

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**

**Université Constantine1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biochimie, Biologie moléculaire et Cellulaire**

N° d'ordre : .....

N° de série : .....

## MEMOIRE

*En vue de l'obtention du*

**DIPLOME DE MASTER 2**

*Spécialité : Biochimie*

*Option : Biochimie Moléculaire et Santé*



Présenté par :

**CHABI Wafa**

Sujet de recherche

**Exploration du protéome salivaire des femmes enceintes  
atteintes de diabète gestationnel**

Soutenu le .../06/2014, devant le jury ci-dessous

**Président :** Mr. KHELIFI Douadi

Prof. Université Constantine 1

**Encadreur :** Melle BELLIL Inès

MAB. Université Constantine 1

**Examineur :** Mr BENSEGUENI Abderrahmane

Prof. Université Constantine 1

**Examineur :** Mr GRAMA Maamar

MAA. Université Constantine 1

Année universitaire : 2013-2014

Noms: <b>CHABI</b> Prénoms: <b>Wafa</b>	Date de soutenance: .../ <b>06 / 2014</b>
Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de <b>MASTER 2</b> en Biochimie <i>Option : Biochimie Moléculaire et Santé</i>	
<b>Exploration du protéome salivaire des femmes enceintes atteintes de diabète gestationnel</b>	
<p>Les biomarqueurs protéiques sont et depuis longtemps les plus utilisés comme outil biologique permettant de distinguer un état médical normal d'un état pathologique. Plus d'un tiers des protéines de la salive se trouvent également dans le sang et dont le rôle a déjà été établi dans de nombreuses maladies tel que le diabète gestationnel qui est devenu un vrai problème de santé publique. Il est bien connu pour son influence sur le flux salivaire ou encore sur la composition protéique de la salive. Afin de détecter un biomarqueur salivaire de cette pathologie, une population de femmes enceintes diabétiques (n=17), âgées de 26 ans à 43 ans, a été recrutée pour un prélèvement salivaire. Nous avons comparé les profils obtenus par électrophorèse monodimensionnelle des protéines salivaires de sujet sain, deux femmes enceintes non diabétiques et de patientes atteintes du diabète gestationnel. Les protéines salivaires sont extraites dans quatre conditions différentes et séparées par SDS/PAGE et PAGE 8.8.</p> <p>L'analyse des gels a permis de dénombrer 31 bandes protéiques de mobilité différentes dans les conditions dénaturantes réductrices, 25 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions non dénaturantes non réductrices, 21 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions non dénaturantes réductrices et 16 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes non réductrices.</p> <p>Cette étude nous a permis de mettre en évidence environ 24 bandes protéiques d'intérêt communes entre les différents échantillons, B8, B9, B14, B15 et B17 (conditions dénaturantes réductrices), B1, B5, B6, B9, B11, B18 et B19 (conditions non dénaturantes non réductrices), B2, B4, B9, B12, B16 et B19 (conditions non dénaturantes réductrices) et B1, B3, B6, B7, B9 et B13 (conditions dénaturante non réductrices), présentant des variations qualitatives et quantitatives d'expression dans le milieu salivaire.</p> <p>Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des diagrammes types et une classification hiérarchique des individus selon la composition des protéines salivaires.</p> <p>Ces résultats préliminaires de mise en évidence de protéines salivaires spécifiques et ou variantes au cours du diabète gestationnel susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de la pathologie étudiée, ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic (mise en évidence éventuelle de biomarqueurs) que dans le suivi de ces pathologies.</p>	
<b>Mots clés</b> : biomarqueurs, diabète gestationnel, salive, électrophorèse, diagnostic	
<b>Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1</b>	
<b>Jury de soutenance</b>	
<b>Président</b> : Mr. KHELIFI Douadi	Prof. Université Constantine 1
<b>Encadreur</b> : Melle BELLIL Inès	MAB. Université Constantine 1
<b>Examineur</b> : Mr BENSEGUENI Abderrahmane	Prof. Université Constantine 1
<b>Examineur</b> : Mr GRAMA Maamar	MAA. Université Constantine 1
Année universitaire <b>2013-2014</b>	



## REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Khelifi Douadi,

Vous m'avez ouvert les portes de votre laboratoire pour effectuer ce travail.

Vous me faites également l'honneur de participer à ce jury.

Je vous en remercie et vous en suis pleinement reconnaissante.

A Mademoiselle le Docteur Bellil Ines,

Vous avez grandement collaboré à ce travail.

Je vous remercie de votre aide précieuse.

Qu'il me soit permis de vous exprimer ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Bensegueni Abderahmane et Grama Maamar,

Vous me faites l'honneur d'être les examinateurs du jury de ce mémoire.

Je vous remercie de l'intérêt que vous apportez à ce travail.

Je vous prie de trouver ici l'assurance de ma considération la plus respectueuse.

A Mesdemoiselles les Doctorantes Medouri Asma et Medoukali Imane,

Je vous remercie pour votre aide, vos précieux conseils et votre disponibilité au laboratoire.

A Mesdames les Sage Femmes Bouarroj Dounia et Zegrou Hayet,

Je vous remercie pour votre coopération et implication qui m'a facilité la tâche au sein du service de Gynécologie du CHU de Constantine.

## DEDICACE

*A toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.*

*Tout particulièrement à ma petite famille, mes très chers parents, mon frère et mes sœurs: pour votre soutien quotidien sans faille, vos conseils, votre aide précieuse tout le long de mes études, votre amour et votre compréhension, vos encouragements qui m'ont amené là où je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir tant donné.*

*Et à tous ceux qui me sont chers...*

## ABREVIATIONS

<b>AGLC</b>	Acide Gras à Longue Chaîne
<b>APS</b>	Ammonium Per-Sulfate
<b>AUDIPOG</b>	Association des Utilisateurs de Dossiers Informatisés en Pédiatrie, Obstétrique et Gynécologie
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>FPM</b>	Faible Poids Moléculaire
<b>HGPO</b>	Hyperglycémie Provoquée par voie Orale
<b>HPL</b>	Hormone Lactogène Placentaire
<b>HPM</b>	Haut Poids Moléculaire
<b>HTA</b>	Hypertension Artérielle
<b>IAS</b>	Indice Absolu de Similarité
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IMC</b>	Indice de Masse Corporelle
<b>IOS</b>	Organisation Internationale pour la Standardisation
<b>IRS</b>	Indice Relatif de Similarité
<b>NGF</b>	Nerv Growth Factor
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gel Electrophoresis
<b>qsp</b>	quantité suffisante pour
<b>SA</b>	Semaine d'Aménorrhée
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>TCA</b>	Trichloracétique Acide
<b>TEMED</b>	Tétra Méthyl-Ethylène-Diamine

Les biomarqueurs protéiques sont et depuis longtemps les plus utilisés comme outil biologique permettant de distinguer un état médical normal d'un état pathologique. Plus d'un tiers des protéines de la salive se trouvent également dans le sang et dont le rôle a déjà été établi dans de nombreuses maladies tel que le diabète gestationnel qui est devenu un vrai problème de santé publique. Il est bien connu pour son influence sur le flux salivaire ou encore sur la composition protéique de la salive. Afin de détecter un biomarqueur salivaire de cette pathologie, une population de femmes enceintes diabétiques (n=17), âgées de 26 ans à 43 ans, a été recrutée pour un prélèvement salivaire. Nous avons comparé les profils obtenus par électrophorèse monodimensionnelle des protéines salivaires de sujet sain, deux femmes enceintes non diabétiques et de patientes atteintes du diabète gestationnel. Les protéines salivaires sont extraites dans quatre conditions différentes et séparées par SDS/PAGE et PAGE 8.8.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 31 bandes protéiques de mobilité différentes dans les conditions dénaturantes réductrices, 25 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions non dénaturantes non réductrices, 21 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions non dénaturantes réductrices et 16 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes non réductrices.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence environ 24 bandes protéiques d'intérêt communes entre les différents échantillons, B8, B9, B14, B15 et B17 (conditions dénaturantes réductrices), B1, B5, B6, B9, B11, B18 et B19 (conditions non dénaturantes non réductrices), B2, B4, B9, B12, B16 et B19 (conditions non dénaturantes réductrices) et B1, B3, B6, B7, B9 et B13 (conditions dénaturante non réductrices), présentant des variations qualitatives et quantitatives d'expression dans le milieu salivaire.

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des diagrammes types et une classification hiérarchique des individus selon la composition des protéines salivaires.

Ces résultats préliminaires de mise en évidence de protéines salivaires spécifiques et ou variantes au cours du diabète gestationnel susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de la pathologie étudiée, ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic (mise en évidence éventuelle de biomarqueurs) que dans le suivi de ces pathologies.

**Mots clés:** diabète gestationnel, salive, biomarqueurs, diagnostic, protéome.





Protein biomarkers are and for a long time the most used as a biological tool allowing distinguishing a normal medical state of a pathological state. More than a third of saliva proteins are also found in the blood and whose role has already been established in many diseases such as the gestational diabetes which has become a real public health problem. It is well known for its influence on salivary flow or on the protein composition of saliva.

To detect a salivary biomarker of this pathology, a population of pregnant women with diabetes (n = 17), olden from 26 years to 43 years, was recruited for a saliva sample (a salivary taking). We compared the profiles obtained by monodimensional electrophoresis of salivary proteins of a healthy subject, two non-diabetic pregnant women and patients with gestational diabetes. Salivary proteins were extracted in four different conditions and separated by SDS / PAGE and 8.8 PAGE.

The analysis of the gels allowed to count 31 protein bands of different mobilities in reducing denaturing conditions, 25 protein bands of different mobilities in non-reducing non-denaturing conditions , 21 protein bands of different mobilities in reducing non-denaturing conditions and 16 bands protein of different mobilities in non-reducing denaturing conditions. This study allowed us to identify about 24 common protein bands of interest between the different samples , B8, B9, B14 , B15 and B17 ( reducing denaturing conditions ); B1, B5 , B6, B9, B11, B18 and B19 ( non-reducing non-denaturing conditions); B2 , B4, B9 , B12,B16 and B19 ( reducing non-denaturing conditions); B1, B3, B6, B7, B9 and B13 ( non-reducing denaturing conditions), presenting qualitative and quantitative variations of expression in the salivary environment.

To appreciate numerically the diversity of these salivary proteins, a statistical study was performed by calculating the frequencies, the index of similarity, also by establishing typical diagrams and a hierarchical classification of individuals according to the composition of salivary proteins.

These preliminary results of highlighting of specific salivary proteins or variants during the gestational diabetes, susceptible to be considered as markers of the disease in question (studied pathology), open new fields of investigation both in the field of diagnosis (highlighted possible of biomarkers ) in the follow up of these pathologies.

**Key words:** Gestational diabetes, saliva, biomarkers, diagnostic, proteome.

تعتبر المؤشرات الحيوية البروتينية الأكثر استخداماً كأداة بيولوجية للتمييز بين الحالة الصحية الطبيعية و المرضية. تم العثور على أكثر من ثلث البروتينات اللعاب أيضاً في الدم و التي تم تحديد دورها في العديد من الأمراض مثل داء السكري الحملي الذي أصبح مشكلة صحية عامة. فمن المعروف عن تأثيره على تدفق اللعاب أو على تكوين البروتين في اللعاب. للكشف عن العلامات البيولوجية اللعابية من هذا المرض، عدد النساء الحوامل يعانين من مرض السكري (17)، البالغات من العمر 26 عاماً إلى 43 عاماً، تم تعيينهم لتحليل اللعاب.

قمنا بمقارنة الاوضاع المتحصل عليها بواسطة الهجرة الكهربائية ذات البعد الواحد من البروتينات اللعابية لاشخاص اصحاء و اشخاص مرضى يعانون من هذا المرض، تم استخراج البروتينات اللعابية في أربع شروط مختلفة و تم فصلها بواسطة SDS/PAGE و PAGE 8.8. تحليل المواد الهلامية سمح بحساب 31 شريط بروتيني ذوي هجرات مختلفة في شروط لا طبيعية و مرجعة، 25 شريط بروتيني مع هجرات مختلفة في شروط طبيعية و غير مرجعة، 21 شريط بروتيني مع هجرات مختلفة و في شروط طبيعية و مرجعة، و 16 شريط بروتيني مع هجرات مختلفة في شروط لا طبيعية و غير مرجعة.

سمحت لنا هذه الدراسة إلى تحديد حوالي 24 شريط بروتيني ذو أهمية مشتركة بين عينات مختلفة، B8، B9، B14، B15 و B17 في شروط لا طبيعية و مرجعة، B1، B5، B6، B9، B11، B18 و B19 في شروط طبيعية و غير مرجعة، B2، B4، B9، B12، B16 و B19 في شروط طبيعية و مرجعة، B1، B3، B6، B7، B9، B13 لا طبيعية و غير مرجعة، مع وجود اختلافات نوعية و كمية التعبير في الوسط اللعابي. لتقييم تنوع هذه البروتينات اللعابية عددياً، تم إجراء دراسة إحصائية عن طريق حساب الترددات، مؤشر التشابه، و أيضاً في إنشاء المخططات القياسية و التصنيف الهرمي للأفراد عن طريق تكوين بروتينات اللعاب

. هذه النتائج الأولية تسلط الضوء على البروتينات اللعابية المحددة او المتغيرة في داء السكري الحملي و التي قد تعتبر كمؤشرات حيوية للمرض المدروس، و تفتح نطاقات جديدة للبحث في مجال التشخيص (تسليط الضوء على العلامات البيولوجية المحتملة) و في تتبع هذه الامراض.

**الكلمات المفتاحية:** سكري الحمل، اللعاب، المؤشرات الحيوية، التشخيص، بروتينوم.

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : revue bibliographique.....	3
<b>I. Le diabète gestationnel.....</b>	<b>3</b>
1. Définition.....	3
2. Prévalence ou épidémiologie.....	3
3. Facteurs de risques.....	3
3.1. Fort impact.....	4
3.2. Moindre impact.....	4
4. Dépistage et diagnostic.....	4
4.1. Premier temps : le dépistage par le test de O'Sullivan.....	5
4.2. Deuxième temps: le diagnostic par HGPO.....	5
5. Physiopathologie.....	5
5.1. Physiologie de la grossesse normale.....	5
5.2. Physiopathologie du diabète gestationnel.....	6
5.3. Facteurs de régulation.....	6
6. Conséquences ou complications.....	7
6.1. Conséquences fœtales et néonatales.....	7
6.2. Conséquences maternelles.....	8
<b>II. Salive et glandes salivaires.....</b>	<b>8</b>
1. La salive.....	8
1.1. Définition.....	8
1.2. Composition biochimique de la salive.....	9
1.2.1. Eau.....	9
1.2.2. Constituants inorganiques.....	9
1.2.3. Protéines salivaires.....	9
1.2.4. Autres constituants organiques.....	10
1.3. Caractéristiques physico-chimiques de la salive.....	10
1.3.1. Le volume.....	10
1.3.2. La viscosité.....	11
1.3.3. Le pH.....	11
1.3.4. Le pouvoir tampon.....	11
1.3.5. Le débit salivaire.....	11
1.4. Mécanisme formation de la salive.....	11
1.4.1. Formation de la salive primaire.....	11
1.4.2. Modification en salive définitive.....	11
1.5. Rôle de la salive.....	12
1.5.1. Fonction digestive.....	12
1.5.2. Fonction de protection.....	12
1.5.3. Fonction de cicatrisation.....	12
2. Les glandes salivaires.....	12
2.1. Les glandes salivaires principales.....	12
1.1.1. La glande parotide.....	12
1.1.2. La glande sous-maxillaire.....	13
1.1.3. La glande sublinguale.....	13

2.2. Les glandes salivaires accessoires.....	13
<b>III. Les biomarqueurs.....</b>	<b>13</b>
1. Définition .....	13
2. Identification et validation d'un biomarqueur.....	14
2.1. Identification.....	14
2.2. Validation.....	14
<b>IV. Relation entre diabète gestationnel, salive et biomarqueurs.....</b>	<b>14</b>
<hr/>	
<b>Chapitre 2 : matériel et méthodes.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Matériel.....</b>	<b>16</b>
1.1. Recrutement des patients.....	16
1.2. Recueil de la salive.....	16
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>16</b>
2.1. Extraction des protéines salivaires.....	16
2.1.1. Dans des conditions dénaturantes et réductrices.....	16
2.1.2. Dans des conditions dénaturantes et non réductrices.....	17
2.1.3. Dans des conditions non dénaturantes et réductrices.....	17
2.1.4. Dans des conditions non dénaturantes et non réductrices.....	17
2.2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide.....	17
2.3. Lecture des électrophoregrammes.....	18
2.4. Analyse statistique.....	18
<hr/>	
<b>Chapitre 3 : résultats et discussion.....</b>	<b>19</b>
<b>1. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs.....</b>	<b>19</b>
1.1. Analyse des profils électrophorétiques.....	19
1.1.1. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices.....	19
1.1.2. Analyse des protéines salivaires fractionnées par PAGE dans les conditions non dénaturantes et non réductrices.....	21
1.1.3. Analyse des protéines salivaires fractionnées par PAGE dans les conditions non dénaturantes et réductrices.....	23
1.1.4. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes et non réductrices.....	26
<b>2. Etude de la variabilité des protéines salivaires.....</b>	<b>28</b>
2.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et réduites .....	28
2.1.1. Etude des protéines salivaires de HPM.....	28
2.1.2. Etude des protéines salivaires de FPM.....	28
2.2. Etude de la variabilité des protéines salivaires non dénaturées non réduites.....	30
2.2.1. Etude des protéines salivaires de HPM.....	30
2.2.2. Etude des protéines salivaires de FPM.....	31
2.3. Etude de la variabilité des protéines salivaires non dénaturées et réduites.....	32
2.3.1. Etude des protéines salivaires de HPM.....	32

2.3.2. Etude des protéines salivaires de FPM.....	32
2.4. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et non réduites.....	33
2.4.1. Etude des protéines salivaires de HPM.....	33
2.4.2. Etude des protéines salivaires de FPM.....	34
<b>3. Classification hiérarchique des protéines salivaires.....</b>	<b>35</b>
3.1. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	35
3.2. Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites.....	37
3.3. Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturantes réduites.....	38
3.4. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturantes et réduites.....	40
<b>4. Etablissement des diagrammes types.....</b>	<b>41</b>
<b>5. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons.....</b>	<b>45</b>
5.1. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites .....	45
5.2. Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées et non réduites.....	46
5.3. Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées et réduites .....	47
5.4. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites .....	49
<b>6. Conséquence du diabète gestationnel sur le protéome salivaire.....</b>	<b>50</b>
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>53</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>57</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>60</b>

## TABLE DES FIGURES

### CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Figure 1:</b> évolution du métabolisme pendant la grossesse.....	5
<b>Figure 2:</b> conséquence de l'insulinosécrétion et/ou exagération de l'insulinorésistance.....	6
<b>Figure 3:</b> conséquences du diabète gestationnel .....	7
<b>Figure 4:</b> localisation des trois paires de glandes salivaires.....	11
<b>Figure 5:</b> formation de la salive primaire.....	12
<b>Figure 6:</b> mécanisme de formation de la salive définitive.....	12

### CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

<b>Figure 7:</b> profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE .....	20
<b>Figure 8:</b> profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices révélées par PAGE .....	22
<b>Figure 9:</b> profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et réductrices révélées par PAGE .....	24
<b>Figure 10:</b> profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE.....	27
<b>Figure 11:</b> dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices fractionnés par SDS/PAGE.....	36
<b>Figure 12:</b> dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions non dénaturantes et non réductrices fractionnés par PAGE.....	37
<b>Figure 13:</b> dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions non dénaturantes et réductrices fractionnés par PAGE.....	39
<b>Figure 14:</b> dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et non réductrices fractionnés par SDS/PAGE.....	40

## TABLE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Tableau 1</b> :concentration ionique de la salive en mEq/L.....	9
--	---

### CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

<b>Tableau 2</b> :variabilité des protéines salivaires de HPM.....	28
<b>Tableau 3</b> :variabilité des protéines salivaires de FPM.....	29
<b>Tableau 4</b> :variabilité des protéines salivaires de HPM.....	30
<b>Tableau 5</b> : variabilité des protéines salivaires de FPM.....	31
<b>Tableau 6</b> : variabilité des protéines salivaires de HPM.....	32
<b>Tableau 7</b> : variabilité des protéines salivaires de FPM.....	33
<b>Tableau 8</b> : variabilité des protéines salivaires de HPM.....	33
<b>Tableau 9</b> : variabilité des protéines salivaires de FPM.....	34
<b>Tableau 10</b> : diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS-PAGE.....	42
<b>Tableau 11</b> : diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions non dénaturantes et non réductrices révélées par PAGE.....	43
<b>Tableau 12</b> : diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions non dénaturantes et réductrices révélées par PAGE.....	44
<b>Tableau 13</b> : diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS-PAGE.....	44
<b>Tableau 14</b> :indices de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites révélées par SDS/PAGE.....	45
<b>Tableau 15</b> :indices de similarité des protéines salivaires non dénaturantes et non réduites révélées par PAGE.....	47
<b>Tableau 16</b> :indices de similarité des protéines salivaires non dénaturées et réduites révélées par PAGE .....	48
<b>Tableau 17</b> :indices de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites révélées par SDS-PAGE.....	49

Depuis de nombreuses années des chercheurs et des cliniciens ont proposé le suivi de variations hormonales salivaires comme de véritables marqueurs de certaines maladies. En effet, bien que l'on ait décrit des protéines de transport dans la salive, la concentration salivaire de certaines substances hormonales refléterait celle de la fraction hormonale libre plasmatique, considérée comme la fraction responsable de l'action biologique. C'est le cas chez la femme, dans le domaine de la gynécologie, avec le suivi des pics sériques pré ovulatoires dont les équivalents salivaires semblent apporter à la clinique un moyen de diagnostic d'une simplicité évidente [9].

