ²)	Histoire familiale de diabète	HbA1c du dernier bilan (%)	Complications	Atteintes associées
P1	F	17 ans	Polyurie	9	20,19	transmission maternelle avec au moins 1 sujet dans la famille qui présente un diabète et une surdité	8,6	Aucune	Aucune
P2	F	45 ans	Polyurie Examen systématique	9,1	33,33		6,8	Rétinopathie	Surdité
P3	F	25 ans	Polyurie	7,6	22,10		9,10	Rétinopathie	Aucune
P4	F	41 ans	Examen systématique	8	22,31		6,8	Rétinopathie	Aucune

Résultats et discussions

L'analyse des données recueillies permet d'avoir des éléments de réponse quant aux caractéristiques de ce type de diabète particulier. Plusieurs paramètres ont été explorés :

- **La prévalence :** sur les 60 nouveaux cas de diabétiques de type 2 répertoriés, 4 présentent un authentique diabète mitochondrial, soit une fréquence de 6,66 %. Cependant, des données de la littérature rapportent une proportion de 0,1 à 0,4 % des diabétiques caucasiens présentant un diabète mitochondrial (**Saker et al., 1997**). Nos résultats peuvent suggérer une réelle augmentation de l'incidence pour ce type de diabète ou un possible biais due à la taille extrêmement réduite de la population de diabétiques prospectés.
- **Le sexe :** il est frappant de constater que la totalité de notre cohorte est composée de femmes. Les données épidémiologiques de par le monde indiquent que le sex-ratio du diabète de type 2 est proche de 1 (**ADA, 2008**). Les études ayant prospecté la prévalence du diabète mitochondrial dans des diverses populations rapportent un sex-ratio similaire (**Guillausseau et al., 2005**). Nos résultats pourraient être due à un biais d'échantillonnage.
- **L'âge :** la moyenne d'âge de découverte de la pathologie dans notre population d'étude est de 32 ans avec des extrêmes de 21 et de 45 ans. Ces résultats concordent avec les données de la littérature qui indiquent que, dans ce type de diabète, le trouble de la glycorégulation survient entre 20 et 40 ans, et pratiquement dans tous les cas avant 70 ans, ce qui implique une pénétrance complète de la maladie à cet âge (**Maassen et al., 2004**).
- **L'IMC :** la moyenne de l'IMC de notre population d'étude est de 24,48 kg/m² avec des extrêmes allant de de 20 à 33. En fait, selon le GEDIAM, l'un des phénotypes évocateurs du diabète mitochondrial est un indice de masse corporelle anormalement bas. Ce type de diabète se présente cliniquement selon deux phénotypes. Dans les deux formes, il est remarquable par un IMC anormalement bas. Le MIDD1 (20 % des cas) a la présentation d'un diabète insulino-dépendant d'emblée, avec une acidocétose inaugurale une fois sur deux, un âge de début précoce (30 ans en moyenne) et un IMC très bas (18 kg/m²). Le MIDD2, de découverte par dépistage systématique dans une majorité de cas, emprunte le phénotype du diabète de type 2 dans sa forme habituelle. Il apparaît plus tardivement que le MIDD1 (40 ans), l'IMC est plus élevé (21 kg/m²), et, comme le diabète de type 2, évolue vers l'insulino-requérance en 10 ans en moyenne (**Guillausseau et al., 2001**).

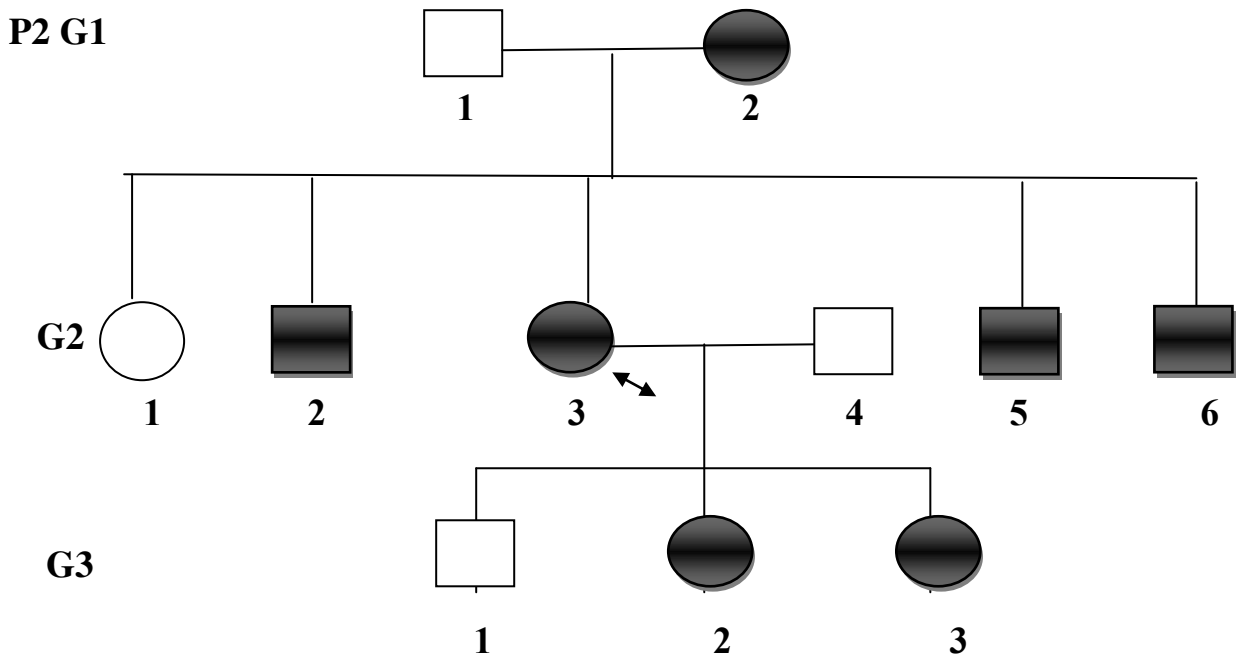
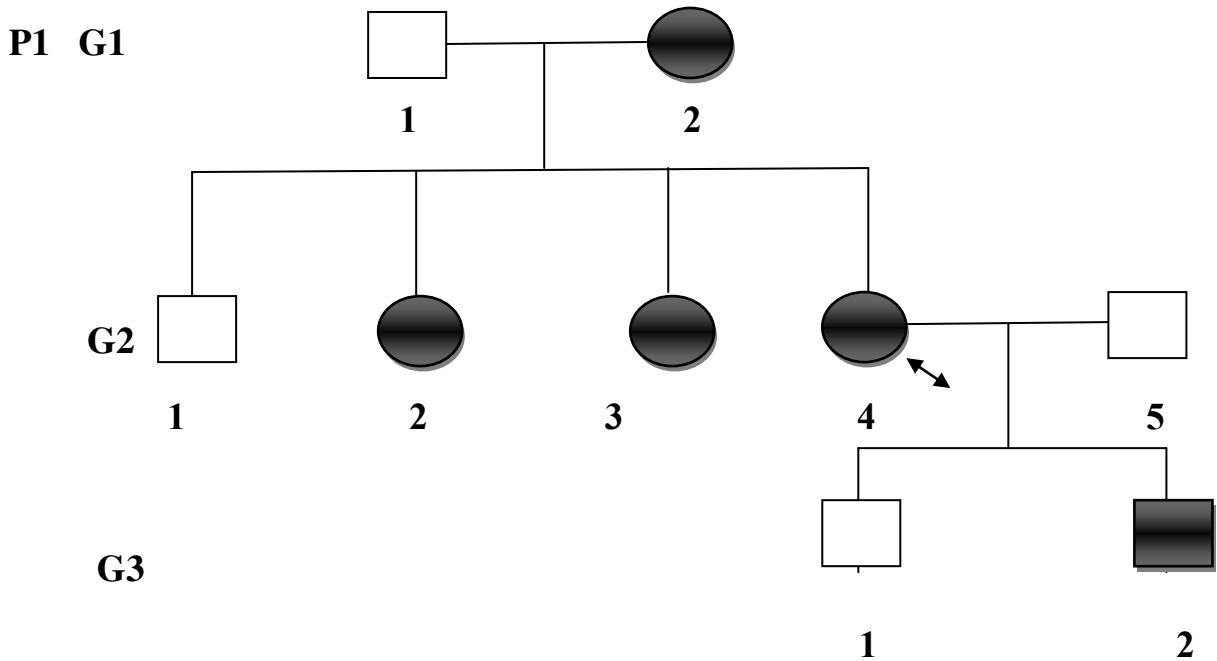
Résultats et discussions

- **Les troubles de l'audition** : dans notre cohorte, un seul patient (25 % des cas) présente un trouble de l'audition. Selon les données publiées par plusieurs études (**Reardon et al., 1992** ; **Guillausseau et al., 2001** ; **Suzuki et al., 2003**), des troubles bilatéraux de l'audition d'origine neurosensorielle sont présents dans 98 % des cas. Selon ces mêmes auteurs, ces troubles sont acquis, et apparaissent précocement, entre 30 et 35 ans, voire dans l'enfance ou l'adolescence. La sévérité du déficit auditif est variable, avec une surdité qui nécessite un appareillage dans 35 % des cas. L'audiogramme révèle, dans les formes débutantes, un déficit qui porte sur les fréquences élevées (aiguës), comparable à celui de la presbyacousie. Nos résultats peuvent avoir deux explications possibles : ces troubles, si caractéristiques du diabète mitochondrial, ne se sont pas encore manifestés chez les plus jeunes de notre cohorte (patientes âgées de 17 et 25 ans) ou cela est dû à une expressivité variable, du moins, pour la patiente âgée de 41 ans.
- **La dystrophie maculaire réticulée** : la présence d'une lésion spécifique de l'épithélium pigmentaire rétinien ; la dystrophie maculaire réticulée caractérise le diabète mitochondrial (**Massin et al., 1995 ; 1999**). Cette lésion est définie par des dépôts pigmentés sous-rétiens maculaires et péri-papillaires en réseau, associés à une atrophie de l'épithélium pigmentaire du pôle postérieur. Elle évolue avec le temps, apparaissant entre 20 et 30 ans, complétée tardivement par des zones d'atrophie de l'épithélium pigmentaire et de la chorio-capillaire péri-maculaires. L'atteinte du centre de la macula est rare, alors responsable d'une baisse de l'acuité visuelle. La dystrophie maculaire réticulée est présente chez 77 % à 84 % des caucasiens avec un diabète mitochondrial (**Smith et al., 1999 ; Guillausseau et al., 2001 ; 2004**), mais est rare chez les Japonais (13 %) (**Suzuki et al., 2003**). Malheureusement, dans notre population d'étude, ce paramètre si important selon les recommandations du groupe GEDIAM n'a pas été exploré.
- **La rétinopathie diabétique** : dans notre cohorte, la présence de la rétinopathie diabétique est mentionnée dans 3 cas sur 4 (75 %). Ces résultats sont en désaccord avec les données de la littérature. En fait, la fréquence de la rétinopathie diabétique est faible dans le diabète mitochondrial. Une étude française rapporte une fréquence de 8 % contre 40 % des diabétiques de type 2 appariés (**Guillausseau et al., 2002**). Cependant, la rétinopathie diabétique est fréquente chez les Japonais et est présente dans 55 % des cas de diabète mitochondrial et dans 20 % des formes sévères (**Suzuki et al., 2003**).

Résultats et discussions

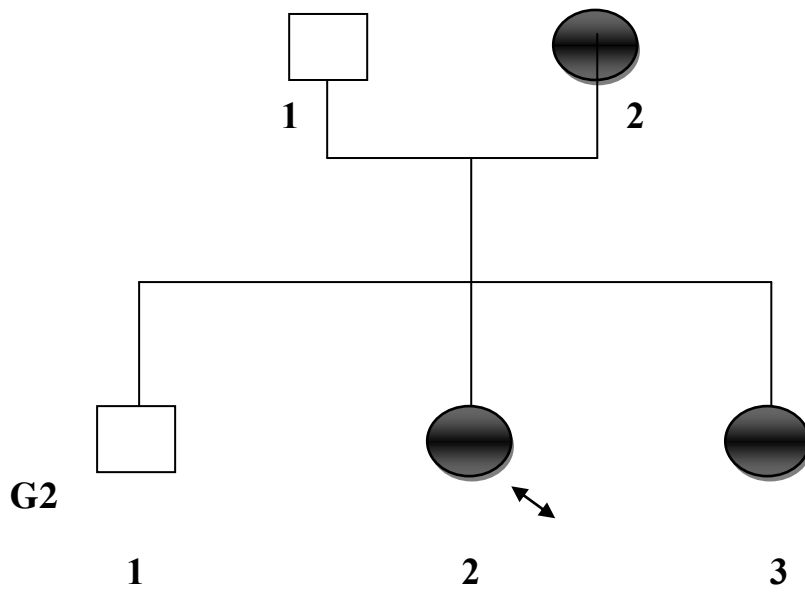
- **Autres :** généralement, une hyperglycémie plus modérée (HbA1c 1 % en moyenne plus basse) et une fréquence plus faible d'hypertension artérielle (un tiers contre deux tiers) est rapportée dans le diabète mitochondrial (**Guillausseau et al., 2005**). Malheureusement, les données clinico-biologiques recueillies ne nous permettent pas de faire une comparaison.

Après la description des paramètres cliniques et biologiques, des arbres généalogiques ont été établis pour chacun de nos patients. Ces arbres sont présentés ci-dessous :

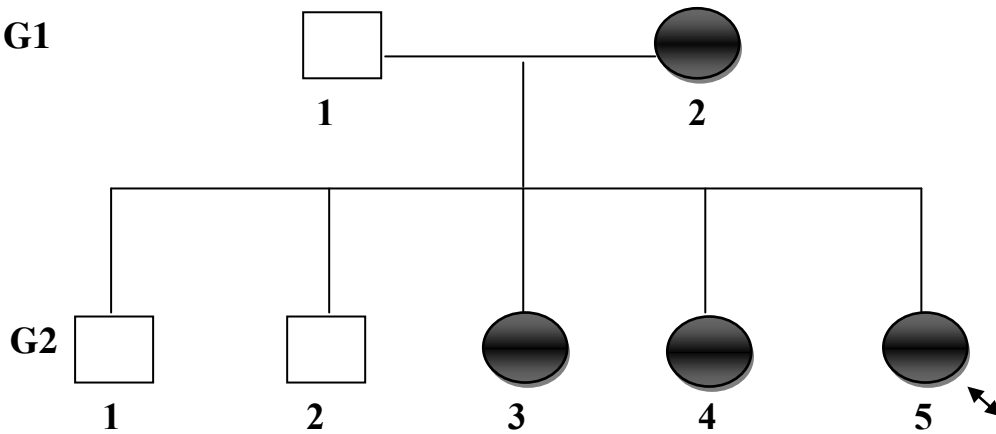


Résultats et discussions

P3 : G1



P4 : G1



 Femme atteinte

 Homme atteint

 Femme saine

 Homme sain

Figure 10 : Arbres généalogiques des familles touchées par diabète mitochondrial.

Résultats et discussions

Les arbres généalogiques établis pour la totalité de nos patientes atteintes de diabète mitochondrial indiquent clairement une transmission maternelle. Cela implique que ces patientes ont hérités la maladie de leurs mères qui sont atteintes également. Une transmission matrilineaire implique également qu'une mère atteinte de diabète mitochondrial va transmettre la maladie à tous ces enfant et ce sans exception (hommes et femmes). Cela est due au fait que les mitochondries sont d'origine maternelle. Contrairement à ce que nous observons généralement avec une maladie mitochondriale à transmission maternelle, nous avons noté dans nos arbres généalogiques que tous les frères et sœurs de nos patientes ne sont pas atteints par ce dysfonctionnement. Des proportions assez homogènes sont observées : 3/5 (60 %) de la première famille, 4/6 (66,66 %) de la deuxième, 2/3 (66,66 %) de la troisième et enfin 3/5 (60 %) de la quatrième présentent des signes de diabète. Cela peut être expliqué par le fait que cette pathologie s'exprime généralement entre 20 et 40 ans. Néanmoins, un diabète mitochondrial peut se déclaré après l'âge de 40 ans. En fait, comme mentionné précédemment, la pénétrance de cette maladie n'atteint les 100 % qu'à l'âge de 70 ans. Certes, les mitochondries sont d'origine maternelle, d'où le mode de transmission maternelle de la maladie, mais il existe des mutations *de novo* qui peuvent être à l'origine d'un diabète mitochondrial (**Maassen et al., 2002**). Chez les patients atteints de ce dysfonctionnement, un antécédent maternel de diabète est trouvé dans 72 % des cas (**Guillausseau et al., 2001 ; Suzuki et al., 2003**).

Il est aujourd'hui admis que les facteurs génétiques jouent un grand rôle dans l'étiologie du diabète type 2 en général. Leur implication dans l'apparition du diabète repose sur un faisceau de preuves. Tous d'abord, les études de gémellarité montrent une concordance quasi-absolue dans l'apparition du diabète type 2, chez des jumeaux monozygotes. De plus, il existe une très forte agrégation familiale du diabète type 2. Ainsi, 38 % des apparentés de premier degré à des patients diabétiques type 2 développent aussi le diabète, ainsi que 21 % de leurs parents, comparés à 6 % et 9 % chez les contrôles. Lorsqu'un parent est diabétique, 20 % des enfants le deviendront avant l'âge de 60 ans et 40 % au cours de leur vie. Le diabète apparaît avant l'âge de 60 ans chez plus de 50 % des enfants dont les deux parents sont diabétiques et chez 20 à 40 % des frères et sœurs d'un sujet diabétique. Il a été remarqué également que dans certaines ethnies, la prévalence du diabète type 2 est très haute, 50 % chez les Indiens Pimas d'Arizona, 60 % chez les Nauruëens du Pacifique, ce qui a suggéré, au départ, une origine mono-génique à transmission autosomique dominante de la maladie, ce qui n'est pas nécessairement vrai, bien que cela puisse être le cas de certains groupes ethniques bien isolés (**Fujimoto et al., 1996 ; Lacquemant, 2000**).