Dans ce contexte, la salive peut être considérée comme un milieu privilégié de diagnostic et/ou de suivi de l'évolution de certaines maladies et de leurs complications par la recherche de marqueurs salivaires [26, 37, 31]. Ces données devraient nous permettre une approche différente de la physiopathologie des maladies endocrines, en particulier pour la maladie diabétique et ses complications [17].

L'association diabète et grossesse est une situation gestationnelle fréquente qui constitue un vrai problème de santé publique dans de nombreuses régions à travers le monde. Sa prévalence varie de 0.6 % à 15 % à travers le monde, et de 2 % à 6 % en Algérie [5], avec une tendance actuelle à l'augmentation. C'est une grossesse à très haut risque en raison des complications maternelles et fœtales qui lui sont inhérentes, et qui peuvent mettre en jeu le pronostic materno-fœtal aussi bien fonctionnel que vital. C'est une entité hétérogène qui englobe et le diabète préexistant et celui propre à la grossesse.

Au niveau de la cavité buccale, le diabète est bien connu pour ses complications infectieuses locales et pour son influence sur le flux salivaire ou encore sur la composition protéique de la salive [18, 15, 2].

Au cours de ce travail nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux éventuelles variations des protéines salivaires au cours du diabète gestationnel, grâce à l'utilisation de techniques permettant une analyse exhaustive de ces protéines. Dans ce domaine, la protéomique offre la possibilité d'identifier et de quantifier les protéines exprimées par une cellule à un moment donné, dans un tissu donné et dans un environnement donné, ainsi qu'au cours de contextes physiologiques et pathologiques variés. Une électrophorèse monodimensionnelle haute résolution a été réalisée afin de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.



L'objectif principal de ce travail consiste à explorer de manière aléatoire les protéines salivaires de sujets sains et de patientes atteintes de diabète gestationnel puis de mener une caractérisation la plus exhaustive possible des différents biomarqueurs (protéines salivaires variantes) de cette pathologie. Une telle démarche fait appel autant à des méthodologies biochimiques d'extraction et de caractérisation des protéines qu'à des calculs statistiques analysant les relations existantes entre les différentes patientes.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous nous intéresserons au diabète gestationnel, à la salive et ses glandes, aux biomarqueurs et particulièrement à la relation qui existe entre ces trois éléments. Le second chapitre sera centré sur l'étude effectuée en faisant un rappel sur le matériel biologique et les différentes méthodes utilisées. Et le dernier chapitre sera consacré aux résultats et leurs interprétations, aux limites de l'étude ainsi qu'aux recommandations pour la recherche et la pratique. Enfin, une conclusion, résumant l'essentiel de cette recherche, clôturera cette étude.

## **I. LE DIABETE GESTATIONNEL**

### **1. Définition**

La définition retenue par l'ensemble des recommandations internationales existantes sur le diabète gestationnel est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Le diabète gestationnel est une complication médicale de la grossesse, défini comme un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse, quel que soit le traitement nécessaire et l'évolution dans le post-partum [49]. Cette définition regroupe sous le même nom deux situations en réalité différentes :

- le diabète de type 2 pré-gestationnel méconnu, révélé par la grossesse, persistant après l'accouchement,
- une anomalie de la tolérance glucidique réellement apparue en cours de grossesse, généralement en deuxième partie, et disparaissant, au moins temporairement, en post-partum [11].

### **2. Prévalence ou épidémiologie**

A l'échelle nationale 6% des femmes enceintes souffrent d'un diabète gestationnel [5]. L'estimation fiable de l'incidence et de la prévalence du diabète gestationnel est impossible, compte tenu d'une absence de standardisation des tests de dépistage utilisés. A travers le monde, sa prévalence varie de 2 à 22 %, selon les modalités de dépistage et la population étudiée. Cette variation semble être proportionnelle à la prévalence du diabète de type 2 [7]. Ainsi, en France, selon les régions, la prévalence est comprise entre 1.5 et 6 %, soit autour de 30 à 40 000 femmes par an. Mais elle serait de 2.8% aux USA, 16.7 % en Inde et 22 % en Sardaigne [50]. Une augmentation de la prévalence avec le temps a été constatée : les registres AUDIPOG estimaient la prévalence à 3.8% en 2004 et à 4.5% en 2005 [48].

Différentes causes sont avancées pour expliquer cette hausse, comme la disparité ethnique (prévalence plus élevée dans les populations asiatiques, noires, hispaniques), le changement de mode de vie de ces dernières années (diminution de l'activité physique et augmentation de la consommation calorique), le vieillissement des femmes enceintes ou encore l'augmentation de l'obésité dans toutes les populations [50].

### **3. Facteurs de risques**

Les facteurs de risque reconnus à fort et moindre impact de diabète gestationnel sont aujourd'hui [35, 6]:

### 3.1. Fort impact

- Antécédent personnel de diabète gestationnel (taux de récurrence de 30 à 80%);
- Age maternel  $\geq 35$  ans (voire 40 ans) [40];
- Obésité ou surpoids pré-gestationnelle (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>);
- Antécédent de macrosomie (poids de naissance  $\geq 4000$ g);
- Antécédent personnel de mort fœtale in utéro ou périnatale, de malformations congénitales [45, 46];
- Antécédent familial de diabète de type 2 au premier degré;
- La pré-éclampsie, l'hydramnios, la glycosurie, l'hypertension artérielle [45, 46].

### 3.2. Moindre impact

- L'origine ethnique (plus faible risque pour les femmes d'origine caucasienne et risque élevé pour les femmes d'origine asiatique, hispanique, africaine, indienne d'Amérique, et des îles du Pacifique) [25];
- Antécédent familial de diabète de type 2 au second degré;
- Une prise de poids excessive durant la grossesse;
- Multiparité maternelle;
- Grossesse multiple;
- Syndrome des Ovaires Polykystiques;
- Petite taille maternelle, petit poids de naissance maternel.

Certains retiennent également la sédentarité et une activité physique peu intense comme facteurs de risque [29].

Enfin, les facteurs sociaux (niveau socio-économique), psychologiques (dépression) et comportementaux (toxiques professionnels, alimentation et addictions) sembleraient influencer l'apparition du diabète gestationnel, mais ils restent encore insuffisamment évalués. La multiplicité des facteurs de risque et leurs interactions rendent complexe la prédiction individuelle du risque et justifient un dépistage précoce [21].

## 4. Dépistage et diagnostic

Aujourd'hui, il n'existe pas de consensus international sur les stratégies de dépistage et sur les seuils à utiliser [25]. Certaines sociétés savantes proposent des méthodes diagnostiques dites "en 2 temps" (dérivées des critères préconisés par O'Sullivan et Mahan en 1964 [38]).

#### 4.1. Premier temps: le dépistage par le test de O'Sullivan

Le test de O'Sullivan mesure la glycémie veineuse 1h après ingestion (à jeun ou non) de 50g de glucose [12]. Cependant ce test semble être plus sensible lorsqu'il est réalisé au moins 2 heures après un repas [25]. En l'absence de facteurs de risque, il doit être fait chez toutes les femmes enceintes entre la 24<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA) car 30% à 40% des femmes ayant un diabète gestationnel n'ont aucun facteur de risque [25,12].

En cas de facteurs de risque, il convient de réaliser ce dépistage dès le début de la grossesse et si il est négatif de le renouveler entre la 24<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée, voire une troisième fois à 32 SA [25,12].

#### 4.2. Deuxième temps: le diagnostic par hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)

Il repose sur le dosage de la glycémie veineuse sur plasma à jeun, puis à 60 min, 120 min et 180 min après absorption de 100g de glucose. Le test doit être fait le matin à jeun, au repos, sans modification préalable de l'alimentation habituelle [12]. Le diagnostic est fait lorsque 2 valeurs au moins sont anormales. L'existence d'une valeur anormale est considérée par certains comme une intolérance au glucose.

### 5. Physiopathologie

#### 5.1. Physiologie de la grossesse normale

Le glucose est le principal nutriment acheminé au fœtus par l'intermédiaire du placenta. La grossesse s'accompagne de modifications métaboliques glucidiques afin de répondre aux besoins énergétiques du fœtus [28]. Pendant la grossesse, il se crée un état diabétogène, il existe physiologiquement un état d'insulinorésistance progressif et réversible qui est compensé par un hyperinsulinisme [47].

Deux périodes successives sont distinguées: une phase anabolique au premier trimestre suivi d'une phase catabolique à partir du deuxième trimestre (figure 1).

Au premier trimestre de la grossesse, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline sont peu modifiées [28]. En revanche, l'augmentation de la sécrétion d'œstradiol et de progestérone provoque une hypertrophie des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, ce qui entraîne un hyperinsulinisme physiologique [47]. Ce dernier va favoriser le stockage énergétique dans les tissus adipeux. La glycémie postprandiale augmente régulièrement, tandis que la glycémie à jeun baisse progressivement, atteignant sa valeur la plus basse vers 19 semaines

d'aménorrhée. Un anabolisme facilité prédomine, il permet le stockage des nutriments (aussi bien glucidiques, lipidiques que protidiques) dans les tissus maternels (figure 1).

A partir du deuxième trimestre le métabolisme est inversé, un catabolisme accéléré apparaît. Un état d'insulinorésistance périphérique favorise un stockage hépatique préférentiel du glucose, pour une libération plus rapide de celui-ci. Cet état apparaît aux alentours de la 20ème semaine d'aménorrhée, va en croissant et est réversible dans le post-partum (figure 1).

### **5.2. Physiopathologie du diabète gestationnel**

Lors du diabète gestationnel, les femmes présentent une anomalie de la tolérance glucidique expliquée principalement par une diminution de l'insulinosécrétion réactionnelle et/ou une exagération de l'insulinorésistance [47] ce qui implique une glycémie élevée chez la mère (figure 2). Les mécanismes de l'insulinorésistance sont encore mal définis, elle serait due à une anomalie de liaison de l'insuline à son récepteur ou à des modifications post-récepteur. Cette insulinorésistance est modulée par l'Hormone Lactogène Placentaire (HPL), mais aussi la prolactine, le cortisol, la leptine.

Actuellement, la physiopathologie exacte du diabète gestationnel n'est pas clairement définie mais les mécanismes seraient les mêmes que ceux impliqués dans le diabète de type 2. Le diabète gestationnel et le diabète de type 2 seraient deux aspects de la même entité : l'une vue à un stade précoce et l'autre plus tardivement [47].

### **5.3. Facteurs de régulation**

Il existe différents facteurs modulant la sécrétion insulinique et favorisant l'insulinorésistance [47] :

- **Les œstrogènes**

Le placenta ne peut à lui seul synthétiser des œstrogènes. Pour cela, il aromatise d'abord les androgènes du fœtus. Les œstrogènes s'élèvent vers le 35ème jour de la conception. Ils ont de faibles propriétés anti-insuliniques.

- **La progestérone**

La progestérone a un effet direct sur le métabolisme glucidique. Sa concentration s'élève au 65ème jour de la grossesse et atteint son maximum vers la 32ème semaine. Les études divergent en ce qui concerne son implication dans la liaison de l'insuline à son récepteur.

- **La prolactine**

Les taux de prolactine sont accrus au cours de la grossesse d'un facteur 5 à 10. Les études chez le rat ont montré que lorsque leurs cellules sont incubées en présence de prolactine, la

sécrétion insulinique est parallèlement augmentée. Dans des adipocytes de rat en culture, la prolactine diminue le transport de glucose mais n'altère pas la liaison de l'insuline à son récepteur.

- **Le cortisol**

Le cortisol est sûrement l'hormone la plus diabéto-gène. Sa sécrétion est stimulée par une augmentation de la production hépatique de la globuline. En fin de grossesse, la cortisolémie est deux fois et demie plus élevée.

- **L'hormone lactogène placentaire**

Cette hormone augmente au cours de la grossesse. Elle joue un rôle dans le développement de l'insulino-résistance au cours de la grossesse. Les mécanismes exacts de son action ne sont pas encore connus.

- **La leptine**

La leptine est synthétisée par les cellules du trophoblaste mais aussi par les cellules du liquide amniotique. Le taux de leptine s'élève progressivement au cours de la grossesse. Il n'y a pas de corrélation entre les taux circulants maternels et la concentration placentaire de leptine chez les patientes diabétiques traitées par insuline. On peut également conclure que la production placentaire de leptine peut être régulée in-utero. L'insuline est sûrement un important modulateur de la régulation de l'expression de la leptine. Des études seront nécessaires pour évaluer l'impact de la leptine.

## **6. Conséquences ou complications**

Le diabète gestationnel chez les femmes enceintes fait courir des risques non négligeables à la mère mais surtout au fœtus (figure 3).

### **6.1. Conséquences fœtales et néonatales**

A court terme, les conséquences du diabète gestationnel fœtales et néonatales sont :

- La macrosomie : un nouveau-né est macrosome lorsque son poids de naissance est supérieur au 90e percentile selon les courbes de références établies en fonction de l'âge gestationnel et du sexe. Pour d'autres études, la macrosomie est définie par un poids supérieur à 4000g (voir 4500g) [8, 25]. Le principal risque de la macrosomie est le risque de dystocie des épaules.
- La détresse respiratoire, due à un retard de maturation des poumons;
- La mortalité périnatale;
- Des avortements spontanés plus rarement;

- La prématurité;
- Les désordres métaboliques: les enfants nés de mères atteintes de diabète gestationnel présentent un risque d'hypoglycémie, d'hypocalcémie, d'hyper bilirubinémie élevé par rapport aux enfants nés de mères non diabétiques [14].
- Les malformations: les principales malformations sont celles du système nerveux central et du squelette, cardiovasculaires, génito-urinaires, digestives et l'artère ombilicale unique.
- L'hypertrophie myocardique.

A long terme, les principales complications pour l'enfant sont l'obésité et le développement d'un diabète de type II, à l'adolescence ou au début de l'âge adulte.

## 6.2. Conséquences maternelles

A court terme, les complications pour la mère pendant la grossesse, lors d'un diabète gestationnel sont essentiellement:

- L'hypertension gravidique: la survenue d'une hypertension artérielle (HTA) pouvant évoluer vers une pré-éclampsie voire une éclampsie.
- L'hydramnios;
- La nécessité d'une césarienne qui n'est pas une complication mais une conséquence de la macrosomie de l'enfant.

A long terme, les complications pourront être une récurrence d'un diabète gestationnel lors d'une prochaine grossesse et le risque de développer un diabète de type II. Si tel est le cas, les complications dégénératives que sont la rétinopathie, la coronaropathie et la néphropathie peuvent survenir.

## II. LA SALIVE ET LES GLANDES SALIVAIRES

### 1. La salive

#### 1.1. Définition

La salive est la première sécrétion digestive, elle désigne un liquide physiologique incolore, alcalin, légèrement visqueux sécrété dans la bouche par les glandes salivaires [22]. Il existe plusieurs types de salives comme la salive parotidienne, salive sous-maxillaire, salive sublinguale et bucco-labiale, mais encore une salive mixte constituée d'un mélange des premières dans la cavité buccale.

## 1.2. Composition biochimique de la salive

D'un point de vue biochimique, la salive constitue un milieu extrêmement complexe qui joue un rôle capital en physiopathologie buccale. Un grand nombre de molécules biologiques y a pu être identifié. Schématiquement, on peut définir dans la sécrétion salivaire : des constituants inorganiques anionique et cationiques dont les plus importants sont les ions bicarbonates et phosphates ainsi que des constituants organiques qui confèrent à la salive de nombreuses propriétés [22].

### 1.2.1. Eau

L'eau constitue 99 % de la salive dont le rôle est l'humidification du bol, la solubilisation des substances ce qui permet de détecter le goût.

### 1.2.2. Constituants inorganiques

La salive contient des constituants ioniques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) dont la composition varie pendant la sécrétion (tableau 1). Certains de ces ions permettent de réguler le pH du milieu buccal et qui ont une action bactériostatique.

### 1.2.3. Protéines salivaires

Les protéines salivaires représentent la majeure partie des constituants organiques. On distingue les protéines extrinsèques issues du sérum et les protéines intrinsèques, synthétisées par la glande.

#### a) Les protéines extrinsèques

On trouve parmi les protéines extrinsèques les immunoglobulines, dont le rôle dans le contrôle immunologique des bactéries est bien connu. L'IgA monomérique, qui est la plus représentée, dérive du sérum et gagne la cavité buccale de façon trans-épithéliale ou par le fluide gingival. On trouve également des IgG et des IgM. Des albumines issues du sérum sont également détectées dans la salive [30].

#### b) Les protéines intrinsèques

- **L' $\alpha$  amylase**

L'amylase est une enzyme protéique de la famille des hydrolases, catalysant principalement l'hydrolyse de l'amidon en le clivant en maltose un disaccharide fait de deux molécules de glucose. Elle est produite par les glandes salivaires et les glandes pancréatiques.



- **La lipase linguale:**

La lipase linguale est une enzyme salivaire sécrétée par des glandes de la langue et qui est impliquée dans la digestion des lipides. Elle hydrolyse les triglycérides et libère des acides gras à longue chaîne (AGLC) dans la salive.

- **Les mucines:**

Les mucines sont des glycoprotéines du mucus, responsables des propriétés viscoélastiques et gélifiantes de celui-ci. Le caractère visqueux, facilite l'ingestion du bol alimentaire en l'imprégnant. Les mucines sont capables d'interagir avec des microorganismes en les agglutinant. Elles participent à la protection des muqueuses.

- **Le lysozyme :**

C'est une protéine globulaire formée de 129 acides aminés (chez l'être humain) retrouvée dans la plupart des sécrétions de l'organisme (salivaires, lacrymales, nasales, bronchiques). Dans la salive, elle représente près de 10% des protéines totales. Le lysozyme a une action antibactérienne importante dans la salive. Il hydrolyse les liaisons  $\beta$ -(1-4) entre acide N-acetylmuramique et N-acetylglucosamine

On trouve également dans la salive les oxydo-réductases qui interviennent dans le processus d'oxydo-réduction. Parmi elles, on trouve la lactopéroxydase qui inhibe la croissance des bactéries du genre lactobacille et on trouve aussi des transférases, des lyases et de la kallitréine qui joue un rôle dans la vasodilatation des glandes salivaires [22, 23].

#### **1.2.4. Autres constituants organiques**

Parmi ces constituants on trouve, des facteurs de croissance telle que : EGF et NGF (substances à activité humorale dans les glandes salivaires). Des IgA sécrétoires dont la production peut être induite après stimulation du système lymphoïde annexé au système digestif. On trouve également des protéines riches en proline, des composés azotés tels que l'urée dont Les concentrations d'urée sanguine et salivaire sont très proches, présumant une diffusion directe du sang à la salive, des glucides libres sous forme de traces, des vitamines et enfin des lipides qui peuvent jouer un rôle important en se liant à des protéines salivaires.

### **1.3. Caractéristiques physicochimiques de la salive**

#### **1.3.1. Le volume**

D'une personne à l'autre, la sécrétion peut varier de 500 à 1 200 ml par jour, 70 % d'origine parotidienne, 20 % submandibulaire (la production des autres glandes étant relativement négligeable).

### 1.3.2. La viscosité

La viscosité salivaire est le reflet du taux de mucines. Elle varie selon la localisation du prélèvement et le débit salivaire.

### 1.3.3. Le pH

Il exprime l'acidité ou l'alcalinité de la salive et varie en fonction de l'âge, du lieu de prélèvement buccal et de l'alimentation. Le pH physiologique d'un individu varie dans une gamme normale comprise entre 5,6 et 7 avec une valeur moyenne d'environ 6,7 [13].