Résultats et discussions

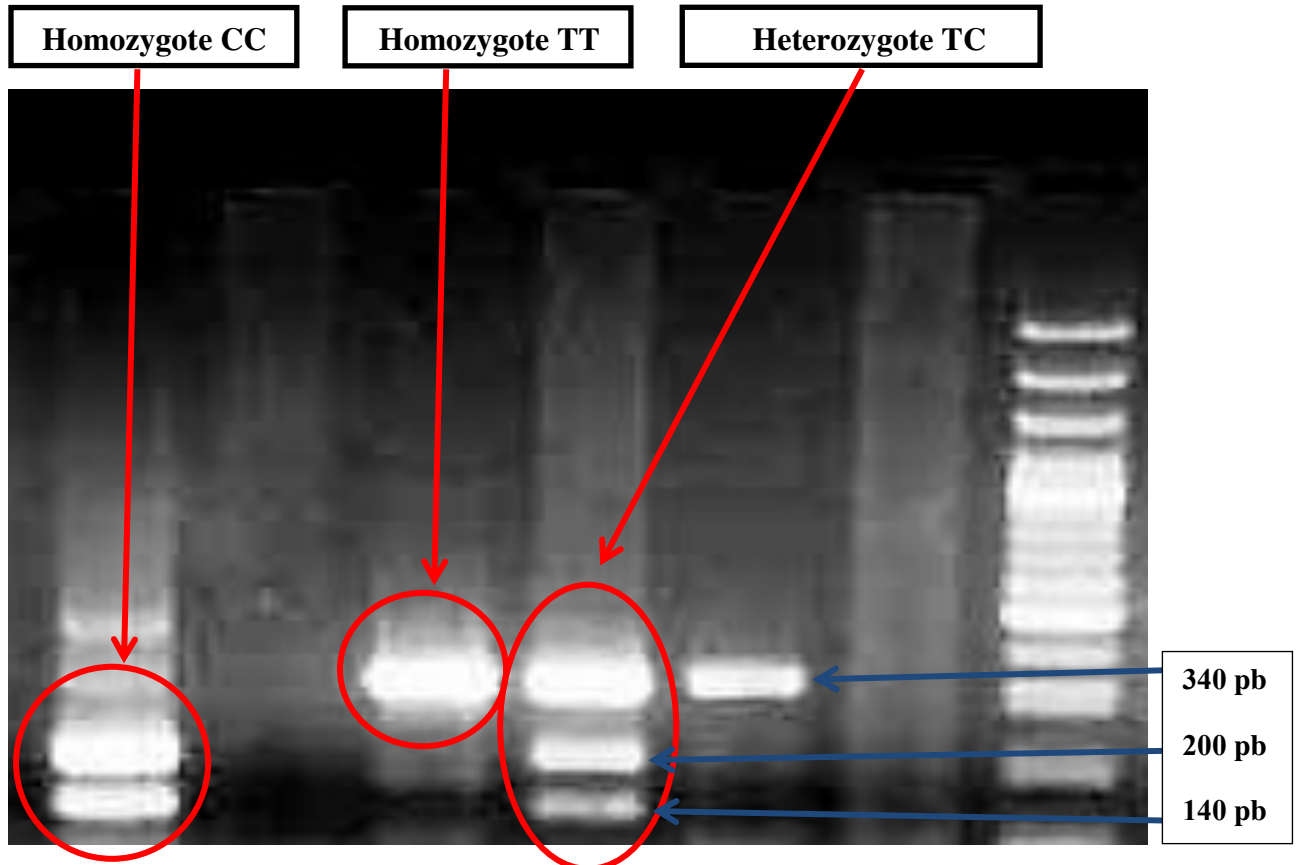
Les formes mono-géniques du diabète type 2 constituent une preuve non équivoque que la tolérance au glucose est déterminée génétiquement. Ainsi, la transmission plus importante du diabète type 2 par les mères diabétiques, et la présence de familles de diabétiques à hérédité purement maternelle avec une apparition précoce du diabète, généralement avant l'âge de 45 ans, a conduit plusieurs équipes à étudier le rôle du génome mitochondrial, d'autant que certaines cytopathies mitochondriales s'accompagnent d'anomalies de la glycorégulation. Une mutation ponctuelle de l'ADNmt, située dans la séquence codant l'ARN de transfert de la leucine (ARNt^{Leu}3243), a été découverte dans des familles européennes et Japonaises, qui coségrégait avec un diabète type 2 et une surdité (MIDD) (**Van den Ouweland et al., 1992 ; Awata et al., 1993**). Environ 2 % de MIDD ont été retrouvés dans la cohorte de familles diabétiques type 2 françaises (**Vionnet et al., 1993**). Là encore, des anomalies précoces de la sécrétion de l'insuline ont été montrées chez des sujets non diabétiques mais porteurs du variant 3243 de l'ADNmt (**Velho et al., 1996**). En dehors de cette mutation ponctuelle, des délétions exceptionnelles de larges portions de l'ADNmt entraînent un diabète insulino-requérant, sont associées à d'autres pathologies en particulier d'ordre neurologique (**Lacquemant, 2000**).

II- Analyse moléculaire :

Afin d'enquêter sur l'association possible entre le polymorphisme T3801C du *CYP11A1* et le risque de développement et/ou complication de diabète mitochondrial en Algérie, nous avons effectué cette étude transversale de type cas-témoins. Le génotypage du *CYP11A1* pour ce polymorphisme a été réalisé par PCR/digestion.

Après amplification partielle de la région 3' non codante du gène et digestion des amplicons par *HpaII*, le profil de restriction obtenu permet la distinction entre l'homozygote TT, l'hétérozygote TC et l'homozygote CC (**photographie 01**). Les résultats obtenus sont mentionnés ci-après (**tableau VIII, figures 11 et 12**).

Résultats et discussions



Photographie 01 : Profil de restriction des produits de l'amplification partielle de la région 3' non codante du gène *CYP1A1* après digestion par *HpaII*.

Tableau VIII : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme T3801C du gène *CYP1A1* dans notre population d'étude.

Patients					Témoins				
TT	TC	CC	T	C	TT	TC	CC	T	C
02 50 %	01 25 %	01 25 %	05 62,50 %	03 37,50 %	71 84,52 %	11 13,10 %	02 02,38 %	153 91,07 %	15 08,93 %
04 100 %			08 100 %		84 100 %			168 100 %	

Résultats et discussions

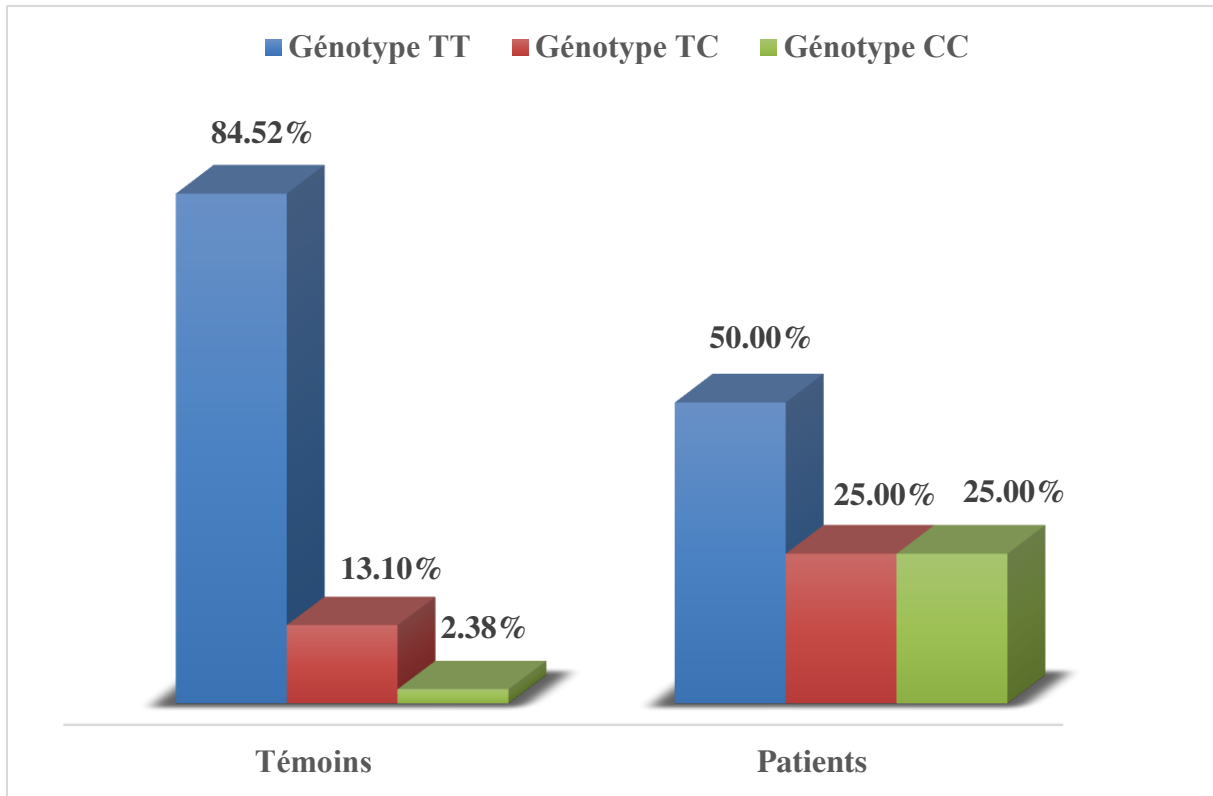


Figure 11 : Fréquences génotypiques du polymorphisme T3801C du *CYP1A1* dans notre population d'étude.

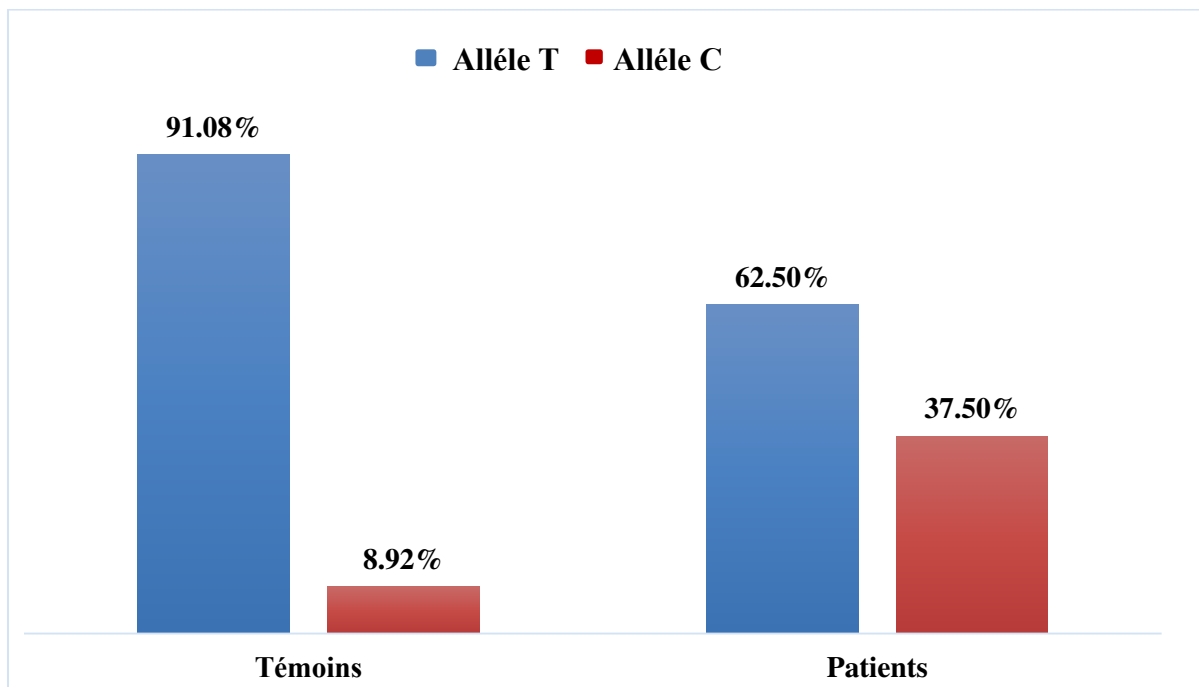


Figure 12 : Fréquences alléliques du polymorphisme T3801C du *CYP1A1* dans notre population d'étude.