### 1.3.4. Le pouvoir tampon

La salive possède un pouvoir tampon qui est essentiellement assuré par les phosphates, les bicarbonates et certaines protéines. Le pouvoir tampon de la salive augmente avec la stimulation, il est presque inefficace pendant les périodes de faible débit (le pH salivaire peut descendre alors à un niveau de 5,3) [1].

### 1.3.5. Le débit salivaire

Il reflète la production quantitative de la salive. Il est sous l'influence de multiples facteurs tels que le degré d'hydratation, la position du corps, l'exposition à la lumière, les stimulations antérieures, les rythmes circadien et circannuel, la taille des glandes et les médicaments ou drogues. Le débit salivaire augmente avant le repas alors qu'il est très réduit lors du sommeil, la déshydratation et le stress réduisent aussi le débit [22].

## 1.4. Mécanisme de formation de la salive

### 1.4.1. Formation de la salive primaire

A partir des capillaires sanguins environnants, les cellules acineuses pompent activement  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  et permettent le libre passage de l'eau entraînant la formation de la salive primaire (Figure 4). Les cellules muqueuses libèrent des mucines et les cellules séreuses sécrètent plusieurs protéines incluant des protéines riches en proline, des enzymes (amylase, peroxydase, lysozyme). Ainsi que des protéines riches en cystéines et histidine [36]. On a donc une excrétion des protéines et une ultra filtration ionique (figure 4).

### 1.4.2. Modification en salive définitive

La seconde phase s'effectue lors du passage de la salive primaire dans le canal strié où elle est modifiée par une sécrétion et une réabsorption d'électrolytes, conduisant à la formation de la salive finale, hypotonique au plasma. Il y a une réabsorption sodique massive au niveau des

cellules des canaux excréteurs intralobulaires et un enrichissement en potassium grâce au fonctionnement d'une pompe à  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$  des cellules des canaux striés (figure 5). De plus des plasmocytes secrètent des IgA qui gagnent la lumière de l'acinus [13].

## **1.5. Rôle de la salive**

### **1.5.1. Fonction digestive**

Les enzymes salivaires participent au premier stade de la digestion. L'action de l'amylase est optimale à pH 7. Elle débute la digestion des polysides de l'alimentation. La salive a également une fonction mécanique qui nous permet de goûter, de mastiquer et déglutir les aliments solides. Elle agit comme un solvant et un lubrifiant dont les qualités physiques sont améliorées par la présence de mucine [1].

### **1.5.2. Fonction de protection**

La salive est la cause essentielle de la très grande résistance de la cavité buccale à l'infection. Son action est aussi bien physique, car elle permet l'auto-nettoyage de la cavité buccale et l'humidification des muqueuses, qu'antibactérienne par la présence de lysozyme, et d'immunoglobulines. Le flux salivaire est un facteur important à évaluer, car de lui dépendent tous les autres facteurs salivaires qui participent à la protection des tissus buccaux. Il existe d'ailleurs une corrélation entre le nombre de caries dentaires et le flux salivaire.

### **1.5.3. Fonction de cicatrisation**

La salive contient des facteurs de croissance qui interviennent dans la cicatrisation des tissus. On trouve notamment EGF.

## **2. Les glandes salivaires**

Les glandes salivaires sont annexées à la cavité buccale et secrètent la salive, elles sont donc dites exocrines et il existe deux types [1, 22].

### **2.1. Les glandes salivaires principales**

Elles sont représentées par trois paires de glandes majeures (figure 6):

#### **2.1.1. La glande parotide**

C'est la glande salivaire la plus volumineuse, environ 32 cm<sup>2</sup>. Elle est située devant l'oreille, sur le côté du visage. De coloration grise-jaunâtre, elle présente une surface lobulée, une

consistance ferme et pèse en moyenne 25 grammes. Elle se situe dans la loge l'oropharynx [13].

### **2.1.2. La glande sous-maxillaire**

Elle est plus petite que la glande parotide. Elle est située derrière la mâchoire inférieure, juste sous le menton et la langue. Cette glande ovalaire de 2,5 cm sur 1,5 cm. Le canal excréteur de la glande est le canal de Wharton ou canal sous-maxillaire, qui provient de la parotidienne, limitée en dehors par la peau et en dedans par réunion de plusieurs canaux collecteurs et qui fait circuler la salive de la glande sous-maxillaire jusqu'à des ouvertures dans le plancher de la bouche de chaque côté de la langue.

### **2.1.3. La glande sublinguale**

C'est la plus petite des glandes salivaires principales, elle pèse environ 3 grammes et fait 3 cm de longueur, et 7 à 8 mm de largeur, de forme allongée, aplatie transversalement. Elle est située dans la partie antérieure du plancher de la bouche [24, 32].

## **2.2. Les glandes salivaires accessoires**

Ces glandes dites mineures sont très nombreuses et disséminées sur toute la surface de la muqueuse buccale, excepté au niveau des gencives, du vermillon des lèvres et de la partie antérieure du palais osseux. Il s'agit de petites formations glandulaires muqueuses et plus rarement séreuses de 1 à 2 mm de diamètre. Ces glandes labiales, jugales, palatines, vélaires, linguales, dorsales ou marginales secrètent une quantité de salive négligeable par rapport au volume total salivaire [13, 32].

## **III. LES BIOMARQUEURS**

### **1. Définition**

Un biomarqueur est une caractéristique qui peut se mesurer et s'évaluer de manière objective (c'est-à-dire avec une précision et une reproductibilité suffisante) ce qui constitue par conséquent un indicateur des processus biologiques normaux [20], des processus pathologiques ou des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique. En d'autres mots, un biomarqueur est un outil qui peut distinguer un état biologique normal d'un état anormal. Un outil de cette sorte permet aux médecins de déceler la présence d'une maladie, d'en mesurer l'étendue et de constater si le traitement prescrit donne l'effet désiré [20, 41]. Le biomarqueur a été défini par Lagadic et al. (1997) [34] comme étant "un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou

comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant [4].

## **2. Identification et validation d'un biomarqueur**

### **2.1. Identification**

Les biomarqueurs sont identifiés par l'étude de la corrélation statistique existant entre la présence ou l'intensité d'expression d'un marqueur biologique particulier (ADN, ARN, protéine, métabolite) et le résultat clinique observé (symptômes de la maladie, effets secondaires, efficacité). Cette identification passe en général par l'analyse comparative de produits biologiques (tissus, sang, biopsies, liquides biologiques...) issus de sujets sains et de patients qui peuvent être des patients à différents stades d'une même maladie. Les caractéristiques biologiques identifiées peuvent alors être considérées comme des biomarqueurs de l'état physiologique correspondant [41].

### **2.2. Validation**

Une fois le biomarqueur identifié, reste à valider sa pertinence clinique qui doit être démontrée, c'est-à-dire vérifié qu'il est effectivement corrélé à l'état clinique étudié. Deux étapes de validation sont alors généralement suivies :

- La validation « technique » de la méthode de dosage de biomarqueur qui est définie par l'Organisation Internationale pour la Standardisation (IOS) comme la confirmation par l'expérimentation et les preuves objectives issues de ces expérimentations que les conditions requises pour une utilisation définie sont remplies [4].
- La validation « clinique » est l'évaluation du biomarqueur et sa méthode de dosage dans un contexte clinique [44].

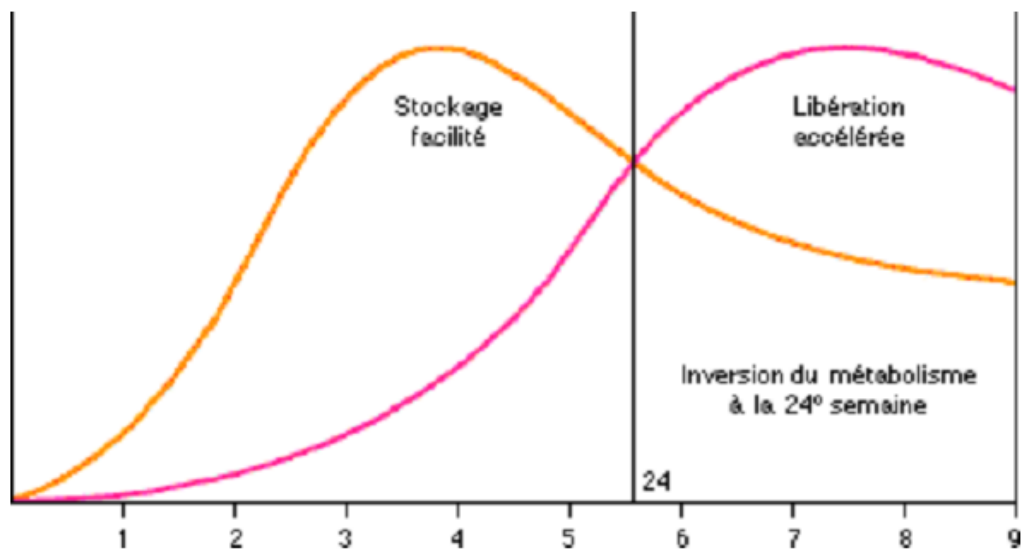
## **IV. RELATION ENTRE DIABETE GESTATIONNEL, SALIVE ET BIOMARQUEURS**

Se servir de la salive plutôt que d'une ponction sanguine pour diagnostiquer des pathologies comme le diabète gestationnel sera peut-être une procédure courante dans le future, car depuis de nombreuses années, la salive est utilisée comme matériel d'analyse. Elle reflète la fraction sanguine libre et donc fonctionnelle des analytes, c'est le cas notamment des tests salivaires de dérèglement hormonale de la testostérone dont le contenu dans la salive est réputé reflété les taux libres plasmatiques correspondants. C'est le cas également chez la femme dans le

domaine de la gynécologie, avec le suivie des pics sériques pré ovulaires dont les équivalents salivaires semblent apporter un moyen de diagnostique plus simple [10, 42].

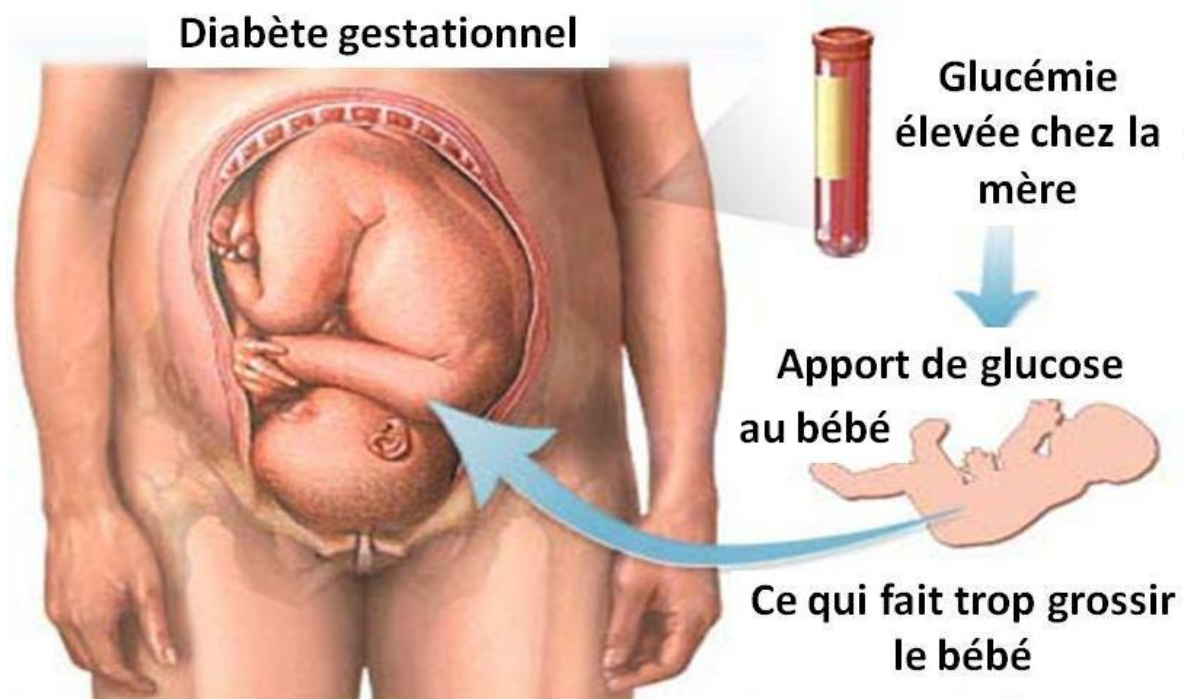
Dans ce contexte, les protéines salivaires peuvent représenter de nouveaux outils pour le suivi des maladies en indiquant l'état de santé d'une personne, sur tout qu'une première étape clé dans cette voie vient d'être franchit grâce au décryptage complet du protéome salivaire établis par trois équipes américaines qui ont identifié l'ensemble des 1166 différentes protéines de la salive et que nombreuses d'entre elles sont similaires à celles se trouvant dans le sang et dont le rôle a déjà été établi notamment dans les maladies d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson, les cancers du sein, colorectal et du pancréas ainsi que dans les deux types de diabète. La majorité des protéines salivaires sont également impliquées dans les voies de signalisation activées par le corps en cas d'infection ou de lésion [16].

Ce fluide biologique trouve une utilité dans de nouvelles approches diagnostiques, cliniques ou de recherche. L'analyse de la salive permet le diagnostic de pathologies et le suivi de l'état de santé du patient. Contrairement aux autres fluides biologiques, les diagnostics salivaires sont simples, reproductibles, peu coûteux et non-invasifs. Grâce aux nouvelles biotechnologies et à la découverte de marqueurs biologiques spécifiques, les diagnostics salivaires permettent la détection précoce de maladies orales et systémiques telles que le cancer, le diabète, les maladies auto-immunes ou encore les maladies infectieuses. En plus du suivi de l'état de santé, l'analyse de la salive permet certaines applications thérapeutiques. Néanmoins, leur utilisation en pratique quotidienne reste limitée, des progrès sont encore attendus [3].



**Figure 1 : évolution du métabolisme pendant la grossesse [19].**

La figure 1 met en évidence les modifications métaboliques de la grossesse. La réponse insulinaire à cette insulino-résistance est possible grâce à des modifications fonctionnelles et structurales des îlots de Langerhans du pancréas. Une hypertrophie et une hyperplasie des cellules bêta sont observées.



**Figure 2 : conséquence de l'insulinosécrétion et/ou exagération de l'insulinorésistance (Types de diabète. <http://fr.wikinoticia.com>).**



## Gestational Diabetes

**1** Gestational diabetes is a type of diabetes that occurs only during pregnancy. The stomach converts food into glucose and glucose enters the mother's bloodstream. The mother's pancreas produces sufficient insulin but the insulin is resistant. Glucose can't get into the body's cells causing high glucose levels in the mother's bloodstream.



**2** High glucose levels in the mother's blood enter the baby through the placenta. The baby's pancreas makes more insulin to handle the excess glucose.

**3** Gestational diabetes affects the mother in late pregnancy, after the baby's body is fully formed, but while the baby is still growing.



**4** Since the baby is getting more energy than it needs to grow, the extra energy is stored as fat causing the baby may weigh much more than normal.

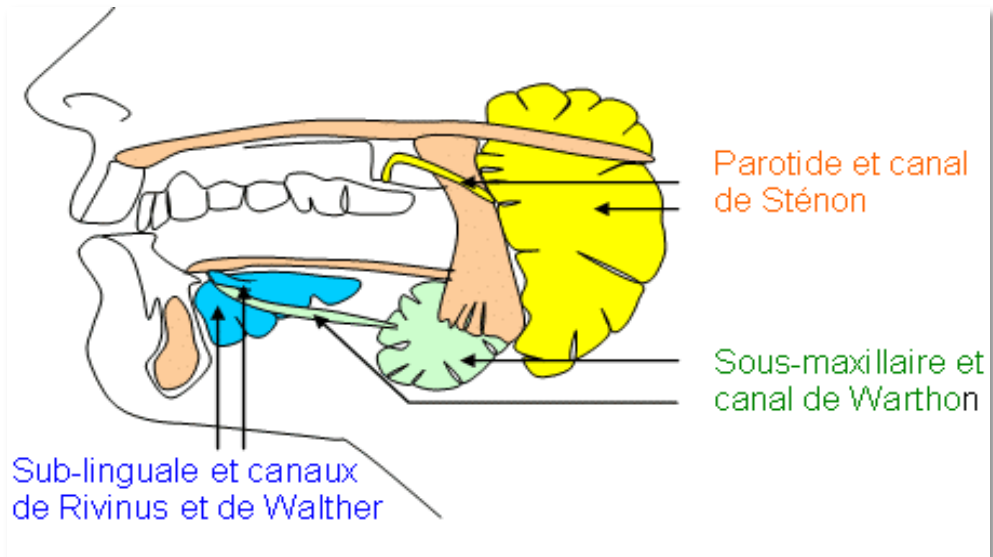
**5** Gestational diabetes can cause problems for the mother and baby during delivery. The baby may need to be delivered by cesarean section and may have breathing problems. As adults they may develop diabetes or obesity.



**Figure 3 : conséquences du diabète gestationnel (American Diabetes Association 2013. Physiopathologie du diabète gestationnel)**

Tableau 1: concentration ionique de la salive en mEq/L [39].

	<b>Plasma</b>	<b>Salive primaire</b>	<b>Salive finale (repos)</b>	<b>Salive finale (débit élevé)</b>
<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>145</b>	<b>160</b>	<b>1,5</b>	<b>50</b>
<b>Cl<sup>-</sup></b>	<b>120</b>	<b>120</b>	<b>22</b>	<b>40</b>
<b>K<sup>+</sup></b>	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>20</b>
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>24</b>		<b>1</b>	<b>40</b>



**Figure 4 : Localisation des trois paires de glandes salivaires [39].**

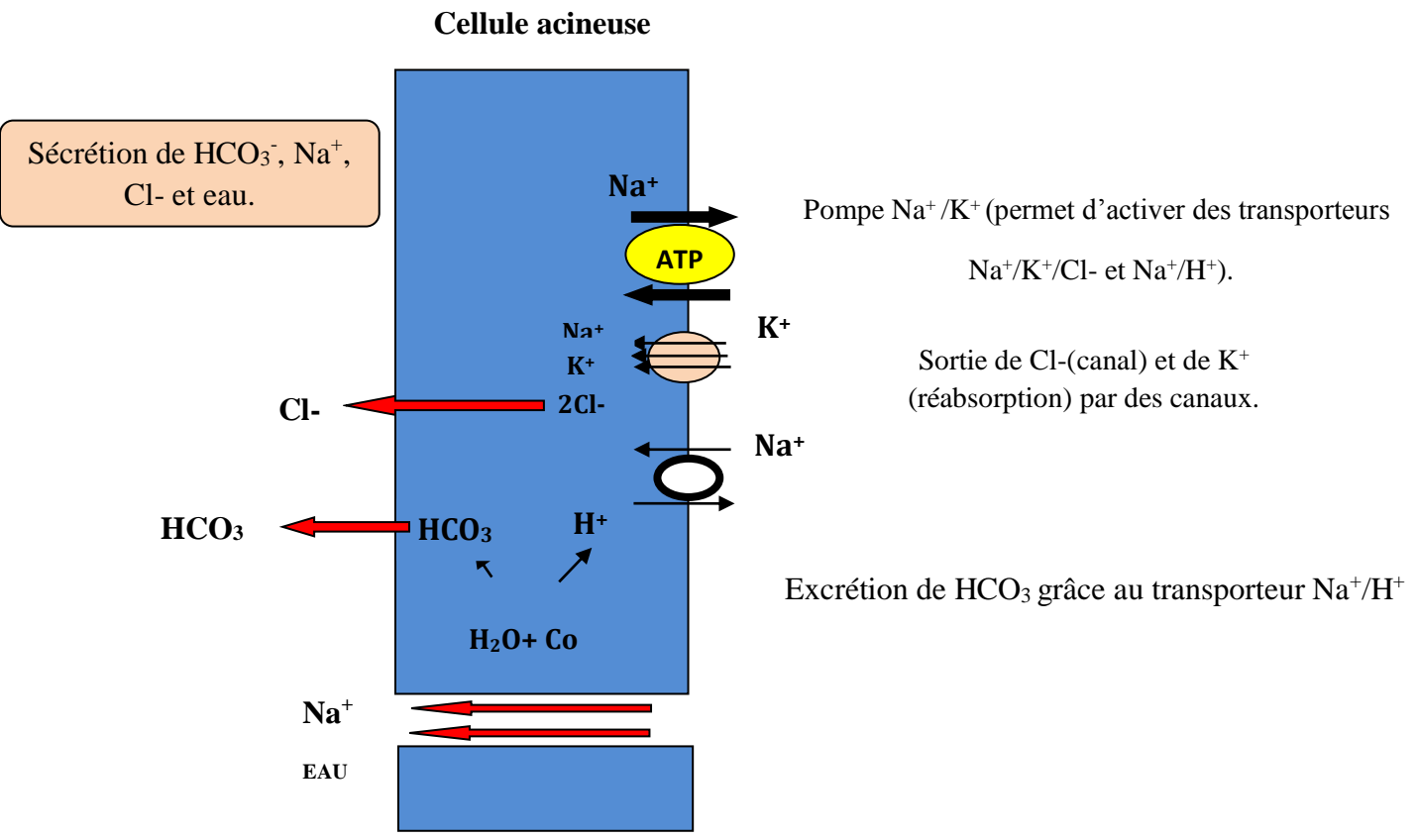


Figure 5 : formation de la salive primaire [13].