Résultats et discussions

Tableau IX : Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme T3801C du *CYP1A1*.

Modèle de comparaison	Modèle dominant	Modèle récessif	Modèle homozygote	Modèle hétérozygote	Modèle allélique
	TT vs TC+CC	CC vs TC+TT	CC vs TT	CC vs TC	C vs T
OR	5,461	13,66	17,75	5,5	6,12
Risque relatif	3,230	10,5	12,16	3,25	4,2
Valeur <i>p</i>	0,345	0,226	0,305	0,346	0,285

Avant de procéder à l'analyse statistique, nous avons soumis les valeurs de la distribution des différents génotypes dans les deux cohortes au test visant à déterminer si une population d'étude est bien en équilibre de *Hardy-Weinberg*. Nous avons obtenu une *p-value* de **0,350** pour la cohorte des patients et de **0,074** pour la cohorte de témoins ; les deux *p-value* sont supérieures à 0,05 ce qui suggère que notre population est en équilibre. L'analyse des résultats du génotypage de *CYP1A1* pour le polymorphisme m1 étudié a démontré que le génotype homozygote sauvage (TT) est le plus fréquent dans les deux cohortes avec une fréquence de 50 % (n = 2) chez les diabétiques et de 84,52 % (n = 71) chez les témoins, avec une nette prédominance dans ce dernier groupe. Le génotype hétérozygote (TC) est beaucoup plus fréquent chez les diabétiques (25 %, n = 1) que chez les témoins (13,10 %, n = 11). Il est à noter, cependant, dans le groupe des diabétiques, que les fréquences des génotypes TC et CC (homozygote muté) sont identique. Au contraire, la fréquence de l'homozygote mutée (02,38 %) est bien inférieure à celle de l'hétérozygote TC (13,10 %) dans la cohorte des témoins. En comparaison avec les témoins (02,38 %), la fréquence du génotype homozygote muté est relativement importante (25 %) (**tableau VIII, figure 11**). L'analyse des fréquences alléliques a mis en évidence une différence de répartition de l'allèle morbide (C) entre diabétiques (37,50 %) et témoins (08,93 %) (**tableau VIII, figure 12**).

Résultats et discussions

Après soumission de ces proportions au logiciel d'analyse statistique, toutes ces différences dans les fréquences génotypiques et alléliques, entre patients et témoins, qui paraissaient à premier abord bien marquées, ont été jugées statistiquement non significatives. En effet, après utilisation de tous les modèles de comparaison, les valeurs de p obtenues étaient toutes supérieures au seuil de significativité fixé (0,05) (**tableau IX**). Après une recherche bibliographique rigoureuse sur les bases de données de type *PubMed*, à notre connaissance, il n'existe aucune étude ayant prospecté l'implication d'un ou de plusieurs polymorphismes du gène *CYP1A1* dans la survenue du diabète mitochondrial. Cependant, de nombreuses équipes de recherche ont conduit des investigations sur l'implication des *CYP4A*, *CYP2C* et *CYP2J* dans la survenue du diabète de type 2. D'autres polymorphismes des CYP, *CYP2C8* *4, *CYP2J2* G-50T, *CYP2C9* *2 et *CYP2C9* *3 ont été étudiés pour leur responsabilité dans l'insulino-résistance (**Luo et Wang, 2011**).

Les enzymes clés de la détoxification sont principalement les isoformes de la superfamille des cytochromes P450 qui catalysent les réactions de mono-oxygénation, de réduction, et d'hydrolyse de nombreux substrats, les rendant plus polaires, plus facilement pris en charge par les enzymes de phase II et potentiellement plus rapidement éliminés. Le processus de biotransformation peut donner lieu à des métabolites réactifs capables d'entraîner des effets génotoxiques ou immuno-toxiques (**Androutsopoulos et al., 2009**). Les cytochromes P450, enzymes clés du métabolisme des xénobiotiques, quelles que soient leurs origines (médicamenteuses, industrielles ou alimentaires), sont des enzymes présents essentiellement dans le foie mais aussi en plus faible quantité dans le rein, le poumon, l'intestin, la peau et le pancréas. Ils sont capables de générer des métabolites réactifs vis-à-vis de certaines macromolécules (acides nucléiques, protéines et lipides insaturés) qui sont très toxiques. Ces cytochromes peuvent intervenir dans le stress oxydatif comme cela a été démontré au cours de l'infarctus du myocarde où l'administration d'inhibiteurs du cytochrome P450 diminue la taille de l'infarctus. En plus de leur localisation dans le réticulum endoplasmique, les cytochromes P450 peuvent être présents dans les mitochondries où ils possèdent des propriétés enzymatiques propres (**Robin, 2005**). Des polymorphismes du gène *CYP1A1*, cytochrome P450 extra-hépatique majeur, ont été identifiés. Ces polymorphismes, rappelons-le, confèrent une activité accrue à cette enzyme impliquée dans la biotransformation de phase I. Dans ce cas, nous pourrions nous attendre à ce que les porteurs d'un ou de deux allèles mutés voient leur risque de stress oxydatif augmenté suivant l'énoncé de l'hypothèse voulant que les radicaux libres soient en cause dans la physio-pathologie de l'atteinte (**Kristiansen et al., 2011**).

Résultats et discussions

Le gène *CYP1A1* code pour une enzyme qui est principalement exprimée dans le foie, mais qui a été détectée également dans d'autres tissus, et peut activer les hydrocarbures aromatiques tels que le benzo(a)pyrène en époxydes et des produits phénoliques qui sont mutagènes. Le polymorphisme *CYP1A1* T3801C peut modifier le niveau de l'expression des gènes ou la stabilité de son ARNm, conduisant à une activité hautement inductible de l'enzyme (Luo et al., 2014). Les polymorphismes du *CYP1A1* peuvent causer des dommages à l'ADN en modifiant le niveau d'expression du gène par la stabilité de son ARNm, ce qui entraîne une activité hautement inductible de l'enzyme. *CYP1A1* T3801C (aussi appelé m1) est un polymorphisme dans la région non codante 3' du *CYP1A1*, contenant une seule substitution de T en C qui donne naissance à un site de restriction *MspI*. Le variant C a été trouvé pour être plus facilement inductible par rapport au variant T, et il est concevable que ce polymorphisme peut avoir ainsi une relation avec ce dysfonctionnement. Depuis l'identification des polymorphismes du *CYP1A1*, de nombreuses études ont prospecté son implication dans la pathogenèse de nombreuses maladies. Les premières d'entre-elles sont les pathologies cancéreuses (Ortiz de Montellano, 2004).

Les mécanismes biologiques par lesquels la variation d'activité du *CYP1A1* exerce ses effets sur la genèse d'un stress oxydatif au niveau cellulaire ne sont pas clairement élucidés. L'enzyme *CYP1A1* joue un rôle essentiel dans le métabolisme de phase I de HAP et dans le métabolisme des œstrogènes, la dysfonction du *CYP1A1* peut causer des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines. Plusieurs études expérimentales indiquent que certains CYP contribuent à la production d'espèces réactives de l'oxygène au cours du métabolisme de différents substrats. Il est possible que ces espèces réactives de l'oxygène participent à la pathogénie de certaines maladies (Ortiz de Montellano, 2004 ; Robin, 2005).

Certaines formes de diabète sucré sont secondaires à des mutations et à des délétions de l'ADNmt. Le MIDD en est la forme la plus fréquente et est caractérisé par une mutation ponctuelle A > G en position 3243 de l'ADNmt, initialement trouvée dans le syndrome MELAS (Goto et al., 1990). En fait, cette mutation peut être présente dans la population générale sans pour autant conduire à un diabète. Sa fréquence est estimée à 16,3/100 000 dans la population générale finlandaise adulte (Majamaa et al., 1998). D'autres mutations et délétions de l'ADNmt ont été aussi rapportées en association avec un diabète et qui comportent le plus souvent des anomalies neurologiques et/ou musculaires. Aujourd'hui, près de vingt mutations ponctuelles de l'ADNmt en association avec des phénotypes comportant un diabète sucré sont répertoriées (Guillausseau et al., 2005).

Résultats et discussions

Les mécanismes moléculaires à l'origine des altérations qualitatives et/ou quantitatives du génome mitochondrial sont encore controversés. L'hypothèse principale avancée pour expliquer l'accumulation de mutations dans l'ADNmt serait un stress oxydatif due principalement à la formation de la 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG) et d'autres produits du dommage oxydant ce qui pourrait être impliqué dans la génération de délétions et d'autres mutations (**Hayakawa *et al.*, 1993**).

Il y a une sensibilité particulière de l'ADNmt à un stress oxydatif car, pour rappel, la molécule d'ADNmt est accolée à la membrane interne et donc proche de la chaîne respiratoire, elle n'est pas protégée par les histones et les capacités de réparation sont limitées comparées à l'ADN nucléaire. Ainsi, les EROs produits par les mitochondries provoquent des mutations ponctuelles et de nombreuses délétions responsables de perturbations dans le fonctionnement mitochondrial. Le résultat final est une accumulation irréversible sur le long terme de dommages sur l'ADNmt qui peut être la cause principale de changements nuisibles observés dans l'organisme (**Lescuyer, 2002 ; Thevès, 2006**). Cela peut constituer une étiologie possible à ce type de diabète.