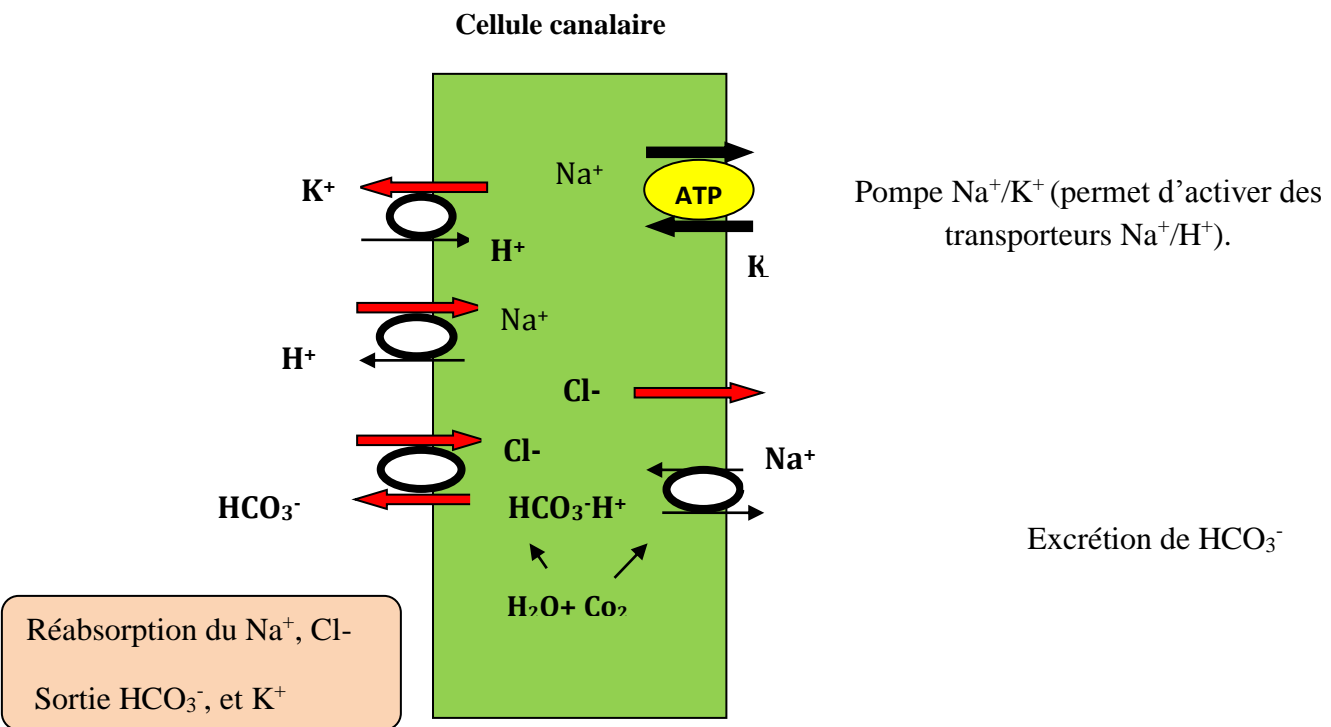


Figure 6 : Mécanisme de formation de la salive définitive [13].

## 1. Matériel

### 1.1. Recrutement des patients

Dix-sept femmes enceintes provenant du service de gynécologie du CHU de Constantine et de l'hôpital d'El Khroub atteintes de diabète gestationnel, déterminé par les symptômes cliniques et les tests de dépistage ont été étudiées. Elles sont âgées de 26 à 43 ans. Les patientes diabétiques ayant une pathologie non régulée et ne présentant pas une bonne hygiène buccale ont été exclues de l'étude. Cette population a été comparée à trois sujets sains dont deux femmes enceintes âgées de 18 et 32 ans, sans pathologie connue et possédant une bonne hygiène buccale.

### 1.2. Recueil de la salive

Pour le recueil de la salive nous avons adopté la méthode décrite par [27]. La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner (environ 10 heures du matin) après que le patient se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice. Afin de favoriser la salivation, le patient doit boire un verre d'eau 15 minutes avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de parafilm (environ 3 cm<sup>2</sup>), pendant quelques minutes. Trois ml de salive totale sont ainsi prélevés dans des tubes Falcon stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 x g pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines et les débris cellulaires et alimentaires encore présents dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé (-20°C).

## 2. Méthodes

### 2.1. Extraction des protéines salivaires

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de la salive des patientes malades et des sujets sains, obtenue après centrifugation de la salive totale.

#### 2.1.1. Dans des conditions dénaturantes et réductrices

100µl de salive des patientes malades et des sujets sains sont mélangés avec 75µl de solution d'extraction contenant 35 % (v/v) de glycérol, 22 % (v/v) de Tris/HCl 1M pH 6.8, 43 % (v/v) d'eau distillée, 7 % (p/v) de SDS et quelques grains de bleu de bromophénol. 2.5% (v/v) de β-mercaptoethanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines salivaires. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires dissociées et réduites sont récupérés.

### **2.1.2. Dans des conditions dénaturantes et non réductrices**

100µl de la salive des patientes malades et des sujets sains sont repris dans 75µl de la solution d'extraction précédemment décrite sans ajout du réducteur, le β-mercaptoethanol. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont centrifugés à 10000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires dissociées mais non réduites sont récupérés.

### **2.1.3. Dans des conditions non dénaturantes et réductrices**

100µl de la salive des patientes malades et des sujets sains sont prélevés et repris dans 75µl de la solution d'extraction précédemment mais sans l'agent dénaturant (SDS). 2.5% (v/v) de β-mercaptoethanol sont rajoutés au mélange. Après agitation à température ambiante pendant 1 heure, les échantillons sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires non dissociées mais réduites sont récupérés.

### **2.1.4. Dans des conditions non dénaturantes et réductrices**

100µl de la salive des patientes malades et des sujets sains sont mélangés avec 75µl de la solution d'extraction précédemment mais sans l'agent dénaturant (SDS) et sans le réducteur (β-mercaptoethanol). Les mélanges sont agités pendant 1 heure à température ambiante puis centrifugés à 10000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires non dissociées et non réduites sont récupérés.

## **2.2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide**

Aux différentes étapes d'extraction, la composition protéique des différentes conditions est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1.5 mm d'épaisseur en conditions dénaturantes (présence de SDS) pour les extractions 1 et 2 et en conditions non dénaturantes (absence de SDS) pour les extractions 3 et 4, avec un système vertical. L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de [33] modifiée par [43]. Le gel de séparation contient 12.56% de polyacrylamide et le gel d'alignement 2.88%. Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 KDa à 250 KDa. Les échantillons sont déposés à raison de 50 µl par puits. La migration est effectuée à 40 mA par gel dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1.4 % (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie à 12% (p/v) de TCA et 5 % (v/v) de solution mère de Bleu

de Coomassie R250 à 1 % dans l'éthanol pendant toute la nuit. Les gels sont colorés toute la nuit avec la solution de coloration. Ils enfin décolorés dans de l'eau de robinet.

### **2.3. Lecture des électrophoregrammes**

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation. Afin de déterminer le poids moléculaire de chaque protéine, un marqueur de taille a été utilisé.

### **2.4. Analyse statistiques**

Le traitement des données d'électrophorèse a fait appel à des méthodes statistiques. Les fréquences et les indices de similarités ont été effectués à l'aide de Word 2010. L'établissement des dendrogrammes est réalisé à l'aide du logiciel Statistica version 6.0.

## 1. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs

### 1.1. Analyse des profils électrophorétique

Pour le fractionnement des protéines salivaires, la technique d'électrophorèse utilisée est celle décrite par [33] et modifiée par [43]. C'est une technique qui permet d'obtenir l'ensemble des protéines. La lecture des diagrammes nous permet de révéler la mobilité de chacune de ces bandes protéiques réparties dans les deux zones de protéines de haut et de faible poids moléculaire (HPM et FPM), en mesurant la distance parcourue par chaque protéine dans le gel de séparation.

#### 1.1.1. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices

L'étude des profils électrophorétiques, du protéome salivaire des témoins et celui des patientes, révèle des variations dans la composition protéique. En effet, les différences résident dans les deux zones des protéines salivaires de haut et de faible poids moléculaire contenant les bandes B8, B9, B14, B15 et B17 qui sont les plus variables qualitativement et quantitativement (figure 7).

D'abord, la comparaison, entre les échantillons des témoins et des sujets malades, montre que les bandes B8 et B17 sont présentes chez le sujet sain et ainsi que chez les patientes 5, 9 et 13 pour la bande B8 et 1, 5, 6 et 9 pour la bande B17 alors qu'elles sont absentes chez les femmes enceintes non diabétiques et dans le reste des échantillons (figure 7).

En revanche, la bande B9 est présente chez les patientes 3, 4, 5, 8, 13, 15 et 18 tandis qu'elle est absente chez le sujet sain et chez les deux femmes enceintes non diabétiques ainsi que dans le reste des échantillons.

Donc les bandes B8, B9 et B17 varient qualitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs qualitatifs.

Ensuite, la comparaison, entre les profils électrophorétiques des patientes, démontre des différences au niveau des bandes B14 et B15 qui sont omniprésentes mais leur intensité varie d'un échantillon à un autre (figure 7). A titre d'exemple:

L'intensité de la bande B14 est forte chez les patientes 8 et 5 tandis que chez les patientes 4, 10, 11, 13 et 15 l'intensité est moyenne, par contre chez les patientes 1, 2, 3, 6, 12, 14, 18 et 19 il y a une faible intensité et cette dernière est à l'état de trace chez les patientes 7 et 9 (figure 7).



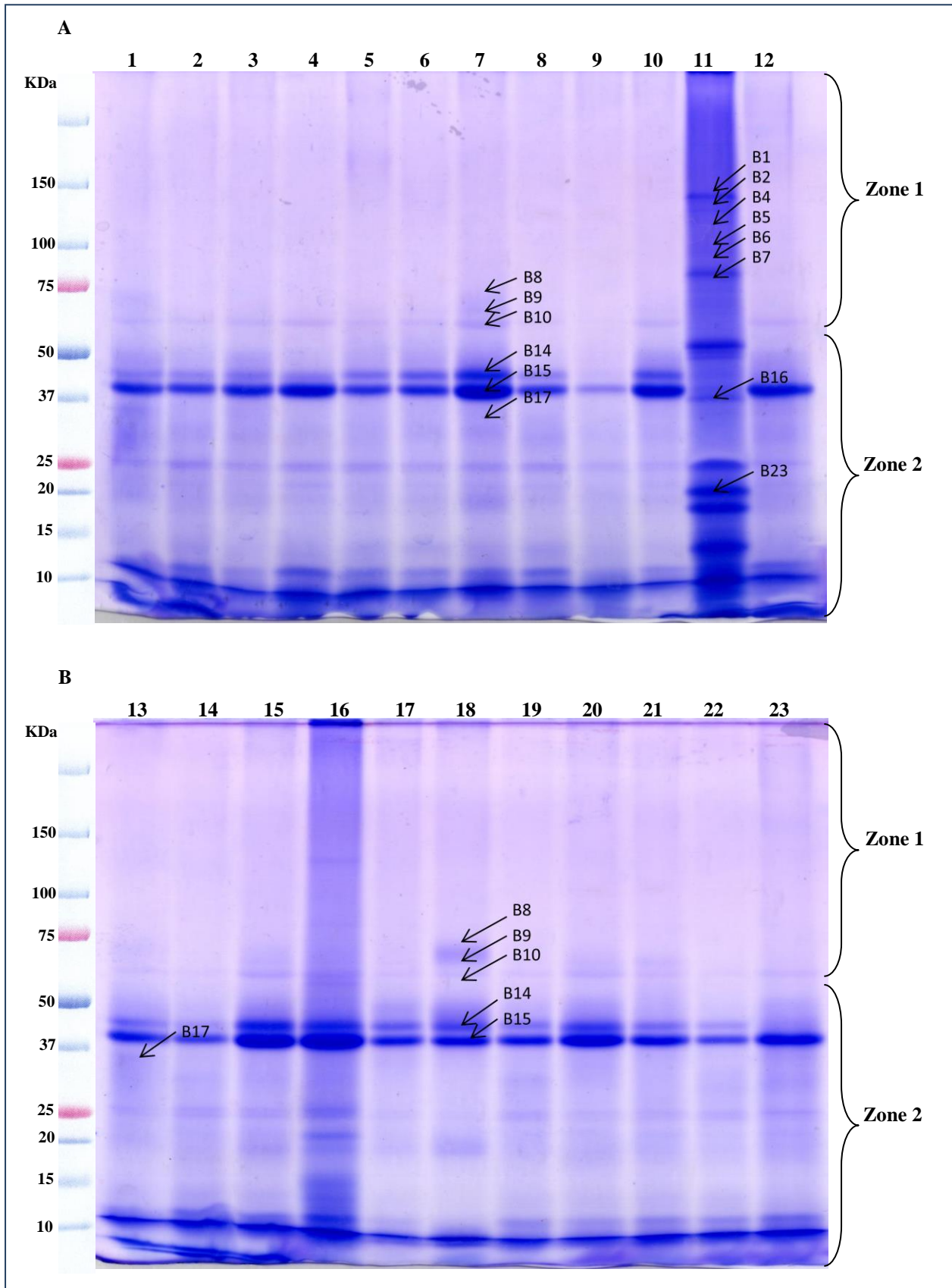


Figure 7: profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE. A et B : 1, 13 : sujet sain. 2, 12, 14, 23 : femmes enceintes non diabétiques. 3 à 11, 15 à 22: patientes diabétiques.

Quant à la bande B15, elle est fortement présente chez les patientes 2, 5, 8, 10, 11 et 15 et moyennement présente chez les patientes 1, 3, 4, 6, 12, 13, 14 et 18, cependant son intensité est faible chez les patientes 7 et 9 (figure 7).

Donc les bandes B14 et B15 varient quantitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs quantitatifs.

Ainsi, ces fluctuations observées entre les femmes enceintes diabétiques sont probablement dues à des facteurs tels que : les antécédents familiaux de diabète, l'obésité avant et durant la grossesse et des pathologies associées.

En outre, nous devons signaler la présence d'un cas particulier, celui de la patiente 9 qui présente un profil électrophorétique complètement différent (figure 7). En effet, ce profil est marqué par la présence des bandes protéiques B1, B2, B4, B5, B6, B7, B16 et B23 qu'on ne retrouve pas dans les autres échantillons. Sur le plan clinique, cette patiente présente une grossesse tardive avec excès de liquide amniotique et des antécédents de bébé macrosome ce qui a fait penser à un diabète. Cependant, vu son profil électrophorétique, différent non seulement de celui du sujet sain et de celui des femmes enceintes non diabétiques mais différent aussi de celui des femmes enceintes diabétiques, nous amène à supposer la présence d'autres pathologies qu'il faut investiguer.

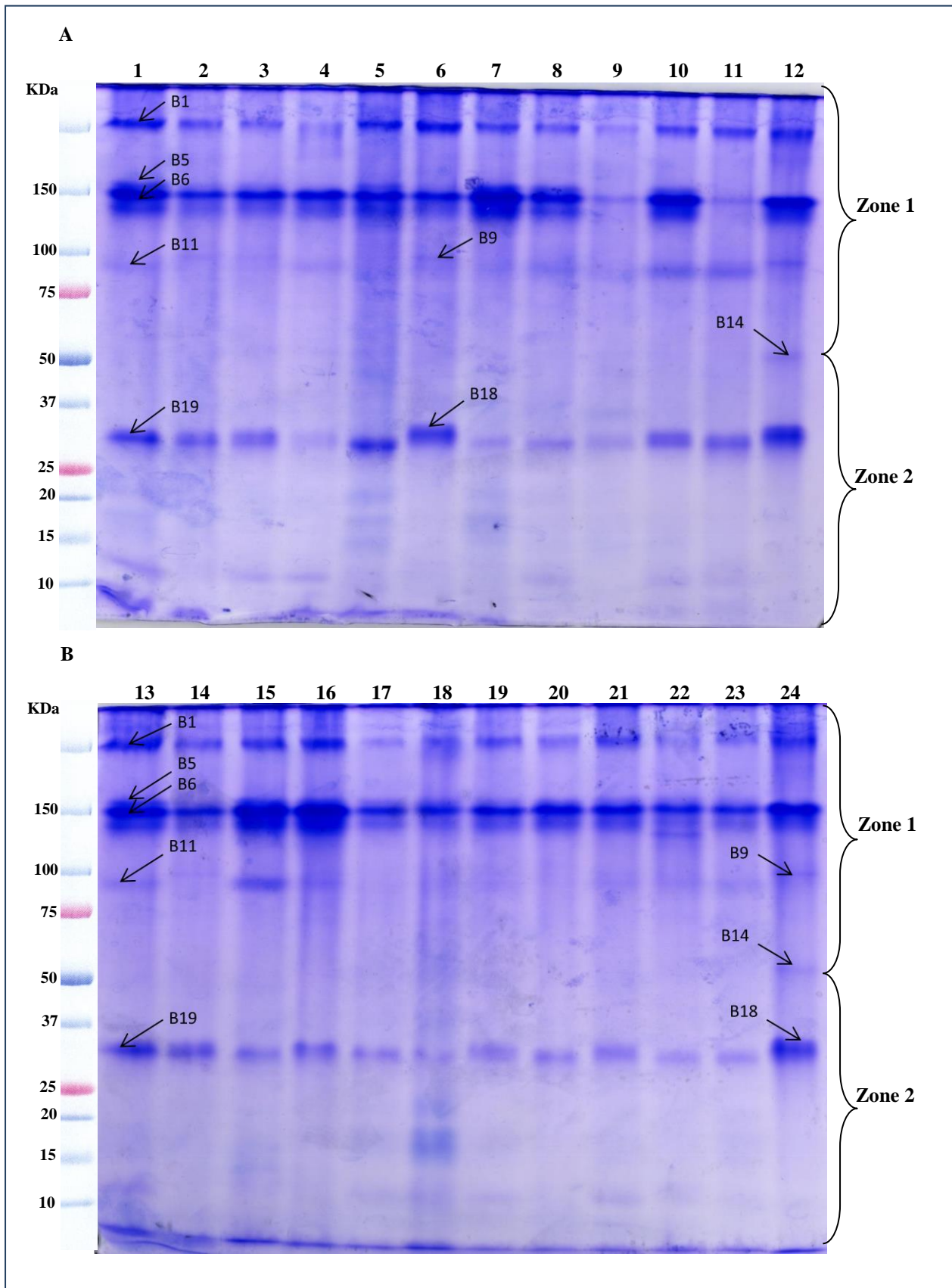
### **1.1.2. Analyse des protéines salivaires fractionnées par PAGE dans les conditions non dénaturantes et non réductrices**

L'analyse de la composition protéique de la salive des témoins et celle des sujets malades, démontre des variations au niveau des deux zones des protéines salivaires de haut et de faible poids moléculaire contenant les bandes B1, B5, B6, B9, B11, B18 et B19 qui sont les plus variables qualitativement et quantitativement (figure 8).

Premièrement, la comparaison, entre les échantillons des témoins et des patientes, montre que la bande B9 est absente chez le sujet sain ainsi que chez les patientes 10, 15, 18 et 19 alors qu'elle est présente chez les femmes enceintes non diabétiques et chez le reste des patientes (figure 8).

Par contre la bande B11 est absente chez les femmes enceintes non diabétiques ainsi que chez les patientes 1 et 12 mais elle est présente chez le sujet sain et dans le reste des échantillons (figure 8).

Quant à la bande B18, bien qu'elle soit présente chez une des femme enceinte non diabétique de même que chez les patientes 4 et 15, elle est absente chez le sujet sain, l'autre femme enceinte non diabétique et le reste des patientes (figure 8).