Il serait intéressant de faire le lien entre génétique nucléaire, explorée par la présente étude d'association cas-témoins, et génétique cytoplasmique dont le support est l'ADNmt. Partant de l'hypothèse qu'un excès d'EROs est à l'origine d'altérations du génome mitochondrial, il est évident que cet excès pourra être induit par un polymorphisme des gènes de détoxification à l'instar de *CYP1A1* qui code pour une des CYPs principales de la phase I d'activation des HAPs auxquels on est largement exposé dans notre environnement.

Notre étude du variant T3801C du *CYP1A1* révèle que celui-ci n'est pas un facteur de risque pour le diabète mitochondrial, du moins dans notre cohorte de diabétiques. Les données suggèrent que l'association entre ce polymorphisme et le dysfonctionnement étudié est modifiée par d'importantes interactions gène-gène et gène-environnement. En effet, la redondance des enzymes de détoxification et l'existence de plusieurs polymorphismes pour un même gène compliquent la détermination de la part réelle de la variation de ce gène dans le dysfonctionnement étudié. De plus, les variants alléliques supposés délétères des gènes du CYP, le plus souvent, ne présentent un effet phénotypique qu'après exposition à des xénobiotiques susceptibles d'exacerber leurs effets potentiels.

Résultats et discussions

Les polymorphismes de ce gène étudié comme facteur de risque potentiel dans la survenue du diabète mitochondrial fait partie d'un ensemble d'éléments qui, pour la plupart, sont considérés à l'heure actuelle comme des cofacteurs présents également chez les non diabétiques plutôt que de possibles acteurs spécifiques d'un métabolisme glucidique défectueux. Ces variants génétiques par eux-mêmes seraient probablement capables d'induire des dommages relativement mineurs, mais les effets de ces variants alléliques peuvent être aggravés par la présence d'autres cofacteurs génétiques ou environnementaux.

Les études d'association construites sur le modèle cas-témoins constituent un outil formidable en génétique et cela, en dépit du fait que les résultats rapportés ne sont pas toujours reproductibles et souvent discordants. Différents effets fondateurs pourraient ainsi expliquer ces associations contradictoires. Dans ce type d'études, plusieurs paramètres sont importants : la taille et la composition des populations étudiées (en particulier des populations de témoins), le type de polymorphisme (SNP ou de répétition), les techniques utilisées pour le mettre en évidence (PCR/digestion, séquençage ou autre), l'hétérogénéité phénotypique du dysfonctionnement, la variabilité interindividuelle des effets phénotypiques ainsi que les différences ethniques et géographiques contribuant aux variations génétiques. Tout cela sans compter avec les artefacts statistiques. D'autant que la grande majorité des journaux scientifiques aura plutôt tendance à ne publier que les résultats positifs des études d'associations, et refuser la publication de résultats négatifs, ce qui entraîne indéniablement un biais lors des méta-analyses (**Patterson et Cardon, 2005**).

La taille relativement faible de la cohorte des diabétiques étudiée ainsi que les effets phénotypiques des polymorphismes géniques qui sont eux-mêmes modulés par d'autres facteurs génétiques et environnementaux constitue une limite certaine à notre étude. Le diabète mitochondrial peut constituer un exemple important de l'interaction gène-environnement. Il est donc probable que certains polymorphismes n'entraînent une altération du métabolisme glucidique qu'en présence d'un fond génétique particulier et/ou en présence de facteurs environnementaux favorisant.

Avec une taille limitée de l'échantillon, nos résultats ne permettent que des conclusions préliminaires sur l'impact du polymorphisme prospecté. Des investigations épidémiologiques et biochimiques poussées sont nécessaires pour valider ces résultats. D'autres enquêtes tenant compte des interactions gène-gène et gène-environnement sur d'autres polymorphismes peuvent être utiles pour clarifier, en partie, l'étiologie des diabètes mitochondriaux en Algérie.

Conclusion
et
Perspectives

Notre travail de recherche a porté sur les diabètes mitochondriaux. De connaissance récente, d'incidence très rare, il nous a paru important de l'étudier. L'incidence de cette pathologie est en augmentation constante dans le monde entier, ceci est dû à au fait que les techniques de diagnostic génétique et leurs utilisations systématiques, en Europe, en présence d'une forte suspicion clinique d'une mitochondriopathie, confirme souvent ce type de diabète.

Le diabète de type 2 est la résultante d'une insulino-résistance associée à une insulino-pénie, mais une physiopathologie unique ne saurait expliquer cette maladie hétérogène. Parmi les pistes étiologiques explorées ces dernières années, le stress oxydatif et de plus en plus étudié. Plusieurs preuves expérimentales indiquent que certains CYP contribuent à la production d'ERO au cours du métabolisme de différents substrats. Il est possible que ces ERO participent à la pathogénie de certaines maladies. En plus de son rôle d'enzyme métabolisant les xénobiotiques, la modification du niveau d'expression des CYP a souvent été associée à certaines conditions pathologiques, incluant le diabète de type II. L'activité de ces enzymes est sujette à de nombreux polymorphismes.

Les cytopathies mitochondriales, maladies hétérogènes sur le plan clinique, sont liées à des déficits enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale située dans la membrane interne de mitochondrie et où se produit la phosphorylation oxydative. La mise en évidence de mutations de l'ADNmt dans ces cytopathies est relativement récente. Les cytopathies mitochondriales se caractérisent cliniquement par une atteinte pluri-viscérale et un diabète est parfois observé. On retiendra tout particulièrement le syndrome MIDD, caractérisé par la conjonction d'un diabète et d'une surdité neurosensorielle, à transmission maternelle. L'anomalie génétique est une mutation ponctuelle en position 3243 dans une région de l'ADNmt codant pour l'ARNt^{Leu}. Cette mutation était déjà décrite dans le syndrome MELAS. La parenté biologique de ces deux syndromes est confirmée par la fréquence du diabète dans le MELAS et la présence d'anomalies neuromusculaires, souvent infra-cliniques, dans le MIDD. Les différences cliniques de ces syndromes s'expliquent principalement par le pourcentage variable d'ADNmt retrouvé dans les différents tissus atteints. Dans le syndrome MIDD, tous les types de diabète peuvent être observés. L'anomalie biologique est un défaut d'insulino-sécrétion traduisant une mauvaise régulation de celle-ci par le glucose ; il n'y a pas d'insulino-résistance. Ceci est très probablement lié à une altération de la phosphorylation oxydative au sein des cellules pancréatiques par accumulation d'ADNmt muté.

Le diabète par cytopathie mitochondriale reste une cause rare de diabète, la prévalence étant estimée à 0,06 % dans la population générale. La recherche d'anomalies génétiques de l'ADNmt devant un diabète doit se faire s'il existe à la fois une notion de transmission maternelle du diabète et au moins une autre manifestation évocatrice de cytopathie mitochondriale, notamment une surdité neurosensorielle.

À la lumière de ce travail de recherche, on voit comme perspectives d'avenir :

- La réalisation d'une enquête épidémiologique à très grande échelle, sur l'ensemble du territoire national, afin d'avoir une idée réelle sur la prévalence des mitochondriopathies en général et du diabète mitochondrial en particulier en Algérie. Cela ne peut se faire qu'après une étroite collaboration entre médecins et biologistes afin de mieux cerner les contours de ces pathologies souvent méconnus dans le milieu médical.
- Faire ressentir, auprès des autorités compétentes, le besoin de mettre en place des structures dédiées à l'analyse génétique par biologie moléculaire permettant une exploration à la fois du génome nucléaire et du génome mitochondrial ; seul moyen infailible pour confirmer le diagnostic de ces pathologies complexes.

Références bibliographiques

1. **ADA : American Diabetes Association.** 2007. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care.* 30 (1) : S4-S41.
2. **ADA : American Diabetes Association.** 2008. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 31(1) : S55-S60.
3. **ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J et al.** 2002. Molecular Biology of the Cell. 4^{ième} édition. *Garland Science, New York.* 1463p. ISBN : 0-8153-3218-1.
4. **ALONSO B L.** 2016. Déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale avec instabilité de l'ADN mitochondrial : identification de nouveaux gènes et mécanismes. *Thèse en ligne : Université Cote d'Azur.* Pagination multiple.
5. **AMADOU A.** 2007. Étude d'une recette traditionnelle, des écorces de tronc de *Sclerocarya birrea* et d'*Uapaca togoensis* Pax utilisées dans le traitement du diabète. *Thèse en ligne : Université de Bamako.* Pagination multiple.
6. **AMAGARA D.** 2010. Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques du diabète chez l'enfant et l'adolescent. *Thèse en ligne : Université de Bamako.* Pagination multiple.
7. **ANDERSON S, BANKIER A T, BARRELL B G et al.** 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290 : 457-65.
8. **ANDREWS R M, KUBACKA I, CHINNERY P F et al.** 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics.* 23 : 147.
9. **ANDROUTSOPOULOS V P, TSATSAKIS A M et SPANDIDOS D A.** 2009. Cytochrome P450 *CYP1A1*: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer.* 9 : 187.
10. **AWATA T, MATSUMOTO T, IWAMOTO Y et al.** 1993. Japanese case of diabetes mellitus and deafness with mutation in mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Lancet.* 341 : 1291-1292.
11. **BARTSCH H et NAIR U.** 2000. Genetic polymorphisms of *CYP* genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 9 : 3-28.
12. **BELLMANN C, NEVEU MM, SCHOLL HP et al.** 2004. Localized retinal electrophysiological and fundus autofluorescence imaging abnormalities in maternal inherited diabetes and deafness. *Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS).* 45 : 2355-60.
13. **BOYER F.** 2016. Stress oxydant et pathologie diabétique : impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses. *Thèse en ligne : Université de La Réunion.* Pagination multiple.
14. **BUYSSCHAERT M et HERMANS M P.** 1998. Critères révisés et nouvelle classification des diabètes sucrés. *Louvin Medical.* 117 : 1-6.