**Figure 8: profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices révélées par PAGE. A et B : 1, 13 : sujet sain. 2, 12, 14, 24 : femmes enceintes non diabétiques. 3 à 11, 15 à 23: patientes diabétiques.**

Donc la bande B18 varie qualitativement ce qui lui confère la propriété de biomarqueur qualitatif contrairement aux bandes B9 et B11 qui varient quantitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs quantitatifs.

Deuxièmement, la comparaison, entre les profils électrophorétiques des patientes, révèle des différences au niveau des bandes B1, B5, B6 et B19.

En effet, la bande B1 est omniprésente mais son intensité varie d'un échantillon à un autre d'ailleurs son intensité est forte chez les patientes 3, 4 et 11, tandis que chez les patientes 8, 9, 10 et 14 l'intensité est moyenne, par contre chez les patientes 1, 5, 6, 13 et 15 il y a une faible intensité et cette dernière est à l'état de trace chez les patientes 2, 7, 12, 18 et 19 (figure 8).

D'autre part, la bande B5 est faiblement présente chez les patientes 3, 5, 6 et 8, alors qu'elle est absente chez les patientes 2, 4, 7 et 9, et son intensité est presque nulle chez le reste des patientes.

Quant à la bande B6, elle est présente chez toutes les patientes excepté la patiente 2 et sa présence se caractérise par une forte intensité chez les patientes 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10 et 11 et une intensité moyenne chez les patientes 12, 13, 14 et 15, voire une faible intensité chez les patientes 18 et 19, jusqu'à une intensité minimale chez les patientes 7 et 9 (figure 8).

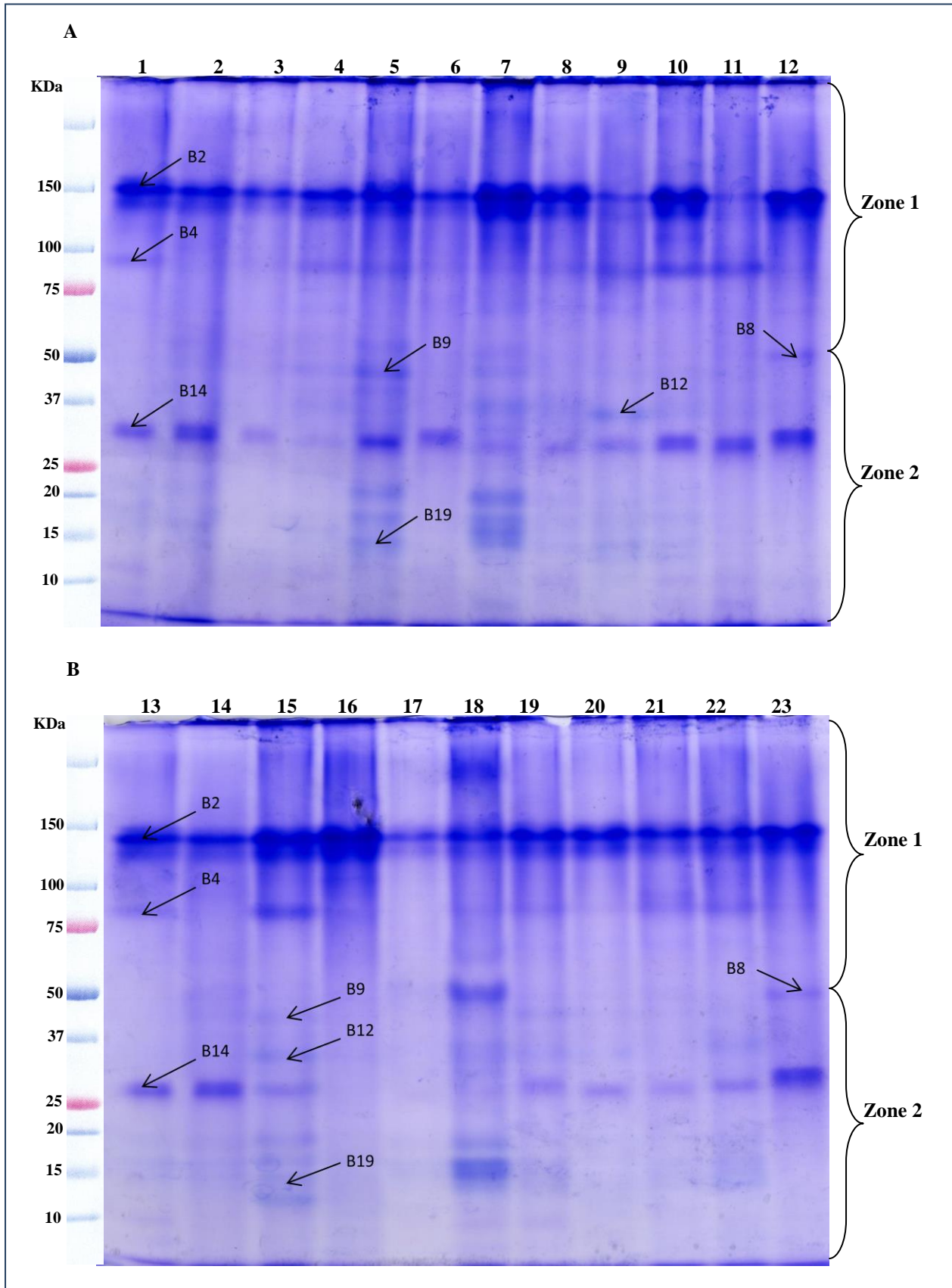
Enfin, la bande B19 se trouve moyennement présente chez la patiente 4 et faiblement présente chez les patientes 1, 8, 9, 11 et 14 et son intensité est presque nulle chez les patientes 2, 5, 6, 7, 15, 18 et 19, cependant elle est absente chez les patientes 3, 10, 12, 13 (figure 8).

Donc les bandes B1, B5, B6 et B19 varient quantitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs quantitatifs.

Ainsi, ces différences observées entre les profils électrophorétiques des malades sont probablement dues à des facteurs tels que : l'âge, l'hypertension artérielle et des pathologies associées.

### **1.1.3. Analyse des protéines salivaires fractionnées par PAGE dans les conditions non dénaturantes et réductrices**

L'observation des profils électrophorétiques du protéome salivaire des témoins et celui des patientes, révèle des variations dans la composition protéique. En effet, les différences se situent dans les deux zones des protéines salivaires de haut et de faible poids moléculaire contenant les bandes B2, B4, B9, B12, B14 et B19 qui sont les plus variables qualitativement et quantitativement (figure 9).



**Figure 9: profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et réductrices révélées par PAGE. A et B : 1, 13 : sujet sain. 2, 12, 14, 23 : femmes enceintes non diabétiques. 3 à 11, 15 à 22: patientes diabétiques.**



D'abord, la comparaison, entre les échantillons des témoins et des sujets malades, montre que la bande B4 est présente chez le sujet sain et une des femmes enceintes non diabétiques tandis qu'elle est absente chez l'autre et la patiente 12, cependant on note sa présence dans le reste des échantillons (figure 9).

En revanche, la bande B9 est absente chez le sujet sain et une des femmes enceintes non diabétiques ainsi que chez les patientes 1, 4, 6, 11 et 12 mais elle est présente l'autre femme enceinte témoin et dans le reste des échantillons (figure 9).

Quant à la bande B12, elle est présente chez les patientes 2, 3, 5, 7, 10, 13, 14, 15 et 19 alors qu'elle est absente chez le sujet sain, les deux femmes enceintes non diabétiques et le reste des patientes (figure 9).

Donc la bande B12 varie qualitativement ce qui lui confère la propriété de biomarqueur qualitatif contrairement aux bandes B4 et B9 qui varient quantitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs quantitatifs.

Ensuite, la comparaison, entre les profils électrophorétiques des patientes, démontre des différences au niveau des bandes B2, B14 et B19 (figure 9).

En effet, la bande B2 est omniprésente mais son intensité varie d'un échantillon à un autre, d'ailleurs chez les patientes 3, 5, 6, 8, 10, 11, 14 et 15 l'intensité est trop forte, tandis que chez les patientes 2, 13, 18 et 19 l'intensité est moyenne, par contre chez les patientes 1, 4, 7, 9 et 12 il ya une faible intensité (figure 9).

D'autre part, la bande B14 est faiblement présente chez la patiente 8 et son intensité est presque nulle chez les patientes 1, 3, 4, 9, 10, 13, 18 et 19 quoiqu'elle soit absente dans le reste des échantillons (figure 9).

Enfin, la bande B19 se trouve faiblement présente chez les patientes 3 et 5, et son intensité est presque nulle chez les patientes 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 et 19 tandis qu'elle est absente dans le reste des échantillons (figure 9).

Donc les bandes B2, B14 et B19 varient quantitativement ce qui leurs confère la propriété de biomarqueurs quantitatifs.

Ainsi, ces différences observées entre les profils électrophorétiques des patientes sont probablement dues à des facteurs tels que : les antécédents personnels de diabète, les antécédents de diabète gestationnel et des pathologies associées.

#### **1.1.4. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes et non réductrices**

L'évaluation des profils électrophorétiques de la salive des témoins et des malades fait apparaître des fluctuations au niveau des deux zones des protéines salivaires de haut et de faible poids moléculaire contenant les bandes B1, B3, B6, B7, B9 et B13 qui sont les plus variables qualitativement et quantitativement (figure 10).

En premier lieu, la comparaison, entre les échantillons des témoins et des patientes, montre que les bandes B7, B9 et B13 sont présentes uniquement chez deux patientes alors qu'elles sont absentes dans le reste des échantillons. A titre d'exemple, la bande B7 est présente chez les patientes 3 et 10, la bande B9 est présente chez les patientes 3 et 8, et la bande B13 est présente chez les patientes 3 et 4 (figure 10).

Donc les bandes B7, B9 et B13 varient qualitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs qualitatifs.

En second lieu, la comparaison, entre les profils électrophorétiques des patientes, révèle des différences au niveau des bandes B1, B3 et B6.

En effet, les bandes B1 et B6 sont omniprésentes mais leur intensité varie d'un échantillon à un autre. A titre d'exemple:

L'intensité de la bande B1 est forte chez les patientes 4, 5, 8, 9, 10 et 11, tandis que chez les patientes 3, 6, 13, 14 l'intensité est moyenne, par contre chez les patientes 1, 2, 7, 12, 15, 18 et 19 il y a une faible intensité. En outre, la bande B6 est fortement présente chez les patientes 8 et 9 et moyennement présente chez les patientes 3 et 4, cependant son intensité est faible chez le reste des patientes. Quant à la bande B3, on note sa faible présence chez toutes les patientes excepté la patiente 9 (figure 10).

Donc les bandes B1, B3 et B6 varient quantitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs quantitatifs.

Ainsi, ces différences observées entre les profils électrophorétiques des malades sont probablement dues à des facteurs tels que : les antécédents de bébé macrosome, la glycosurie et des pathologies associées.

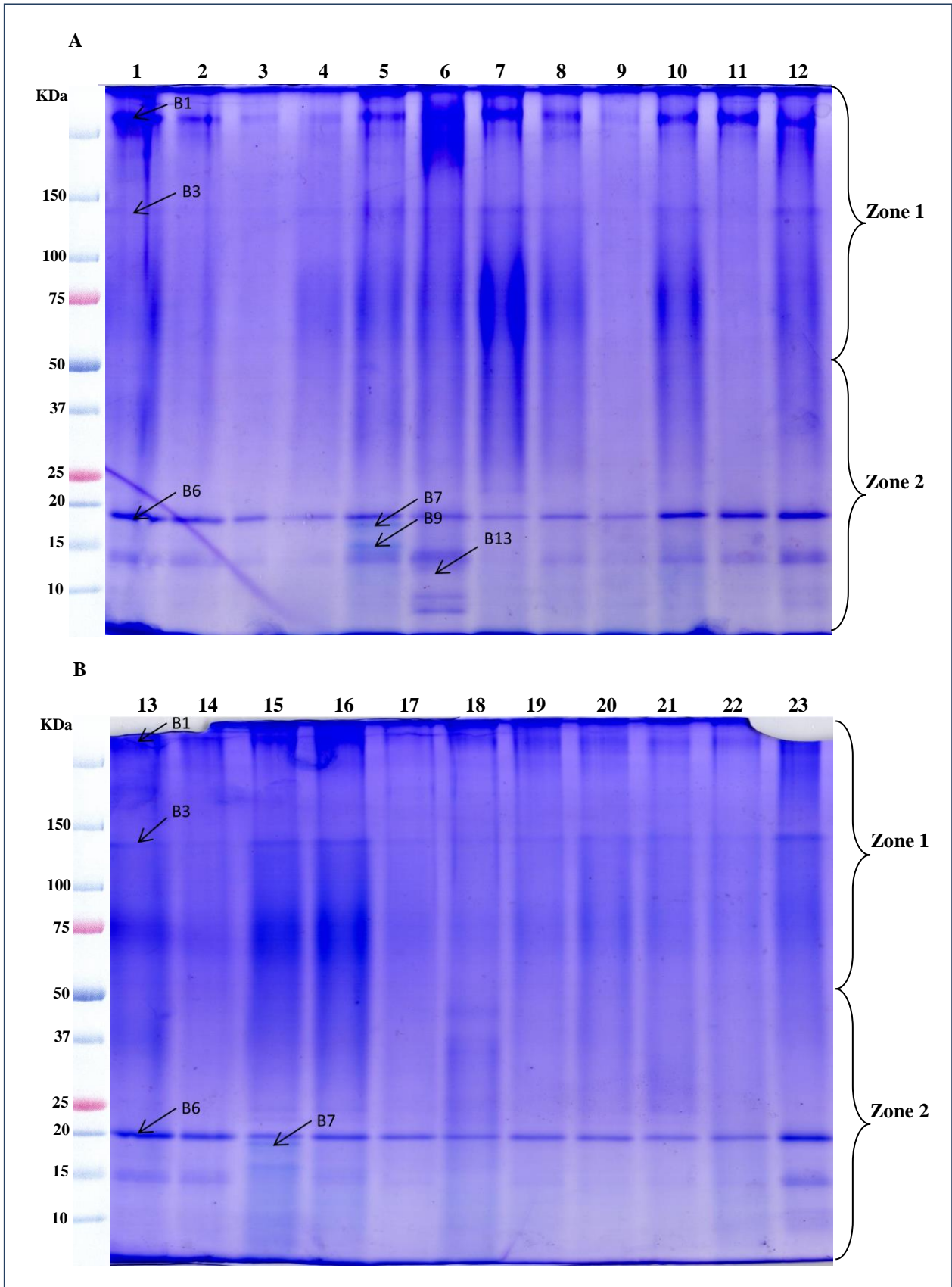


Figure 10: profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE. A et B : 1, 13 : sujet sain. 2, 12, 14, 23 : femmes enceintes non diabétiques. 3 à 11, 15 à 22: patientes diabétiques.



## 2. Etude de la variabilité des protéines salivaires

### 2.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et réduites

#### 2.1.1. Etude des protéines salivaires de HPM

L'évaluation de la variabilité des protéines salivaires des 20 échantillons indique la présence de 10 protéines salivaires de haut poids moléculaire et de mobilités différentes localisées dans la zone 1 (tableau 2).

**Tableau 2 : variabilité des protéines salivaires de HPM**

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	39	E9	5 %
2	40	E9	5 %
3	43	E9, E11	10 %
4	47	E9	5 %
5	50	E9	5 %
6	56	E9	5 %
7	62	E9	5 %
8	66	S, E5, E9, E13	20 %
9	73	E3, E4, E5, E8, E13, E15, E18	35 %
10	76	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18, E 19, S,E16,E17	95 %

D'après le tableau ci dessus, on constate une grande variabilité des protéines salivaires de haut poids moléculaire. L'observation de ces dernières dans l'ordre décroissant des fréquences, démontre, que la bande protéique 10 dont la mobilité est de 76 mm, est la plus fréquente avec un taux de 95 %, ce qui implique sa dominance dans la zone 1. Suivie de la bande protéique 9, dont la mobilité est de 73 mm, qui se trouve beaucoup moins fréquente que la précédente avec un taux de 35 %. Enfin, on retrouve les bandes protéiques 1, 2, 4, 5, 6 et 7 dont les mobilités sont respectivement 39, 40, 47, 50, 56 et 62 mm avec une fréquence minime de 5 %.

#### 2.1.2. Etude des protéines salivaires de FPM

L'étude de la variabilité des protéines salivaires des 20 échantillons révèle la présence de 21 protéines salivaires de faible poids moléculaire et de mobilités différentes localisées dans la zone 2 (tableau 3).

Tableau 3 : variabilité des protéines salivaires de FPM

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	82	E9, E11.	10 %
2	84	E1,E3,E4,E5,E8,E9,E11,E12,E13,E15,E18, <i>S,E16,E17</i>	70 %
3	86	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E8,E9, <i>S,E16, E17.</i>	55 %
4	90	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
5	92	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
6	96	E9.	5 %
7	99	E1,E5, E6,E9, <i>S,E17.</i>	30 %
8	105	E1,E2,E3,E4,E5, <i>S,E16.</i>	35 %
9	108	E6,E7,E8, <i>E17.</i>	20 %
10	114	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
11	115	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
12	120	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E8,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16, E17.</i>	90 %
13	121	E9.	5 %
14	124	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E10,E11,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16.</i>	85 %
15	125	E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>E17.</i>	50 %
16	129	E9,E11, <i>E17.</i>	15 %
17	132	E9,E10,E11.	15 %
18	136	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
19	141	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16, E17.</i>	95 %
20	145	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
21	147	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %

D'après le tableau ci dessus, on distingue un grand polymorphisme des protéines salivaires de faible poids moléculaire, qui se situe au niveau des bandes protéiques 4, 5, 10, 11, 18, 20 et 21 dont les mobilités sont respectivement 90, 92, 114, 115, 136, 145 et 147 mm; elles restent les plus fréquentes avec un pourcentage maximum de 100 %, ce qui montre leur dominance dans la zone 2. Puis, on retrouve la bande protéique 15, dont la mobilité est de 125 mm, et elle est moins fréquente que les précédentes, avec un pourcentage moyen de 50 %. Enfin, on note

les bandes protéiques 6 et 13 dont les mobilités sont respectivement 96 mm et 121 mm, et restent très faiblement fréquentes avec un pourcentage minime de 5 %.

## 2.2. Etude de la variabilité des protéines salivaires non dénaturées et non réduites

### 2.2.1. Etude des protéines salivaires de HPM

Les différentes protéines salivaires de haut poids moléculaire observées dans la zone 1 sont au nombre de 14 avec des mobilités différentes (tableau 4).

**Tableau 4 : variabilité des protéines salivaires de HPM**

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	10	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, S,E16,E17.	100 %
2	15	E3,E13.	10 %
3	18	E2,E4,E5,E6,E8,E9,E13,E15, E17.	45 %
4	22	E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E13,E15,E18,E19,S,E16,E17.	75 %
5	30	E1,E3,E5,E6,E8,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, S,E16.	75 %
6	33	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, S,E16,E17.	100 %
7	35	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E8,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19,S,E16, E17	90 %
8	38	E3,E5,E10,E11,E18.	25 %
9	49	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E11,E12,E13,E14,E16,E17.	75 %
10	52	E1,E3,E4,E8,E9,E11,E13,E14,E15, S,E16,E17.	60 %
11	55	E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E13,E14,E15,E18,E19, S,E17.	85 %
12	62	E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E14,E18, E17.	65 %
13	74	E3,E4,E6,E10,E11,E12.	30 %
14	80	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E15,E18,S,E16,E17.	85 %

D'après le tableau ci dessus, on note une variabilité importante des protéines salivaires de haut poids moléculaire. L'observation de ces dernières dans l'ordre décroissant des fréquences, montre, que les bandes protéiques 1 et 6 dont les mobilités sont respectivement 10 mm et 33 mm, sont les plus fréquentes avec un pourcentage maximum de 100 %, ce qui implique leur dominance dans la zone 1. Suivies de la bande protéique 3, dont la mobilité est de 18 mm, qui se trouve beaucoup moins fréquente que les précédentes avec un pourcentage moyen de 45 %.

Enfin, la plus faible fréquence se situe au niveau de la bande protéique 2 dont la mobilité est de 15 mm avec un pourcentage minime de 10 %.

### 2.2.2. Etude des protéines salivaires de FPM

Les différentes protéines salivaires de faible poids moléculaire observées dans la zone 2 sont au nombre de 11 avec des mobilités différentes (tableau 5).

**Tableau 5: variabilité des protéines salivaires de FPM**

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	85	E2,E3,E4,E5,E7,E10,E11,E12.	40 %
2	95	E4,E5,E6,E10,E13.	25 %
3	98	E7,E8,E13.	15 %
4	102	E4, E15, <i>E17</i> .	15 %
5	104	E1,E2,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E11,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17</i> .	80 %
6	106	E1,E2,E3,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16</i> .	80 %
7	125	E3,E5,E6,E7,E8,E9,E13.	65 %
8	131	E1,E3,E5,E6,E10,E11,E15,E19, <i>S,E16,E17</i> .	55 %
9	138	E3,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E13,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17</i> .	75 %
10	148	E1,E2,E6,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16</i> .	75 %
11	157	E4,E8,E9,E10,E11,E15, <i>S,E16,E17</i> .	45 %

D'après le tableau ci dessus, on remarque des fluctuations des protéines salivaires de faible poids moléculaire; ces variations apparaissent au niveau des bandes protéiques 5 et 6 dont les mobilités sont respectivement 104 mm et 106 mm. Elles restent les plus fréquentes avec un taux de 80 %, ce qui montre leur dominance dans la zone 2. Puis, on retrouve la bande protéique 11, dont la mobilité est de 157 mm, qui est moins fréquente que les précédentes avec un taux de 45 %. Enfin, la plus faible fréquence se situe au niveau des bandes protéiques 3 et 4 dont les mobilités sont respectivement 98 mm et 102 mm, qui se trouvent avec un taux de 15 %.

### 2.3. Etude de la variabilité des protéines salivaires non dénaturées et réduites

#### 2.3.1. Etude des protéines salivaires de HPM

La détermination de la variabilité des protéines salivaires des 20 échantillons, révèle la présence de 8 protéines salivaires de haut poids moléculaire et de mobilités différentes localisées dans la zone 1 (tableau 6).

**Tableau 6: variabilité des protéines salivaires de HPM**

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	28	E3,E5,E6,E8,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19,S,E16,E17.	75 %
2	30	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19,S,E16,E17.	100 %
3	35	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19,S,E16,E17.	100 %
4	50	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E13,E14,E15,E18,E19,S,E17.	90 %
5	60	E1,E5,E6,E7,E9,E14,E18,E19, E17.	45 %
6	63	E2,E13, E16.	15 %
7	73	E2,E3,E5,E13, E16.	25 %
8	75	E17	5 %

D'après le tableau ci dessus, on distingue un grand polymorphisme des protéines salivaires de haut poids moléculaire, qui se situe au niveau des bandes protéiques 2 et 3 dont les mobilités sont respectivement 30 mm et 35 mm, qui sont les plus fréquentes avec un pourcentage maximum de 100 %, ce qui implique leur dominance dans la zone 1. Suivies de la bande protéique 5, dont la mobilité est de 60 mm, qui est moins fréquente que les précédentes, avec un pourcentage moyen de 45 %. Enfin, on retrouve la bande protéique 8 dont la mobilité est de 75 mm, qui est très faiblement fréquente avec un pourcentage minime de 5 %.

#### 2.3.2. Etude des protéines salivaires de FPM

La mesure de la variabilité des protéines salivaires des 20 échantillons, indique la présence de 13 protéines salivaires de faible poids moléculaire et de mobilités différentes localisées dans la zone 2 (tableau 7).

**Tableau 7 : variabilité des protéines salivaires de FPM**

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	80	E2,E3,E5,E7,E8,E9,E10,E13,E14,E15,E18,E19,E16.	65 %
2	85	E1,E2,E3,E5,E6,E7,E8,E9,E13,E16,E17.	55 %
3	90	E3,E12, E17.	15 %
4	93	E2,E3,E5,E7,E10,E13,E14,E15,E19,S,E16,E17.	45 %
5	97	E1,E2,E3,E7,E8,E9,E10,E11,E13,E14,E15,E18,E19,E16,E17.	70 %
6	100	E1,E3,E4,E8,E9,E10,E14,E18,E19,S,E16,E17.	60 %
7	102	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E13,E14,E15,E18,E19,S, E16,E17.	90 %
8	115	E3,E5,E6,E7,E8,E10,E12,E13,E14,E15,E18,E19,S,E16.	70 %
9	122	E2,E3,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E13,E14,E15,E18,E19,S,E16.	80 %
10	126	E2,E5,E6,E10,E11,E12,E13,E14,E18,E19,S,E16.	60 %
11	130	E2,E3,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E13,E14,E19.	60 %
12	140	E1,E2,E6,E8,E9,E10,E13,E14, E19,S,E16,E17.	60 %
13	148	E1,E2,E3,E4,E5,E8,E9,E13,E14,S,E16,E17.	60 %

D'après le tableau ci dessus, on constate des fluctuations des protéines salivaires de faible poids moléculaire, qui résident au niveau de la bande protéique 7 dont la mobilité est de 102 mm qui est la plus fréquente avec un taux de 90 %, ce qui montre sa dominance dans la zone 2. Suivie de la bande protéique 4, dont la mobilité est de 93 mm, qui se trouve moins fréquente que la précédente avec un taux de 45 %. Enfin, la plus faible fréquence se situe au niveau de la bande protéique 3 dont la mobilité est de 90 mm, qui se trouve avec un taux de 15 %.

#### 2.4. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et non réduites

##### 2.4.1. Etude des protéines salivaires de HPM

Les différentes protéines salivaires de haut poids moléculaire observées dans la zone 1 sont au nombre de 3 avec des mobilités différentes (tableau 8).

**Tableau 8 : variabilité des protéines salivaires de HPM**

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	8	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19,S,E16,E17	100 %
2	11	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E14,E15,E18,E19,S,E16,E17	80 %
3	35	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18, E19,S,E16,E17	95 %

L'observation du tableau ci dessus démontre que toutes les protéines salivaires de haut poids moléculaire localisées dans la zone 1 sont fréquentes avec un taux variant entre 80 % et 100%.

#### 2.4.2. Etudes des protéines salivaires de FPM

Les différentes protéines salivaires de faible poids moléculaire observées dans la zone 2 sont au nombre de 13 avec des mobilités différentes (tableau 9).

**Tableau 9: variabilité des protéines salivaires de FPM**

<b>Bandes</b>	<b>Mobilités (mm)</b>	<b>Echantillons (E)</b>	<b>Fréquences (%)</b>
1	118	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	95 %
2	121	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	95 %
3	126	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
4	128	E3,E10.	10 %
5	130	E3,E10.	10 %
6	134	E3,E8.	10 %
7	136	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
8	137	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
9	138	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
10	140	E3,E4.	10 %
11	147	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
12	149	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %
13	151	E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E18,E19, <i>S,E16,E17.</i>	100 %

L'observation du tableau ci dessus, révèle une bipolarité des protéines salivaires de faible poids moléculaire, qui se situe au niveau des bandes protéiques 3, 7, 8, 9, 11, 12 et 13 dont les mobilités sont respectivement 126, 136, 137, 138, 147, 149 et 151 mm, qui sont les plus fréquentes avec un pourcentage maximum de 100 %, ce qui implique leur dominance dans la zone 2. Enfin, on retrouve les bandes protéiques 4, 5, 6 et 10 dont les mobilités sont respectivement 128, 130, 134 et 140 mm qui sont très faiblement fréquentes avec un pourcentage minime de 10 %.

### 3. Classification hiérarchique des protéines salivaires

Les relations entre les différentes protéines salivaires réduites et non réduites fractionnées par SDS-PAGE ou PAGE sont établies à partir de leurs ressemblances génétiques pour cela, nous avons fait appel à une représentation sous forme d'arbre hiérarchique ou dendrogramme qui constitue sans doute la représentation la plus parlante. Les regroupements effectués à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemble des éléments qui sont plus ou moins proche entre eux. Plus on avance dans le regroupement (plus on se rapproche du sommet de l'arbre), plus le nombre de points déjà agrégés est important et plus la distance minimale entre les classes qu'il reste à agrégés est importante. On peut associer à chacun des nœuds de l'arbre cette « plus petite distance ».

La représentation sous forme de dendrogramme d'une classification hiérarchique matérialise bien le fait que les classes formées au cours du processus de classification constituent une hiérarchie indicée de classe partiellement emboîtées les unes dans les autres.

#### 3.1. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégations révèle de nombreux groupes (figure 11). A la distance d'agrégation 4.25, l'ensemble des échantillons est divisé en deux groupes. Le premier groupe contient uniquement la patiente 9, tandis que le second groupe est divisé à son tour en deux sous-groupes dont le premier est constitué de la patiente 11, et le deuxième est subdivisé lui même en deux autres sous-groupes dont le premier constitue le témoin 2 et le deuxième renferme le reste des échantillons.

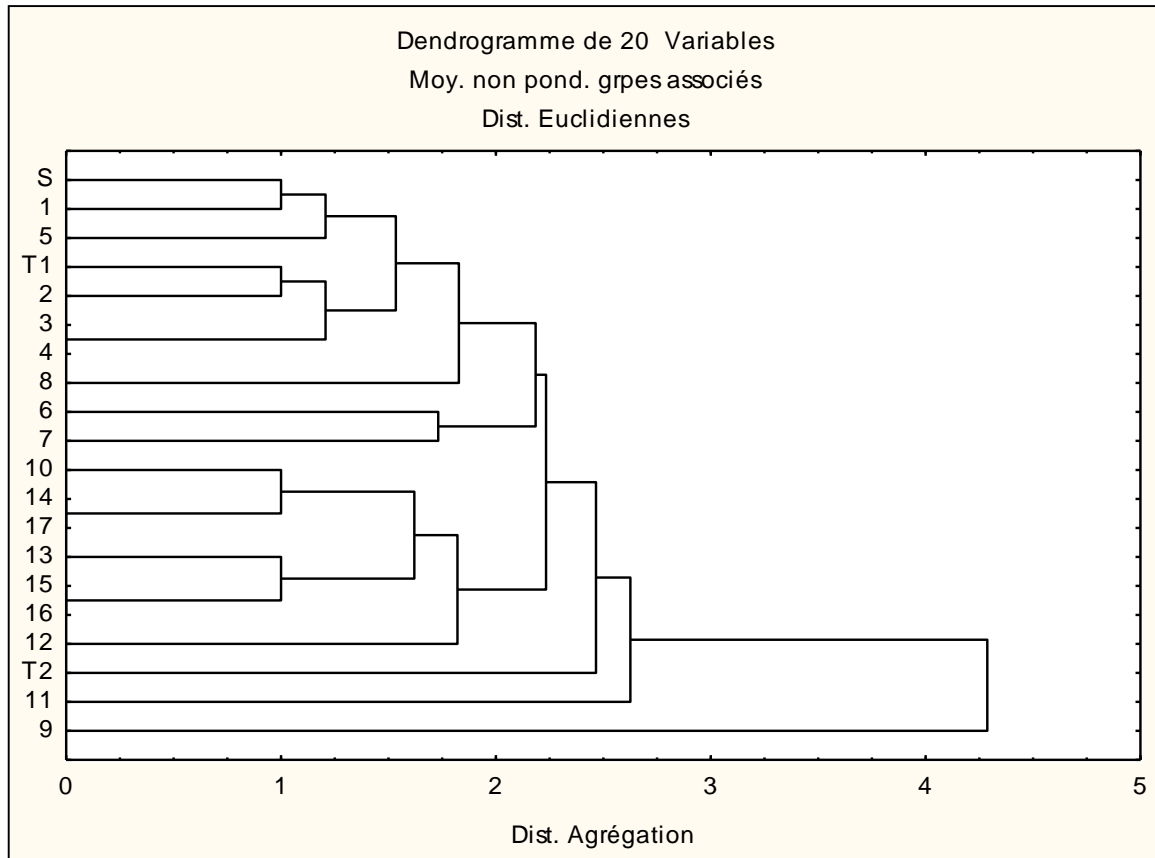
La valeur moyenne des distances d'agrégations est de 2,5 (figure 11), dans cet intervalle, le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la composition en protéines salivaires de presque tous les échantillons.

L'état physiologique et pathologique des témoins et des patientes, et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires ne sont pas corrélés malgré les différences qui existent entre les différentes patientes recrutées d'une part et les différences qui existent entre les patientes et les témoins d'autre part. A titre d'exemples : le sujet sain et la patiente 1, le témoin 1 et la patiente 2, la patiente 6 et la patiente 7.

A la distance d'agrégation 1, le sujet sain et la patiente 1 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la divergence qui existe entre eux. En effet, la patiente 1 est âgée de 36 ans, primipare, en aménorrhée est de 34 SA, et elle a des antécédents familiaux et



personnels de diabète. Cliniquement, la malade est obèse, avec le stress comme facteur déclenchant du diabète gestationnel.



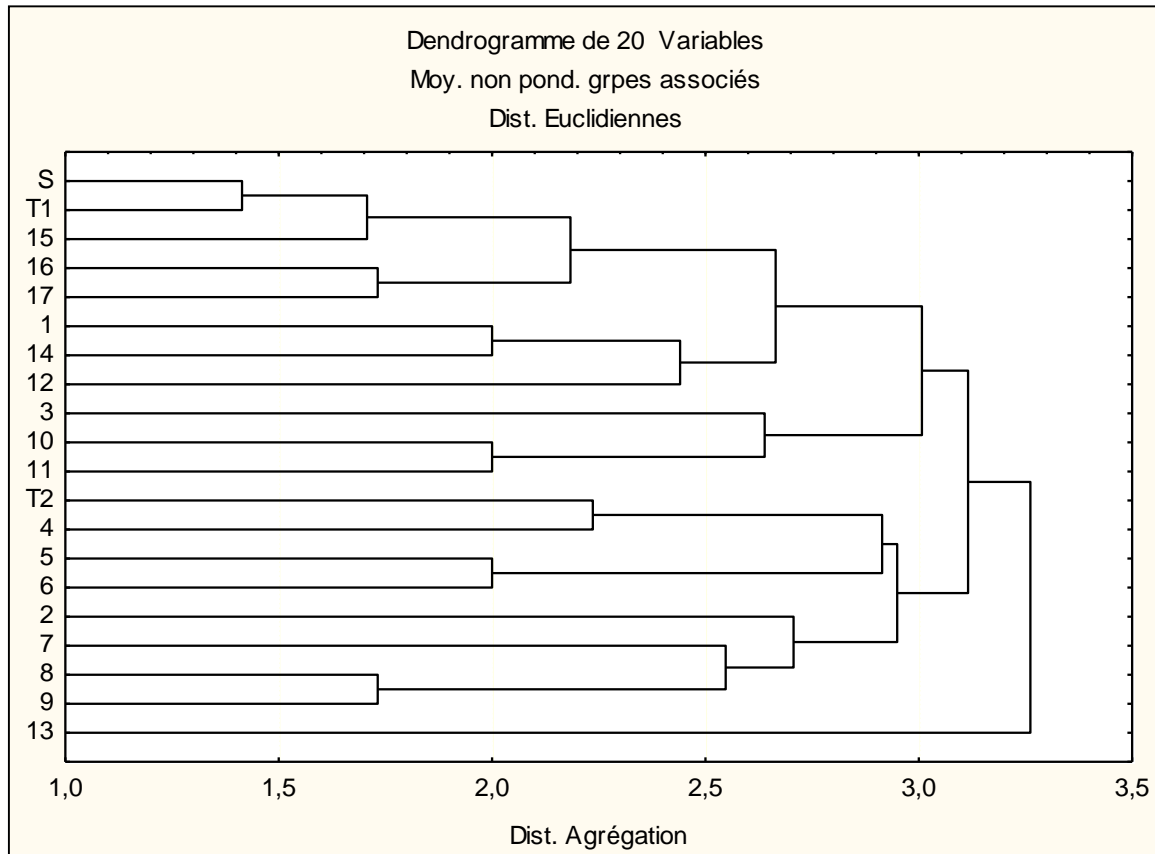
**Figure 11 : dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices fractionnés par SDS/PAGE**

A la même distance d'agrégation, le témoin 1 et la patiente 2 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré les différences qui existent entre eux (figure 11). En effet, la patiente 2 est âgée de 38 ans, deuxième geste, en aménorrhée est de 36 SA, avec obésité clinique. Elle a des antécédents familiaux de diabète, des antécédents personnels d'hypertension artérielle lors de la première grossesse. Alors que le témoin 1 est une femme enceinte âgée de 18 ans, en aménorrhée de 36 SA, enceinte sans aucune pathologie.

A la distance d'agrégation 1.75, un autre exemple concernant les patientes 6 et 7 qui forment entre elles un clade (figure 11). La patiente 6 âgée de 33 ans, en aménorrhée de 37 SA, deuxième geste, obèse cliniquement et dans les antécédents personnels on retrouve trois avortements, avec des antécédents familiaux de diabète. Alors que la patiente 7 âgée de 35 ans, obèse, en aménorrhée de 37 SA, présente sa cinquième grossesse, avec des antécédents familiaux de diabète.

### 3.2. Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégations révèle de nombreux groupes (figure 12). A la distance d'agrégation 3,5, l'ensemble des échantillons est divisé en deux groupes. Le premier groupe contient uniquement la patiente 13, tandis que le second groupe est divisé à son tour en deux sous-groupes. Le premier comprend les échantillons S, T1, 15, 16, 17, 1, 14, 12, 3, 10 et 11, et le deuxième sous-groupe renferme le reste des échantillons (figure 12)



**Figure 22 : dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions non dénaturantes et non réductrices fractionnés par PAGE**

La valeur moyenne des distances d'agrégations est de 2,25 (figure 12), dans cet intervalle, le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la composition en protéines salivaires de presque tous les échantillons.

L'état physiologique et pathologique des patientes et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires (figure 12) ne sont pas corrélés malgré les différences qui existent entre les différentes patientes recrutées d'une part et les différences qui existent entre les patientes et les témoins d'autre part. A titre d'exemple : le sujet sain et le témoin 1, la patiente 10 et 11, le T2 et la patiente 4, la patiente 5 et 6, la patiente 8 et 9.

A la distance d'agrégation 1.5, le sujet sain et le témoin 1 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la divergence qui existe entre eux (figure 12). En effet, le témoin 1 est une femme de 18 ans, enceinte de 36 SA, non diabétique sans aucune pathologie.

A la distance d'agrégation 2.25, le témoin 2 et la patiente 4 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la divergence qui existe entre eux (figure 12). En effet, la patiente 4 âgée de 37 ans, primipare, grossesse précieuse, enceinte de 36 SA, obèse, hypertendue connue, a eu un choc émotionnel déclenchant son diabète gestationnel. Alors que, le témoin 2 est une femme de 32 ans, enceinte de 39 SA, non diabétique sans aucune pathologie.

A la distance d'agrégation 1.75, un autre exemple concernant les patientes 8 et 9 qui forment entre elles un clade (figure 12), la patiente 8 âgée de 32 ans, enceinte de 37 SA, troisième geste, est obèse, hypertendue, diabétique depuis la deuxième grossesse avec macrosomie, et notion de diabète dans la famille. Alors que, la patiente 9, âgée de 42 ans, enceinte de 35 SA, troisième geste, présente un hydramnios, avec des antécédents de bébé macrosome.

### 3.3. Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et réduites

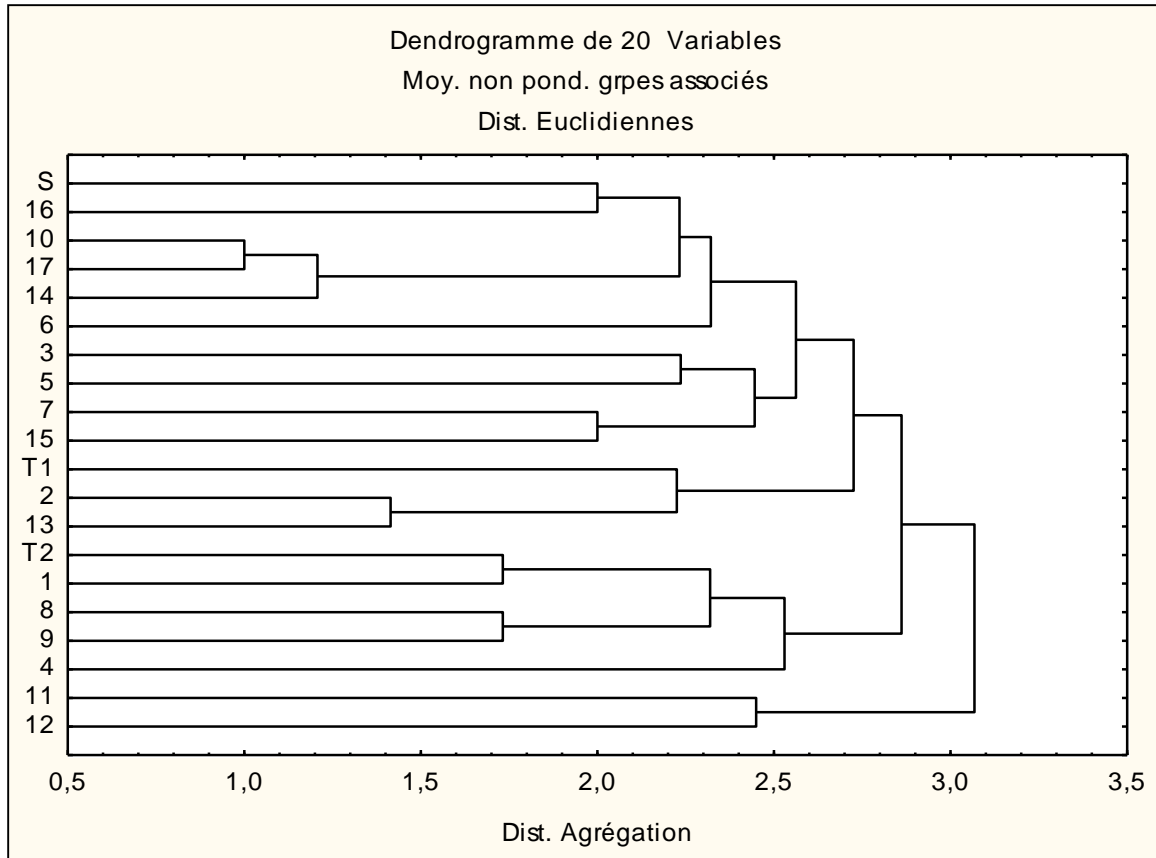
Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégations révèle de nombreux groupes (figure 13). A la distance 3, l'ensemble des échantillons est divisé en deux groupes : le premier groupe contient deux patientes 11 et 12 qui forment entre elles un clade (avec des niveaux de similarités élevés), tandis que le second groupe est divisé à son tour en deux sous-groupes; le premier comprend les patientes 1, 8, 9, 4 et le témoin 2 et le deuxième sous-groupe renferme le reste des échantillons.