15. **CALLEN J C et PERASSO P.** 2005. Biologie cellulaire : des molécules aux organismes. 2^{ème} édition. Collection Sciences-Sup. *Dunod, Paris*. 500p. ISBN : 2-1004-9236-5.
16. **CALOP J, LIMAT S et FRNANDEZ C.** 2008. Pharmacie clinique et thérapeutique. 3^{ème} édition. *Elsevier Masson*. 1308 p. ISBN : 978-2-294-06234-6.
17. **CHEN Y, LIAO W X, ROY A C et al.** 2000. Mitochondrial gene mutations in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 48 : 29-35.
18. **CHEYSSAC C, DINA C, LEPRÊTRE F et al.** 2006. EIF4A2 is a positional candidate gene at the 3q27 locus linked to type 2 diabetes in French families. *Diabetes*. 55 : 1171-1176.
19. **CONCANNON P, RICH S S et NEPOM G T.** 2009. Genetics of type 1A diabetes. *The New England Journal of Medicine*. 360 : 1646-54.
20. **DE MENTHIÈRE C S.** 1999. Etudes physico-chimiques du glucagon-like peptide-1 et de son récepteur : optique d'une nouvelle thérapeutique pour le diabète de type II. *Thèse en ligne : Université Montpellier I*. Pagination multiple.
21. **DEDOUSSIS G V, KALIORA A C et PANAGIOTAKOS D B.** 2007. Genes, diet and type 2 diabetes mellitus: a review. *The Review of Diabetic Studies*. 4 : 13-24.
22. **DI MAURO S et SCHON E A.** 2001. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *The American Journal of Human Genetics*. 106 : 18-26.
23. **DIMAURO S et SCHON E A.** 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England Journal of Medicine*. 348(26) : 2656-68.
24. **DIMAURO S.** 2004. Mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1658 : 80-8.
25. **FUJIMOTO W Y.** 1996. Overview of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) in different population groups. *Diabetic Medicine*. 13 : S7-S10.
26. **GILLERON M.** 2014. Complexité des maladies mitochondriales : à partir de deux exemples. Médecine humaine et pathologie. *Thèse en ligne : Université Pierre et Marie Curie - Paris VI*. Pagination multiple.
27. **GABALDON T et HUYNEN M A.** 2005. Shaping the mitochondrial proteome. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1659 : 212-220.
28. **GLANCY B et BALABAN R S.** 2012. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*. 51 : 2959-73.
29. **GOTO Y, NONAKA I et HORAI S.** 1990. A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*. 348 : 651-3.
30. **GRAY M W, BURGER G, LANG B F et al.** 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology*. 2(6) : 1018.

31. **GRIMALDI A.** 2009. Traité de diabétologie. *Médecine-Sciences Flammarion*. 1044p. ISBN : 978-2-257-00028-6.
32. **GUILLAUSSEAU P J, MASSIN P, DUBOIS-LAFORGUE D et al.** 2001. Maternally Inherited Diabetes and Deafness: a multicenter survey. *Annals of Internal Medicine*. 134 : 721-8.
33. **GUILLAUSSEAU P J, DUBOIS-LAFORGUE D, MASSIN P et al.** 2002. Prevalence of retinopathy, but not of renal complications is lower in Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD). *Diabetes*. 51(suppl2) : A81.
34. **GUILLAUSSEAU P J, DUBOIS-LAFORGUE D, MASSIN P et al.** 2004. Maternally inherited diabetes and deafness. Two distinct phenotypes for diabetes. *Diabetes & Metabolism*. 30:181-6.
35. **GUILLAUSSEAU P J, LALOI-MICHELIN M, VIRALLY M et al.** 2005. Diabètes mitochondriaux. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale-Endocrinologie*. 2 : 171-178.
36. **HAYAKAWA M, SUGIYAMA S, HATTORI K et al.** 1993. Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 119 : 95-103.
37. **HOUTEN S M et WANDERS R J A.** 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondria. *Journal of inherited metabolic disease*. 33(5) : 469-477.
38. **JAFAR-MOHAMMADI B et MCCARTHY M I.** 2008 Genetics of type 2 diabetes mellitus and obesity: a review. *Annals of Medicine*. 40 : 2-10.
39. **KRISHNAN K J, REEVE A K, SAMUELS D C et al.** 2008. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells ?. *Nature Genetics*. 40(3) : 275-9.
40. **KRISTIENSEN W, HAUGEN T B, WITCZAK O et al.** 2011. *CYP11A1*, *CYP3A5* and *CYP3A7* polymorphisms and testicular cancer susceptibility. *International Journal of Andrology*. 34(1) : 77-83
41. **LACQUEMANT C.** 2000. Étude génétique de l'insulino-résistance, du diabète et de leurs complications cardio-vasculaires. *Thèse en ligne : Université des sciences et technologies de lille I, U.F.R. de biologie*. Pagination multiple.
42. **LANZA I R et NAIR K S.** 2010. Mitochondrial function as a determinant of life span. *European Journal of Physiology*. 459(2) : 277-289.
43. **LESCUYER P.** 2002. Étude de l'expression des gènes nucléaires codant pour les sous-unités du complexe I mitochondrial humain. *Thèse en ligne : Université Joseph Fourier - Grenoble I*. Pagination multiple.
44. **LODISH H, BERK A, ZIPURSKY L et al.** 2005. Biologie moléculaire de la cellule. *Edition De Boeck Université, Bruxelles*. 1096p. ISBN : 2-8041-4802-5.
45. **LOGAN D C.** 2006. The mitochondrial compartment. *Journal of Experimental Botany*. 57 : 1225-1243.

46. LOUBLIERA S, SCHIFF M, BÉNITA P *et al.* 2009. Les maladies mitochondriales : une médecine à part ? *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 24 : 240-253.
47. LUO H, LI H, YAO N, HU L *et al.* 2014. Association between 3801T.C Polymorphism of *CYP11A1* and Idiopathic Male Infertility Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 9(1) : e86649.
48. LUO P *et* WANG M H. 2011. Eicosanoids, β -Cell Function, and Diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 95 : 1-10.
49. MAO C C *et* HOLT I J. 2009. Clinical and molecular aspects of diseases of mitochondrial DNA instability. *Chang Gung Medical Journal*. 32 : 354-369.
50. MAASSEN J A, BIBEROGLU S, HART L M *et al.* 2002. A case of a *de novo* A3243G mutation in mitochondrial DNA in a patient with diabetes and deafness. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 110 : 186–8.
51. MAASSEN J A, HART LM, VAN ESSEN E *et al.* 2004. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes*. 53(suppl1) : S103-9.
52. MAJAMAA K, MOILANEN J S, UIMONEN S *et al.* 1998. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *The American Journal of Human Genetics*. 63 : 447-54.
53. MASSIN P, GUILLAUSSEAU P J, VIALETES B *et al.* 1995. Macular pattern dystrophy associated with a mutation of mitochondrial DNA. *American Journal of Ophthalmology*. 120 : 247-8.
54. MASSIN P, VIRALLY-MONOD M, VIALETES B *et al.* 1999. Prevalence of macular pattern dystrophy in maternally inherited diabetes and deafness. GEDIAM Group. *Ophthalmology*. 106(9) : 1821-7.
55. MASSIN P, DUBOIS-LAFORGUE D *et* MEAS T. 2008. GEDIAM (Mitochondrial Diabetes French Study Group): Retinal and renal complications in patients with a mutation of mitochondrial DNA at position 3,243 (maternally inherited diabetes and deafness) : A case-control study. *Diabetologia*. 51(9) : 1664-70
56. MASSON L F, SHARP L, COTTON S C *et al.* 2005. Cytochrome P-4501A1 gene polymorphisms and risk of breast cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*. 161 : 901- 915.
57. MAY-PANLOUP P, CHRÉTIEN M F, MALTHIÈRY Y *et al.* 2004. Mitochondries et reproduction. *Médecine/Sciences*. 20 : 779-83.
58. NARBONNE H, PAQUIS-FLUCKINGER V, VALERO R *et al.* 2004. Gastrointestinal tract symptoms in Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD). *Diabetes & Metabolism*. 30 : 61-6.

59. **OMS : Organisation Mondiale de la Santé.** 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Report of a WHO consultation. Geneva.* 59 pWHO/NCD/NCS/99. 2 : 1-49.
60. **OMS : Organisation Mondiale de la Santé.** Janvier 2011. Aide-mémoire n° 312. *Diabète en ligne.* OMS-Centre des média. Disponible sur l'adresse web : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/> (Page consultée le 30/05/2017).
61. **ORTIZ DE MONTELLANO P R.** 2004. Human Cytochrome P450 Enzymes : Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry. 3^{ième} édition. *Springer-Verlag, New York.* 689p. ISBN: 0-3064-8324-6.
62. **PATTERSON M et CARDON L.** 2005. Replication publication. *PLoS One.* 3(9) : e327.
63. **RACCAH D.** 2004. Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale-Endocrinologie.* 1 : 29-42.
64. **RAZA H, PRABU S K, ROBIN M A et al.** 2004. Elevated Mitochondrial Cytochrome P450 2E1 and Glutathione S-Transferase A4-4 in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Tissue Specific Variations and Roles in Oxidative Stress. *Diabetes.* 53 : 185-94.
65. **REARDON W, ROSS R J, SWEENEY M G et al.** 1992. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet.* 340 : 1376-9.
66. **ROBIN M A.** 2005. Implications physiopathologiques des cytochromes P450. *Hépatogastro-Entérologie.* 12(4).
67. **RODIER M.** 2001. Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique.* 25 (2) : 5-18.
68. **RÖTIG A et MUNNICH A.** 2003. Genetic Features of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders. *Journal of the American Society of Nephrology.* 14(12) : 2995-3007.
69. **RUIZ-PESINI E, DIEZ-SANCHEZ C, LOPEZ-PEREZ M J et al.** 2007. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process ?. *Current Medicinal Chemistry.* 77 : 3-19.
70. **SAKER P J, HATTERSLEY A T, BARROW B et al.** 1997. UKPDS 21: Low prevalence of the mitochondrial transfer RNA gene [tRNA^{Leu}(UUR)] mutation at position 3243bp in UK Caucasian type 2 diabetic patients. *Diabetes Medicine.* 14:42-5.
71. **SCHEFFLER I.** 2008. Mitochondria. *John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, États-Unis.* 462p. ISBN : 0-4712-2389-1.
72. **SMITH P R, BAIN S C, GOOD P A et al.** 1999. Pigmentary retinal dystrophy and the syndrome of maternally inherited diabetes and deafness caused by the mitochondrial DNA 3243 tRNA(Leu) A to G mutation. *Ophthalmol.* 106 : 1101-8.