La valeur moyenne des distances d'agrégations est de 2 (figure 13), dans cet intervalle, le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la composition en protéines salivaires de presque tous les échantillons.

L'état physiologique et pathologique des patientes et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires ne sont pas corrélés malgré les différences qui existent entre les différentes patientes recrutées d'une part et les différences qui existent entre les patientes et les témoins d'autre part. A titre d'exemple : le sujet sain et la patiente 16, le témoin 2 et la patiente 1, (13 et 2), (7 et 15), (3 et 5) et (10 et 19) (figure 13).

A la distance d'agrégation 2, le sujet sain et la patiente 16 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la divergence qui existe entre eux (figure 13). En effet, la patiente 16

est une femme enceinte de 30 SA, primipare, diabétique âgée de 26 ans, obèse, porteuse d'un bébé macrosome; notion de diabète dans les antécédents personnels et familiaux.



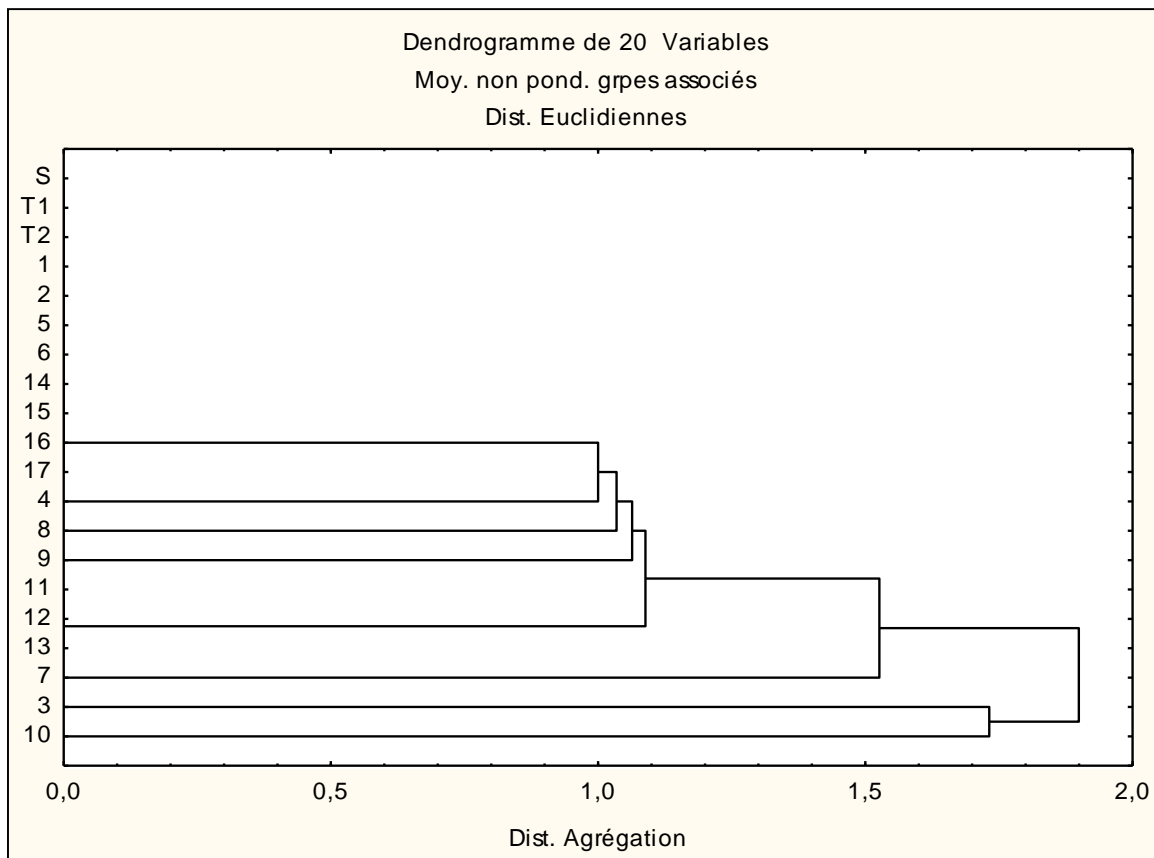
**Figure 33 : dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions non dénaturantes et réductrices fractionnés par PAGE**

A la distance d'agrégation 1.75, le témoin 2 et la patiente 1 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la divergence qui existe entre eux (figure 13). En effet, la patiente 1 est primipare de 36 ans, enceinte de 34 SA, obèse, avec des antécédents familiaux et personnels de diabète, le stress comme facteur déclenchant de diabète gestationnel. Alors que, le témoin 2 est une femme de 32 ans, enceinte de 39 SA, non diabétique, sans aucune pathologie.

A la distance d'agrégation 1, un autre exemple concernant les patientes 10 et 19 qui forment entre elles un clade (figure 13), la patiente 10 est âgée de 29 ans, enceinte de 35 SA, primipare, obèse, hypertendu, diabétique connue avec des antécédents familiaux de diabète et antécédents personnels de cinq avortements. Alors que, chez la patiente 19 âgée de 43 ans, enceinte de 39 SA, avec bébé macrosome, quatrième geste, on retrouve la notion de diabète personnel et familial.

### 3.4. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et non réduites

Le dendrogramme obtenue à partir des distances d'agrégations révèle de nombreux groupes (figure 14). A la distance d'agrégation 2, l'ensemble des échantillons est divisé en deux groupes : le premier groupe contient deux patientes 3 et 10 qui forment entre elles un clade (avec des niveaux de similarités élevés), tandis que le second groupe est divisé à son tour en 2 sous-groupes , le premier sous-groupe constitue la patiente 7 et le deuxième sous-groupe renferme le reste des échantillons (figure 14).



**Figure 14 : dendrogramme des 20 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et non réductrices fractionnés par SDS/PAGE**

La valeur moyenne des distances d'agrégations est de 1 (figure 14), dans cet intervalle, le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la composition en protéines salivaires de presque tous les échantillons.

L'état physiologique et pathologique des patientes et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires (figure 14) ne sont pas corrélés malgré les différences qui existent entre les patientes recrutées entre elles d'une part et les différences qui existent entre

les patientes et les témoins d'autre part. A titre d'exemple : la patiente 16 et la patiente 4, la patiente 3 et 10.

A la distance d'agrégation 1, les patientes 4 et 16 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la divergence qui existe entre eux (figure 14). En effet, la patiente 4 est âgée de 37 ans, primipare, grossesse précieuse, enceinte de 36 SA, obèse, hypertendue connue, a eu un choc émotionnel déclenchant son diabète gestationnel. Alors que, la patiente 16 est une femme enceinte de 30 SA, primipare, diabétique âgée de 26 ans, obèse, porteuse d'un bébé macrosome, notion de diabète dans les antécédents personnels et familiaux.

A la distance d'agrégation 1.75, un autre exemple concernant les patientes 10 et 3 qui forment entre elles un clade (figure 14), la patiente 10 est âgée de 29 ans, enceinte de 35 SA, primipare, obèse, hypertendu, diabétique connue avec des antécédents familiaux de diabète et antécédents personnels de cinq avortements. Alors que, la patiente 3 âgée de 41 ans, deuxième geste après avoir avorté 2 fois, diabétique connue depuis le premier avortement, avec des antécédents familiaux de diabète et des antécédents personnels de diabète gestationnel et de bébé macrosome (L' apparition du diabète est survenue après le premier avortement et depuis elle a développé un diabète a long terme).

#### 4. Etablissement des diagrammes types

L'analyse des diagrammes électrophorétiques montre que ces derniers présentent de nettes différences en composition protéique à la fois qualitatives et quantitatives pour les différents patients.

Un tel ensemble de résultats peut être alors exploité en estimant le degré de différence (ou d'analogie) entre les diagrammes des individus considérés deux à deux.

Cette représentation nous permet donc de conserver une image réelle des gels pouvant servir comme base de données pour l'identification.

Nous rapportons dans les tableaux ci-dessous les diagrammes types pour toutes les conditions d'extractions des protéines salivaires des patientes malades et des sujets sains (1 : Présence de la bande, 0 : Absence de la bande, M : Mobilités, E : échantillons).

**Tableau 10: diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS-PAGE**

	S	T1	T2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
B12	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
B13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B17	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B18	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B19	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B24	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
B25	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B26	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
B27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
B28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Tableau 11: diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions non dénaturantes et non réductrices révélées par PAGE**

	S	T1	T2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B3	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
B4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1
B5	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
B9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
B10	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
B11	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B12	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
B13	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
B14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
B15	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
B16	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
B17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B18	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B19	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
B20	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B21	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
B22	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
B23	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
B24	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B25	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0



**Tableau 12: diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions non dénaturantes et réductrices révélées par PAGE**

	S	T1	T2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
B1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B5	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1
B6	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B7	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
B10	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
B11	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B12	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
B13	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
B14	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
B15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
B16	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
B17	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B18	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
B19	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
B20	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
B21	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0

**Tableau 13: diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE**

	S	T1	T2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B13	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**5. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons**

L'indice de similarité ou indice de ressemblance (IRS) a été calculé, en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un, au moins, des diagrammes des échantillons comparés. L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes d'une autre c'est-à-dire qu'ils ont la même mobilité.

$$IRS = IAS / N \times 100$$

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances et inversement, lorsque les diagrammes apparaissent très voisins. La plupart des échantillons reste différenciable car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative. Les valeurs de l'IRS sont rassemblées dans les tableaux 10, 11, 12 et 13.

**5.1. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites**

Les indices de similarité ont été calculés pour les 17 femmes atteintes de diabète gestationnel, ils sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau 14. Cette matrice fournit les valeurs d'IRS trouvées entre les diagrammes protéiques comparés deux à deux. Il en ressort que l'indice de similarité se situe entre 29 % et 100 %.

**Tableau 14 : indices de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites révélées par SDS/PAGE**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
100	87	87	87	88	81	63	76	38	65	60	62	67	69	71	71	69	1
	100	87	87	76	80	71	75	31	73	58	60	65	79	69	69	79	2
		100	100	88	71	62	87	33	65	60	62	76	69	81	81	69	3
			100	88	71	62	87	33	65	60	62	76	69	81	81	69	4
				100	72	55	78	40	58	55	55	78	61	72	72	61	5
					100	79	81	34	69	55	56	61	73	65	65	73	6
						100	73	29	71	56	57	63	77	67	67	77	7
							100	33	65	60	63	76	69	81	81	69	8
								100	36	50	33	38	32	34	34	32	9
									100	76	71	75	92	80	80	92	10
										100	65	68	71	72	72	71	11
											100	73	77	79	79	77	12
												100	80	93	93	80	13
													100	86	86	100	14
														100	100	86	15
															100	86	16
																100	17

D'après le tableau ci dessus, on constate d'abord des valeurs d'IRS moyennes qui varient entre les différentes patientes dans l'intervalle de 29 % à 50 %. A titre d'exemple: IRS à 29 % entre les patientes 9 et 7, IRS à 36 % entre les patientes 10 et 9, IRS à 40 % entre les patientes 9 et 5, IRS à 50 % entre les patientes 11 et 9. De ce fait, ces différentes patientes présentent des diagrammes proches, avec autant de ressemblances que de dissemblances, ce qui fait penser que la composition protéique est presque la même.

Ensuite, on distingue des valeurs d'IRS importantes qui fluctuent entre 50 % et 80 %. A titre d'exemple:

- IRS à 60 % entre les patientes: 11 et 1, 11 et 3, 11 et 4, 11 et 8, 12 et 2.
- IRS à 75 % entre les patientes 8 et 2, également entre les patientes 13 et 10.
- IRS à 80 % entre les patientes 6 et 2, 14 et 13, 15 et 10, 16 et 10, 17 et 13.

Ainsi, les diagrammes de ces différentes patientes présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique.

Enfin, des valeurs maximales d'IRS égales à 100 % sont observées entre les patientes 4 et 3, 16 et 15, 17 et 14. Ce qui signifie que ces différentes patientes présentent des diagrammes identiques avec la même composition protéique.

## **5.2. Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées et non réduites**

Les indices de similarité ont été calculés pour les 17 patientes, ils sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau 15. Cette matrice fournit les valeurs d'IRS trouvées entre les diagrammes protéiques comparés deux à deux. Il en ressort que l'indice de similarité se situe entre 28 % et 83 %.

L'observation de ce tableau, indique premièrement des valeurs d'IRS moyennes qui varient entre les différentes patientes dans l'intervalle de 28 % à 50 %. A titre d'exemple:

- IRS à 28 % entre les patientes 17 et 4,
- IRS à 35 % entre les patientes 4 et 1, 12 et 5, 12 et 7.
- IRS à 45 % entre les patientes 3 et 1, 14 et 3, 17 et 3, 7 et 4, 10 et 4, 13 et 7, 16 et 13.
- IRS à 50 % entre les patientes 16 et 1, 11 et 2, 9 et 3, 13 et 5, 15 et 5, 7 et 6, 17 et 10, 14 et 12, 14 et 13, 17 et 13, 15 et 14.

**Tableau 15 : indices de similarité des protéines salivaires non dénaturantes et non réduites révélées par PAGE**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
100	44	45	35	40	47	33	53	44	42	61	62	40	69	59	50	57	1
	100	43	55	53	53	56	58	59	40	50	47	40	53	47	56	44	2
		100	48	67	59	55	57	50	62	71	47	54	45	48	55	45	3
			100	57	57	45	54	55	45	54	37	39	42	52	38	28	4
				100	79	58	59	52	57	59	35	50	40	50	58	47	5
					100	50	67	60	57	59	42	57	47	57	58	55	6
						100	63	65	38	48	35	45	47	38	53	41	7
							100	83	48	64	40	70	61	70	63	53	8
								100	41	57	32	55	53	63	55	44	9
									100	79	53	39	42	52	61	50	10
										100	55	42	61	62	63	53	11
											100	37	50	37	44	40	12
												100	50	52	45	50	13
													100	50	60	57	14
														100	61	69	15
															100	71	16
																100	17

Ainsi, ces différentes patientes présentent des diagrammes voisins, avec autant de ressemblances que de dissemblances, ce qui fait penser que la composition protéique est presque la même.

Deuxièmement, on distingue des valeurs d'IRS importantes qui fluctuent entre 50 % et 83 %.

A titre d'exemple:

- IRS à 60 % entre la patiente 9 et la patiente 6, également entre les patientes 16 et 14.
- IRS à 70 % entre la patientes 13 et 8, 15 et 8.
- IRS à 83 % entre la patiente 9 et la patiente 8.

Ainsi, les diagrammes de ces différentes patientes présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique.

### 5.3. Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées réduites

Les indices de similarité ont été calculés pour les 17 patientes, ils sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau 16. Cette matrice fournit les valeurs d'IRS trouvées entre les diagrammes protéiques comparés deux à deux. Il en ressort que l'indice de similarité se situe entre 12 % et 94 %.

**Tableau 16 : Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées et réduites révélées par PAGE**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
100	47	44	60	39	47	47	60	77	41	29	14	42	33	33	47	53	1
	100	63	31	67	50	59	61	65	61	44	17	88	63	47	37	58	2
		100	38	72	47	65	76	61	67	41	29	74	68	56	50	63	3
			100	31	29	29	43	46	33	27	20	28	37	33	42	31	4
				100	69	69	61	55	61	44	31	78	72	56	62	67	5
					100	60	62	56	63	54	38	61	65	47	64	69	6
						100	63	67	63	43	20	61	65	69	53	69	7
							100	80	75	47	25	72	76	60	56	71	8
								100	59	40	12	58	71	44	50	65	9
									100	57	33	72	87	71	67	93	10
										100	40	47	50	50	46	28	11
											100	28	29	33	42	31	12
												100	74	60	47	68	13
													100	63	69	94	14
														100	62	67	15
															100	73	16
																100	17

D'après le tableau ci dessus, on note d'abord de faibles valeurs d'IRS dont la variation se situe entre 12 % et 25 % pour les différentes patientes. A titre d'exemple:

- IRS à 12 % entre la patiente 12 et la patiente 9,
- IRS à 25 % entre la patiente 12 et la patiente 8.

Ainsi, ces différentes patientes présentent des diagrammes différents, avec de fortes dissemblances, ce qui implique une hétérogénéité dans la composition protéique.

Ensuite, on remarque des valeurs d'IRS moyennes qui varient entre les différentes patientes dans l'intervalle de 25 % à 50 %. A titre d'exemple:

- IRS à 31 % entre les patientes 4 et 2, 5 et 4, 17 et 4, 12 et 5, 17 et 12.
- IRS à 40 % entre les patientes 11 et 9, 12 et 11.
- IRS à 50 % entre les patientes 6 et 2, 16 et 3, 16 et 9, 14 et 11, 15 et 11.

Ainsi, ces différentes patientes présentent des diagrammes voisins, avec autant de ressemblances que de dissemblances, ce qui fait penser que la composition protéique est presque la même.

Enfin, on distingue des valeurs importantes d'IRS qui fluctuent entre 50 % et 94 %. A titre d'exemple:

- IRS à 60 % entre les patientes 4 et 1, 8 et 1, 7 et 6, 15 et 8, 15 et 13 .
- IRS à 70 % entre les patientes 10 et 8.
- IRS à 80 % entre les patientes 9 et 8.
- IRS à 94 % entre les patientes 17 et 14.

Ainsi, les diagrammes de ces différentes patientes présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique.

**5.4. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites**

Les indices de similarité ont été calculés pour les 17 patientes, ils sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau 17. Cette matrice fournit les valeurs d'IRS trouvées entre les diagrammes protéiques comparés deux à deux. Il en ressort que l'indice de similarité se situe entre 63 % et 100 %.

**Tableau 17 : indices de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites révélées par SDS-PAGE**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
100	100	75	92	100	100	83	92	92	79	92	92	92	100	100	100	100	1
	100	75	92	100	100	83	92	92	79	92	92	92	100	100	100	100	2
		100	81	75	75	63	81	69	81	69	69	69	75	75	75	75	3
			100	92	92	77	86	85	73	85	85	85	92	92	92	92	4
				100	100	83	92	92	79	92	92	92	100	100	100	100	5
					100	83	92	92	79	92	92	92	100	100	100	100	6
						100	77	75	64	75	75	75	83	83	83	83	7
							100	85	73	85	85	85	92	92	92	92	8
								100	71	83	83	83	92	92	92	92	9
									100	85	85	85	79	79	79	79	10
										100	100	100	92	92	92	92	11
											100	100	92	92	92	92	12
												100	92	92	92	92	13
													100	100	100	100	14
														100	100	100	15
															100	100	16
																100	17

L'observation du tableau 18 indique des valeurs importantes d'IRS qui varient entre les différentes patientes dans l'intervalle de 63 % à 100 %. A titre d'exemple:

- IRS à 63 % entre les patientes 7 et 3,
- IRS à 75 % entre la patientes 3 et 1, 3 et 2, 5 et 3, 6 et 3, 14 et 3, 15 et 3, 16 et 3, 17 et 3, 9 et 7, 11 et 7, 12 et 7, 13 et 7.
- IRS de 85 % entre les patientes 9 et 4, 11 et 4, 12 et 4, 13 et 4, 9 et 8, 11 et 8, 12 et 8, 13 et 8, 11 et 10, 12 et 10, 13 et 10.