73. **STEFFANN J.** 2006. Étude de la ségrégation de l'ADN mitochondrial au cours du développement embry-foetal humain. *Thèse en ligne : Université Paris 5 René Descartes*. Pagination multiple.
74. **SUZUKI S, OKA Y, KADOWAKI T et al.** 2003. Clinical features of diabetes mellitus with the mitochondrial DNA 3243 (A-G) mutation in Japanese: maternal inheritance and complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 59 : 207-17.
75. **THEVÈS C.** 2006. Recherche de mutations ponctuelles de l'ADN mitochondrial dans l'os pour une détermination de l'âge. *Thèse en ligne : École des hautes études en sciences sociales (EHESS)*. Pagination multiple.
76. **TIMSIT J, CARETTE C, SAINT-MARTIN C et al.** 2009. Quand et pourquoi rechercher un diabète monogénique ?. *Médecine des maladies Métaboliques*. 3(4) : 448-453.
77. **TURRENS J F.** 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 552 : 335-344.
78. **VAN DEN OUWELAND J M, LEMKES H H, RUITENBEEK W et al.** 1992. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genetics*. 1: 368-371.
79. **VELHO G, BYRNE MM, CLEMENT K et al.** 1996. Clinical phenotypes, insulin secretion, and insulin sensitivity in kindreds with maternally inherited diabetes and deafness due to mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. *Diabetes*. 45 : 478-487.
80. **VIONNET N, PASSA P ET FROGUEL P.** 1993. Prevalence of mitochondrial gene mutations in families with diabetes mellitus. *Lancet*. 342 : 1429-1430.
81. **WALLACE D C.** 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annual Review of Biochemistry*. 76 : 781-821.
82. **WHITING D R, GUARIGUATA L, WEIL C et al.** 2011. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 94 : 311-321.
83. **WILLIAMS J A, MARTIN F L, MUIR G H et al.** 2000. Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue. *Carcinogenesis*. 21(9) : 1683-9.
84. **WINTER W E, NAKAMURA M et HOUSE D V.** 1999. Monogenic diabetes mellitus in youth. The MODY syndromes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 28: 765-785.

Annexes



Questionnaire dans le cadre de réalisation d'un mémoire de Master en Génétique Moléculaire au titre de l'année universitaire 2016-2017 et intitulé :

Diabète mitochondrial

Identification :

Nom : Prénom : Age :

Date de naissance : Sexe :

PRÉREQUIS A TOUTE DEMANDE :

- Absence d'anticorps chez le patient |__|
- Histoire familiale de diabète : Transmission maternelle exclusive |__|
Au moins 1 sujet dans la famille présente un diabète et une surdité |__|
- Le patient est il ? Diabétique |__| Non diabétique |__|

Données au diagnostic :

- Circonstances de découverte du diabète : Examen systématique |__| Diabète gestationnel
Polyurie |__| Surdité |__| Cétose |__|
Complication |__| Acido-cétose |__|
- Age à la découverte du diabète :
- Poids : Taille : IMC (Kg/m²)
- Glycémie (g/l mmol/l [entourer l'unité]): HbA1c (%) :
- Traitement initial du diabète : Régime seul |__| Antidiabétiques oraux |__| Insuline |__|

Données au dernier bilan :

- Poids : Taille : IMC (Kg/m²) : HbA1c (%) :
- Traitement actuel du diabète : Régime seul |__| Antidiabétiques oraux |__| Insuline |__|
- Complications : Rétinopathie |__| Néphropathie |__| Insuffisance rénale |__|
- Atteintes associées : Surdité |__| Dystrophie maculaire réticulée |__| Cardiomyopathie |__|
Atteinte musculaire ou neurologique |__|

ANTÉCÉDENTS FAMILIAUX : Joindre un arbre généalogique en indiquant :

- Le patient (♂) et les apparentés atteints (noter si possible les noms et prénoms).
- Pour les apparentés diabétiques : l'âge au diagnostic du diabète, le traitement actuel et les autres atteintes en relation avec la pathologie (surdité, ...).

Consentement pour utilisation de données biologiques.

MESSIKH Faiza et NESSAIB Imène

Étudiants en Master 2 Génétique Moléculaire

Département de Biologie Animale - Faculté SNV

Université des frères Mentouri - Constantine I

Tel : 031 81 82 49 / Courriel : rezgoune.mohamed.larbi@umc.edu.dz

Je soussigné(e) : né(e) le/...../..... à

Certifie avoir reçu de **Melle MESSIKH Faiza et Melle NESSAIB Imène** une information exhaustive et compréhensible concernant mon problème de santé et le but de cette étude. J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais.

J'ai compris qu'une analyse génétique m'est proposée à partir d'un prélèvement sanguin duquel mon ADN sera extrait. Cette analyse a pour but de déterminer si mon génome présente une anomalie ou une variation en rapport avec mon problème de santé. J'ai bien compris les implications possibles de cette étude et je pourrai obtenir, si je le souhaitais, toute information complémentaire. Les résultats de ces analyses me seront transmis si je le désire. Ils resteront confidentiels et ne pourront être communiqués qu'avec mon autorisation exclusive. Je peux à tout moment décider de ne pas poursuivre cette démarche. Les données génétiques et le matériel biologique me concernant pourront être détruits à ma demande.

J'accepte que mes échantillons biologiques soient conservés et utilisés à des fins de recherche médicale et/ou biologique sans restriction sous couvert d'anonymat.

Fait à le/...../.....

Signature de l'intéressée

Signature du chercheur

Consentement établi selon la déclaration d'Helsinki : Principes éthiques applicables aux recherches médicales sur des sujets humains. 1964.

En accord avec les recommandations du conseil national de l'éthique des sciences de la santé Algérien.

Annexe II

Composition des solutions tampons utilisées pour l'extraction d'ADN

1- Réparation des solutions utilisées pour l'extraction d'ADN.

TE 20:5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5) auto clavé :

- Tris : 2,422 g/l
- EDTA : 1,86 g/l
- Ajuster le pH avec HCL 1 N

Tampon de lyse :

- NaCl 400 mM
- EDTA 2 mM
- Tris 10 mM
- pH 8,2

2- Préparation du TBE 10X et 1X.

TBE 10X :

- Tris 108 g
- Acide borique 55 g
- Ajuster le PH à 8,3 avec l'acide acétique glacial
- EDTA 9.3 g
- QSP H₂O pour 1L

TBE 1X :

- 100 ml de TBE 10X
- 900 ml H₂O

Composition du mélange de la digestion

Mix	Vol (µl)/tube de digestion
Produit de PCR	30
H ₂ O	4
Tampon Enzyme 10X	5
Enzyme de restriction <i>HpaII</i>	1
BSA	0,2

Annexe III

Caractéristiques des marqueurs de taille utilisés pour visualiser les fragments d'amplification et/ou de restriction des gènes étudiés

(<https://lifescience.roche.com>) (Mise à jour Novembre 2015) (Consulté le 08-06-2017).

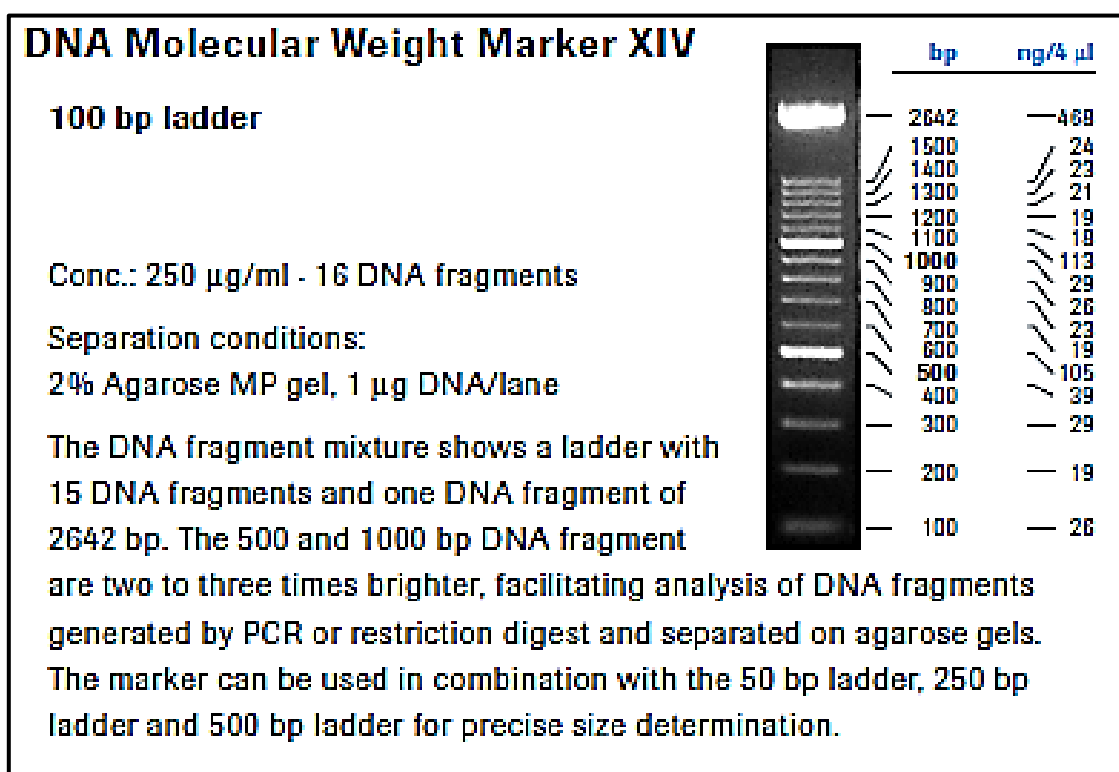


Figure : Caractéristiques du marqueur de taille (Mar XIV de 100pb) utilisé pour visualiser les produits de digestion de la région 3' non codante du *CYP11A1*.