De ce fait, les diagrammes de ces différentes patientes présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique.

En outre, des valeurs maximales d'IRS égales à 100 % sont observées entre les patientes 2 et 1, 5 et 1, 6 et 1, 14 et 1, 15 et 1, 16 et 1, 17 et 1, 5 et 2, 6 et 2, 14 et 2, 15 et 2, 16 et 2, 17 et 2, 6 et 5, 14 et 5, 15 et 5, 16 et 5, 17 et 5, 14 et 6, 15 et 6, 16 et 6, 17 et 6, 12 et 11, 13 et 11, 13 et 12, 15 et 14, 16 et 14, 17 et 14, 16 et 15, 17 et 15, 16 et 17. Ce qui signifie que ces différentes patientes présentent des diagrammes identiques avec la même composition protéique.

A la lumière de tous ces calculs d'indice, nous concluons que quelque soit la condition utilisée, il existe une similitude élevée entre certaines patientes présentant naturellement une ressemblance dans leur composition protéique et/ou leur état physiologique ou pathologique. A l'inverse d'autres patients ayant une origine physiologique ou pathologique éloignés et une différence dans leur composition protéique montrent des IRS faibles.

Cette comparaison des profils des protéines salivaires totales obtenus par électrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS peut être fiable pour grouper un certain nombre de patientes.

## 6. Conséquence du diabète gestationnel sur le protéome salivaire

L'analyse comparative des profils électrophorétiques des protéines salivaires extraites dans quatre conditions différentes : dénaturantes réductrices, non dénaturantes non réductrices, non dénaturantes réductrices et dénaturantes non réductrices montre qu'environ 5 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (B8, B9, B14, B15 et B17) révélées dans la première condition (figure 7), 7 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (B1, B5, B6, B9, B11, B18 et B19) fractionnées dans la deuxième condition (figure 8), 6 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (B2, B4, B9, B12,

B16 et B19) séparées dans la troisième condition (figure 9), et 6 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (B1, B3, B6, B7, B9 et B13) obtenues dans la quatrième condition ; présentent une variation d'expression qualitative et quantitative et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différente par rapport à celles obtenues sur le profil des témoin et/ou des malades.

Quatre exemples de protéines exprimées que chez les femmes enceintes diabétiques et absentes totalement chez les témoins (sujet sain et femmes enceintes non diabétiques) ; la B9 révélée dans les conditions dénaturantes réductrices, la B18 révélée dans les conditions non dénaturantes non réductrices, la B12 révélée dans les conditions non dénaturantes réductrices et les B7, B9 et B13 révélées dans les conditions dénaturantes non réductrices ; de masses moléculaires approximatives de 69 KDa, 30 KDa, 35 KDa, 18 KDa, 15 KDa et 12 KDa respectivement.

D'après la littérature, ces groupes de protéines correspondent à des albumines (69 KDa), des lipases linguales de petite taille (aux environs de 30 KDa). Ces dernières sont exprimées au niveau de la cavité buccale que lors de l'hydrolyse d'une très faible quantité de triglycérides permettant une perception orosensorielle des matières grasses plus ou moins importante déclenchant une appétence pour le gras et un processus d'anticipation digestive. Donc probablement, l'expression de ces protéines dans le milieu salivaire chez les patientes malades est une des conséquences de diabète gestationnel sur le protéome salivaire.

Un autre exemple, des protéines exprimées chez les témoins (sujet sain et femmes enceintes non diabétiques) et les patientes malades, les B14 et B15 révélées dans les conditions dénaturantes réductrices de masses moléculaires approximatives aux environs de 50 KDa, les B1, B5, B6 et B19 révélées dans les conditions non dénaturantes non réductrices de masse moléculaire approximative de 250 KDa, 160 KDa ; 150 KDa et 30 KDa respectivement, les B2, B14 et B19 révélées dans les conditions non dénaturantes réductrices de masses moléculaires approximatives de 150 KDa, 30 KDa et 15 KDa respectivement ainsi que les bandes B1, B3 et B6 révélées dans les conditions dénaturantes non réductrices de masses moléculaires approximatives de 250 KDa, 150 KDa et 20 KDa respectivement. Ces protéines montrent des variations d'expression quantitatives avec des intensités égales ou différentes par rapport à celles des témoins. Certaines protéines sont surexprimées, d'autres sont à l'état de trace.



D'après la littérature, les groupes de protéines situés aux environs de 50 KDa (45 et 55 KDa) peuvent correspondre à l'alpha amylase salivaire. Les protéines situées aux environs de 200 KDa (150 et 250 KDa) correspondent à des immunoglobulines. Aussi les groupes de protéines situés aux environs de 30 KDa peuvent correspondre aux lipases linguales de petite taille. Probablement, les fluctuations quantitatives de certaines protéines exprimées sont donc une des conséquences du diabète gestationnel sur le protéome salivaire. En effet la surexpression de l'alpha amylase salivaire ainsi que d'autres protéines de faible poids moléculaires (aux environs de 20 KDa) a été prouvée dans des études antérieures réalisées sur le diabète de type 2 et ses conséquences sur le milieu salivaire [27].

Ces différences d'expression sont autant des facteurs d'intérêt (biomarqueurs) pour l'analyse de l'influence du diabète gestationnel sur la composition en protéines salivaires celles ci étant susceptibles d'être spécifiquement exprimées ou inhibées au cours de cette pathologie.

Ces protéines salivaires variantes peuvent être secondairement fractionnées par électrophorèse bidimensionnelle et caractérisées par spectrométrie de masse afin de préciser si elles sont susceptibles d'être considérées comme marqueurs de cette pathologie.

Ce travail de recherche avait pour objectif d'une part d'explorer de manière aléatoire le protéome salivaire par application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle, d'autre part de rechercher les biomarqueurs de la maladie du diabète gestationnel dans la salive.

Notre première préoccupation est d'obtenir la meilleure expression possible des protéines de la salive. Ceci nous a conduit à réaliser quatre extractions dans des conditions différentes : dénaturantes réductrices, dénaturantes non réductrices, non dénaturantes non réductrices et non dénaturantes réductrices. Les protéines extraites sont séparées par la méthode SDS/PAGE ou PAGE décrite par Laemmli [33], modifiée par Singh [43].

Par conséquent, l'utilisation de ces dernières pour le fractionnement des protéines salivaires réduites et non réduites nous a fourni des diagrammes satisfaisants et nous a permis :

- d'apprécier la diversité des protéines salivaires dans les quatre conditions d'extraction
- de comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec ceux des témoins et de remarquer que chacun des échantillons possède un profil protéique qui lui est propre et qui peut ressembler ou pas à celui d'un autre échantillon ou celui du témoin par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines,
- de révéler les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques de haut et faible poids moléculaire
- de dénombrer des bandes protéiques communes entre les différents échantillons,
- et enfin de distinguer les différences dans la composition protéique des patients malades et du témoin.

En outre, l'analyse statistique effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des digrammes types et une classification hiérarchique a permis d'apprécier numériquement la diversité des protéines salivaires dans les quatre conditions.

L'analyse de ces gels a permis de déceler 31 bandes protéiques de mobilité différentes pour les protéines dénaturées et réduites, 10 bandes protéiques de HPM et 21 bandes protéiques de FPM. Pour les protéines non dénaturées et non réduites, 25 bandes protéiques de mobilités différentes sont répertoriées, 14 de HPM et 11 de FPM. Pour les protéines non dénaturées et réduites, 21 bandes protéiques de mobilités différentes sont dénombrées, 8 de HPM et 13 de

FPM. Enfin 16 protéines dénaturées et non réduites de mobilités différentes sont observées pour la quatrième condition, avec 3 bandes protéiques de HPM et 13 bandes protéiques de FPM.

Une nette différence est observée entre le profil des témoins (sujet sain et femmes enceintes non diabétiques) et des patientes atteintes de diabète gestationnel. Environ 5 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (B8, B9, B14, B15 et B17) pour les protéines extraites dans les conditions dénaturantes et réductrices, 7 bandes protéiques (B1, B5, B6, B9, B11, B18 et B19) pour les protéines extraites dans les conditions non dénaturantes non réductrices fractionnées, 6 bandes protéiques (B2, B4, B9, B12, B16 et B19) pour les protéines extraites dans les conditions non dénaturantes réductrices et 6 bandes protéiques (B1, B3, B6, B7, B9 et B13) extraites dans les conditions dénaturantes et non réductrices, sont les plus variables qualitativement et quantitativement et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différente par rapport à celles obtenues sur les profils des témoins et/ou des malades.

La comparaison des profils électrophorétiques a montré quatre exemples de protéines exprimées que chez les femmes enceintes diabétiques et absentes totalement chez les témoins (sujet sain et femmes enceintes non diabétiques) ; la B9, la B18, la B12 et les B7, B9 et B13 révélées dans les quatre conditions; de masses moléculaires approximatives de 69 KDa, 30 KDa, 35 KDa, 18 KDa, 15 KDa et 12 KDa respectivement. Un autre exemple, des protéines exprimées chez les témoins et les patientes malades, les B14 et B15 de masses moléculaires approximatives aux environs de 50 KDa, les B1, B5, B6 et B19 de masse moléculaire approximative de 250 KDa, 160 KDa ; 150 KDa et 30 KDa respectivement, les B2, B14 et B19 de masses moléculaires approximatives de 150 KDa, 30 KDa et 15 KDa respectivement ainsi que les bandes B1, B3 et B6 de masses moléculaires approximatives de 250 KDa, 150 KDa et 20 KDa respectivement, qui présentent des variations d'expression quantitatives avec des intensités égales ou différentes par rapport à celles des témoins. Certaines protéines sont surexprimées, d'autres sont à l'état de trace.

L'application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais cette méthode ne nous a pas permis de diagnostiquer le diabète

gestationnel. Pour cela nous avons jugé à court terme, que l'emploi de l'électrophorèse bidimensionnelle devrait accroître encore nos possibilités de trouver un ou plusieurs biomarqueurs de la maladie dans la salive, de les identifier et de les caractériser par la suite.

La poursuite des travaux sur ces protéines implique au préalable l'utilisation de techniques et méthodes capables de fournir une très bonne séparation. Nous comptons donc reprendre la même approche en utilisant une technologie permettant une séparation bidimensionnelle de haute résolution. Cela consiste en la séparation des protéines sur des strips préfabriqués lors d'une première dimension d'isoélectrofocalisation puis une séparation lors d'une deuxième dimension en fonction du poids moléculaire, dans le but d'obtenir un grand nombre de spots bien résolus. Ce travail sera poursuivi par la caractérisation de ces spots par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines susceptibles d'être considérées comme des marqueurs potentiels de cette pathologie.

- [1]. Acuna G.S, Franco-Garrocho L.E, Alonso S.T, Uribe L.K. **2011**. parotid gland giant pleomorphic adenoma : report of case and literature revision. *Revista oral*; 12 (36): 679-682.
- [2]. Aren G. **2003**. Periodontal health, salivary status, and metabolic control in children with type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol*; 74 (12): 1789-1795.
- [3]. Attia A. **2013**. La salive: outil diagnostique et perspectives thérapeutiques. 158 pages.
- [4]. Azerdo S, Lajaunias S. **2011**. Les biomarqueurs ouvrent de nouvelles perspectives de diagnostic. *Agefi Magazine/Biotech*; 20 (20):1-3.
- [5]. Belhadj M. **2014**. Diabète gestationnel: 6% des femmes enceintes atteintes. *El moudjahid* ; 8 mars 2014.
- [6]. Ben-Haroush A et al. **2003**. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabetic Med*; 21:103-113.
- [7]. Ben-Haroush A, Yogev Y, Hod M. **2004**. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med* ; 21 : 103-13.
- [8]. Carlus C, Pacault A, De Gamarra E, Wallet A. **2000**. Le nouveau-né macrosome en maternité. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* ; 29 (suppl. n°1): 25-32.
- [9]. Cedard L. **1984**. Radioimmunoassay of plasma and salivary progesterone during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem* ; 20(1): 487-490.
- [10]. Chahbouni S. **2009**. La classification moléculaire du cancer du sein. Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine. Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, 106p. [scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/mediatheque/e\\_theses/135-09.pdf](http://scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/mediatheque/e_theses/135-09.pdf) .
- [11]. Collège national des gynécologues et obstétriciens français. **1996**. Recommandations pour la pratique clinique : Le Diabète Gestationnel.
- [12]. Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. **2009**. Diabète et grossesse: Recommandations pour la pratique clinique. [http://www.cngof.asso.fr/D\\_PAGES/PURPC\\_01.HTM](http://www.cngof.asso.fr/D_PAGES/PURPC_01.HTM).
- [13]. Cours médecine en ligne. **2013**. La sécrétion salivaire. <http://www.cours-medecine.info/physiologie/secretion-salivaire.html>.
- [14]. Deruelle P, Clay J.C, Cazaubiel M, Subtil D, Fontaine P, Vambergue A. **2009**. Diabète gestationnel. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Gynécologie/Obstétrique* ; 5-042-C-20.
- [15]. Deville De Periere D. **1997**. Implication potentielle des peptides d'origine salivaire dans la physiopathologie du diabète. *Méd Buccale Chir Buccale* ; 3 (1) : 33-42.
- [16]. Edition Montréal en ligne. **2008**. L'analyse sanguine bientôt remplacée? <http://www.radio-canada.ca/nouvelles/Science-Sante/2008/03/25/002-salive-tests.shtml>.

- [17]. Ferguson DB. **1987**. Current diagnostic uses of saliva. *J Dent Res*; 66 (2): 420-424.
- [18]. Finestone AJ, Boorujy SR. **1967**. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Diabetes*; 16 (5): 336-340.
- [19]. Fontaine P, Vambergue A. Diabète gestationnel. In *Traité de diabétologie*. Paris : Flammarion Médecine-sciences 2005. p. 784-90.
- [20]. Fraser GA, MEYER RM. **2007**. Biomarkers and the design of clinical trials in cancer. *Biomark* ; pp 97-99.
- [21]. Galtier F. **2010**. Le diabète gestationnel : définition, épidémiologie, facteurs de risque. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* ; 39 :144-170.
- [22]. Ganong W. **2005**. Les glandes salivaires et la salive. *Physiologie médicale*. De Boeck, 464-465.
- [23]. Georges D. **2012**. Pathologie générale et salive. Thèse de diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire. Nancy : Université Henri Poincar-Nancy1, 256p. [http://docnum.univ-lorraine.fr/public/BUPHA\\_TD\\_2012\\_GEORGES\\_DANY.pdf](http://docnum.univ-lorraine.fr/public/BUPHA_TD_2012_GEORGES_DANY.pdf).
- [24]. Guenard H. **2001**. Physiologie humaine. Contrôle de la sécrétion salivaire. *Wolters Kluwer* ; P 409.
- [25]. Haute Autorité de Santé. **2005**. Rapport de synthèse sur le dépistage et le diagnostic du diabète gestationnel. *Services des recommandations professionnelle* .[http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/diabete\\_gestationnel\\_synuth.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/diabete_gestationnel_synuth.pdf).
- [26]. Hellweg R., Hartung HD. **1990**. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Neurosci Res*; 26 (2): 258-267.
- [27]. Hirtz C, Chevalier F, Raingeard I, Egea J.C, Bringer J, Rossignol M et Deville De Périère D. **2005**. Recherche préliminaire de marqueurs salivaires du diabète de type 1 chez l'homme. *Les cahiers de l'ADF* ; N°18-19 - 1 er trimestre.
- [28]. Jacovetti C, Regazzi R. **2012**. Adaptations métaboliques au cours de la grossesse. *Médecine des maladies métaboliques*;6 (4) :279-87.
- [29]. Jacqueminet S, Jannot-Lamotte MF, **2010**. Therapeutic management of gestational diabetes. *Diabetes Metab*; 36 (6): 658-671.
- [30]. Jerom C. **2007**. Etude expérimentale du test salivaire cario analysé sur des patients subissant une radiothérapie de la shere ORO faciale. Thèse de docteur en chirurgie dentaire. Metz: Université Henri Poincar-Nancy1, 117 p. [http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCDPHA\\_TD\\_2007\\_JEROME\\_CHRISTELLE.pdf](http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCDPHA_TD_2007_JEROME_CHRISTELLE.pdf)

- [31]. Kefalides P.T. **1999**. Saliva research leads to new diagnostic tools and therapeutic options. *Ann Intern Med*; 131(12): 991-992.
- [32]. Kierszenbaum Abraham L. **2006**. Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique. Aspects histologiques des différents types de glandes salivaires principales. De Boeck, pp 451-453.
- [33]. Laemmli U.K. **1970**. Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 277:680-685.
- [34]. Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C. et Ramade F. **1997**. Biomarqueurs en Ecotoxicologie. *Aspects fondamentaux, Paris*.
- [35]. Le Diabète Gestationnel: Texte des recommandations. **2010**. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* ; 39: S338-342.
- [36]. Lebeau V.J. **2013**. Physiologie salivaire. [http://www.uvp5.univ-paris5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble\\_1011/lebeau\\_jacques/lebeau\\_jacques\\_P02/lebeau\\_jacques\\_P02.pdf](http://www.uvp5.univ-paris5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble_1011/lebeau_jacques/lebeau_jacques_P02/lebeau_jacques_P02.pdf) .
- [37]. Mandel ID. **1990**. The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med*; 19 (3):119-125.
- [38]. O'Sullivan JB, Mahan CM. **1964**. Criteria for the glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes*; 13: 278-85.
- [39]. QA International Collectif. **2009**. Le Visuel du corps humain. Morphologie homme femme. *Québec Amérique*, P 19.
- [40]. Roman H, Robillard P-Y et al. **2004**. Grossesse chez 382 femmes de plus de 40 ans : étude rétrospective dans la population de l'île de la Réunion. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*; 33: 615-22.
- [41]. Romanetto J. **2011**. Intérêts des marqueurs biologiques dans les essais cliniques. Thèse de docteur en pharmacie. Nancy : Université de Nancy, 121p. [http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCDPHA\\_T\\_2011\\_ROMANETTO\\_JULIEN.pdf](http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCDPHA_T_2011_ROMANETTO_JULIEN.pdf).
- [42]. Science et avenir en ligne. **2008**. La salive pour remplacer les prises de sang. <http://sciencesetavenir.nouvelobs.com/sante/20080326.OBS6728/la-salive-pour-remplacer-les-prises-de-sang.html>.
- [43]. Singh N.K, Shepherd K.W, Cornish G.B. **1991**. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*;14: 203–208.
- [44]. Spinella D.G. **2009**. Biomarkers in clinical drug development: realizing the promise. *Biomark med* : pp 90-93.

- [45]. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus : Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **2002**. *Diabetes Res Clin pract*; 55 (2002) 65-85.
- [46]. Trivin F, Chevenne D, Hautecouverture M, **2003**. Bioclinique et biopathologie du diabète sucré gestationnel. *Revue Française des Laboratoires*, N ° 357.
- [47]. Vambergue A, Valat A.S, Dufour P, Cazaubiel M, Fontaine P, Puech F. **2002**. Physiopathologie du diabète gestationnel. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*;31(suppl au n°6) 4S3-4S10.
- [48]. Vendittelli F, Rivière O, Crenn-Hébert C, Claris O, Tessier V, Pinquier D et All. **2008**. Partie 1 : principaux indicateurs de santé périnatale 2004-2005. Audipog réseau périnatal. *Gynecol obstet fertil*; 36 (11) :1091-100.
- [49]. World Health Organisation.**1999**. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complication.
- [50]. Yue DK, Molyneaux LM, Ross GP, Constantino MI, Child AG, Turtle JR. **1996**. Why does ethnicity affect prevalence of gestational diabetes? The underwater volcano theory. *Diabet Med*; 13 : 748-52.



---

## Composition des gels d'électrophorèse

### Gel de séparation : T : 12,52% C : 0,97%

- Acrylamide 40% 12,4ml
- Bis acrylamide 2% 2,4ml
- Eau permutée 8,6ml
- Tampon Tris-HCL pH 8,8 15,2ml
- SDS 10% 0,40ml
- APS 1% 1ml
- TEMED 0,020ml

### Gel de concentration: T: 2,88 % C : 1,42%

- Acrylamide 40% 1ml
- Bis acrylamide 2% 0,3ml
- Eau permutée 10,2ml
- Tampon Tris-HCL pH 6,8 1,7ml
- SDS 10% 0,14ml
- APS 1% 0,70ml
- TEMED 0,014ml