Résumés

Genetic diseases with a mitochondrial component: the example of mitochondrial diabetes Involvement of *CY1A1* gene polymorphism

Abstract:

Diabetes is a metabolic disease, which results from an imbalance of the sugar content in the blood. Among all the types of diabetes, only about 1 to 2% is said "mitochondrial" diabetes. When we speak about genetic diseases, we think generally of the abnormalities of the nuclear genome that is of genes carried by our chromosomes. However, our cells contain a second genome, much smaller (16569 pairs of bases), which is contained in mitochondria. The mitochondrial genome carries around thirty genes. Changes affecting this genome are responsible for genetic diseases called mitochondrial, which certain types of diabetes are a member. The mitochondrial diseases include very variously diseases, with an extremely heterogeneous clinical portrait, in touch with a disorder of respiratory mitochondrial channel. This disorder can be secondary in a mutation of the mtDNA or genomic DNA.

The mitochondrial diabetes has a very low incidence of survey; add to this the fact that this pathology is of recent knowledge, still badly diagnosed in Algeria. Indeed, the medicines know little these clinical syndromes. Furthermore, the variability of their expression within of the same family member complicates the diagnosis (phenomenon of heteroplasmy). The mutation 3243A > G of the Mitochondrial DNA, the first one to be identified in this context, is responsible for the MIDD (Maternally Inherited Diabetes and Deafness), the most frequent of mitochondrial diabetes. This rare clinical entity requires early management to prevent these multiple complications. Algeria is often misdiagnosed because of its infrequent occurrence and recent knowledge. Often diabetes specialists have little knowledge of these clinical syndromes

In order to confirm the achievement the realization of family trees is necessary to highlight the maternal transmission. However, the variability of their expression within member of the same family complicates the diagnosis. The molecular analysis of the mitochondrial genome and the search for characteristic mutations is aimed at confirming the clinical diagnosis in a patient whose suggestive phenotype of the disease. The identification of a mutation of the mtDNA makes it possible to deduce the risk of maternal transmission and to propose a genetic diagnosis to the relatives.

Keywords: mitochondrial diabetes, genetic, molecular biology.

الأمراض الوراثية ذات العنصر الميتوكوندري على سبيل المثال مرض السكري الميتوكوندري مشاركة تعدد الأشكال من الجين *CYP11A1*

الملخص :

السكري هو مرض ابيض (اضطراب في التمثيل الغذائي) ناجم عن اختلال في تنظيم معدل السكر في الدم. من يمثل نسبة 1 إلى 2 % فقط. الميتوكوندري السكري بين جميع أنواع السكري هناك نوع يدعى عندما نتحدث عن الأمراض الوراثية، نعتقد عموما أن هناك تشوه في الجينوم النووي، أي في المورثات التي تحملها صبغياتنا. غير أن خاليانا تحتوي على جينوم ثانوي أقل بكثير من الجينوم النووي (16569 زوج من القواعد) يوجد في عضيات صغيرة متمثلة في الميتوكوندري. جينوم الميتوكوندري يحمل حوالي ثلاثين مورثة. الطفرات التي تؤثر على الجينوم هي المسؤولة عن الأمراض الوراثية المعروفة باسم الميتوكوندري، بما في ذلك أنواع معينة من مرض السكري. أمراض الميتوكوندري أو mitochondriopathies تشكل معا مجموعة متباينة من الأمراض تتميز بمظهر سريري إلى حد بعيد غير متجانس وهي ذات صلة باضطراب السلسلة التنفسية في الميتوكوندري. وهذا الاضطراب قد يكون سببا ثانويا في حدوث طفرات في ADN النواة أو ADN الميتوكوندري. سكري الميتوكوندري هو انجاز نادر تم التعرف عليه مؤخرا حيث ال يزال تشخيصه أمر صعب في الجزائر. وفي الواقع أن الباحثين عنه لديهم معرفة قليلة لهذا النوع من المتلازمات السريرية. إضافة إلى ذلك، فإن التباين في التعبير عنها ضمن أفراد من أسرة واحدة يعقد التشخيص (ظاهرة البلازمية غير المتجانسة) وفي هذا الإطار الطفرة الأولى من نوع $G > A3243$ في الحمض النووي الميتوكوندري ADNmt اكتشف أنها مسؤولة عن MIDD أي (السكري والصمم الموروثة عن الأم)، وهو السم الأول الذي أطلق على هذا المرض والشكل الأكثر شيوعا من داء سكري الميتوكوندري. يتطلب هذا المرض النادر العلاج المبكر لمنع المضاعفات المتعددة. بسبب انه نادر، عرف في الآونة الأخيرة، فإنه غالبا ما يشخص بالخطأ في الجزائر هذا بسبب انه غير مألوف بين الأطباء المتخصصين.

للتأكد تحقيق شجرة العائلة هو ضروري لتسليط الضوء على انتقال من الأم. ومع ذلك، فإن تنوع الإبداء في الأفراد من نفس العائلة يعقد التشخيص. التحليل الجزيئي للجينوم الميتوكوندري والبحث عن طفرات مميزة لتأكيد التشخيص السريري الذي يوحى للمرض. تحديد طفرة في الحمض النووي الميتوكوندري يسمح للاستدلال على خطر انتقال (الأم) واقتراح التشخيص الوراثي لذات الصلة.

الكلمات المفتاحية: مرض السكري الميتوكوندري، علم الوراثة، البيولوجيا الجزيئية.

Année universitaire : 2016 - 2017

Présenté par : MESSIKH Faiza et NESSAIB Imène

Les maladies génétiques à composante mitochondriale : l'exemple du diabète mitochondrial Implication du polymorphisme du gène *CY11A1*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire

Le diabète sucré, défini par une hyperglycémie chronique, est une pathologie complexe de prévalence croissante dans le monde. L'importance de cette maladie se mesure en partie par le nombre de sujets atteints, mais surtout par le coût économique et social qu'elle entraîne. Le diabète sucré englobe de nombreuses entités cliniques parmi lesquelles, seuls 1 à 2 % sont des diabètes dits « mitochondriaux ». Quand on parle de maladies génétiques, on pense généralement aux anomalies du génome nucléaire. Nos cellules comportent cependant un second génome, beaucoup plus petit (de 16569 paires de bases), localisé dans les mitochondries et portant une trentaine de gènes. Des mutations affectant ce génome sont responsables de maladies génétiques dites mitochondriales, dont certains types de diabètes font partie. Les mitochondriopathies regroupent un ensemble disparate de maladies, avec un tableau clinique extrêmement hétérogène, en rapport avec un trouble de chaîne respiratoire.

Le diabète mitochondrial, par mutation ou délétion de l'ADNmt, est caractérisé par une transmission maternelle et un phénotype évocateur : indice de masse corporelle bas, petite taille, atteintes extra-pancréatiques (surdité neurosensorielle, dystrophie maculaire réticulée, atteintes neurologiques et musculaires, cardiomyopathie). Le diabète se présente cliniquement comme un type 1 ou un type 2 (80 % des cas), et est lié à un déficit primitif de l'insulino-sécrétion secondaire à la dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale. La rétinopathie diabétique y est moins fréquente que dans les formes habituelles de diabète du fait d'une moindre hyperglycémie et d'une plus faible fréquence de l'hypertension artérielle. Une néphropathie mitochondriale spécifique, de pronostic sévère, est présente. Le MIDD, par mutation A3243G, est la forme la plus fréquemment rencontrée. Cependant, près de 20 mutations et des délétions de l'ADNmt, responsables de phénotypes comportant inconstamment un diabète, ont été rapportées à ce jour. Cette entité clinique rare nécessite une prise en charge précoce pour prévenir ces complications multiples. Du fait qu'il s'agit d'une atteinte peu fréquente, de connaissance récente, il est souvent mal diagnostiqué en Algérie. En effet, les praticiens connaissent peu ces syndromes cliniques.

Afin de confirmer l'atteinte la réalisation d'arbres généalogiques est nécessaire pour mettre en évidence la transmission maternelle. Cependant, la variabilité de leur expression au sein des individus d'une même famille complique le diagnostic. L'analyse moléculaire du génome mitochondrial et la recherche des mutations caractéristiques a pour but de confirmer le diagnostic clinique chez un patient dont le phénotype est évocateur de la maladie. L'identification d'une mutation de l'ADNmt permet de déduire le risque de transmission (maternelle) et de proposer un diagnostic génétique aux apparentés.

Mots-clefs : diabète mitochondrial, génétique, biologie moléculaire.

Laboratoires de recherche : Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC).

Président du jury : Dr CHAOUI Naouel (MC.A - UFM Constantine I).

Rapporteur : Dr REZGOUNE Mohamed Larbi (MC.B - UFM Constantine I).

Examineur : Melle BENLATRECHE Moufida (MA.A - UFM Constantine I).