



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département :** Biologie Animale

**قسم :** بيولوجيا الحيوان

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

---

Etude de la relation entre le polymorphisme **C677T** de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), et la survenue des complications chez le diabétique de type 2 dans l'Est Algérien

---

**Présenté et soutenu par :** Benguedouar Rayenne

Bouseksou Ismahane

le 04-07-2017

Daba Fadoua

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** BENHIZIA Hayette (MCB-UFM Constantine1)

**Rapporteur :** BENLATRECHE Moufida (MAA-UFM Constantine1)

**Examineurs :** REZGOUNE Mohamed Larbi (MCB-UFM Constantine1)

*Année universitaire*  
*2016 – 2017*

## **Remerciements**

*On tient tout d'abord à remercier et en premier lieu **DIEU**, le Tout Puissant et Miséricordieux qui nous a donné la force, la volonté et le courage pour mener à bonne fin ce travail*

*Notre remerciement s'adressent en particulier à **Melle BENLATRÈCHE MOUFIDA** encadreur de notre mémoire de master, qui a toujours été à l'écoute, nous la remercions encore pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle nous a consacré*

*Nous exprimons toutes nos gratitudes aux membres du jury pour avoir accepté de donner de leur temps pour lire, commenter et examiner notre mémoire.*

*Nous voulons remercier toutes les personnes du Service de médecine interne (HB) de Constantine, toutes les personnes du centre diabétique, **Pr. Benmohammed Karima** Maitre de conférences (A) au service d'Endocrinologie-Diabétologie, Tous les médecins résidents au service d'endocrinologie pour leur aide appréciable*

*Un grand merci à **Mme Dadci Yasmina**, pour son soutien technique qui nous a aidés à la réalisation d'extraction d'ADN, nous avons apprécié sa sympathie et sa gentillesse.*

*Merci à tous les patients rencontrés durant cette étude, pour leur confiance, la vérité de leurs paroles, et leur collaboration pour réaliser cette étude*

*Nous ne terminons pas sans avoir exprimé des remerciements envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

## Dédicaces

*Louanges à **ALLAH**, qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et nous a aspiré les bons pas et les justes reflexes.*

*Je dédie ce modeste travail qui n'aurait pu voir le jour sans leurs  
Soutiens : A Mes parents*

*Ma mère **MALIKA** la plus belle chose dans ma vie, Aucune dédicace ne  
Saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous  
Les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance,  
Durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*Mon père **HASSAN** pour sa patience, sa confiance et son respect de mes  
Choix, rien au monde ne vont les efforts fournis jour et nuit pour mon  
Éducation et mon bien être.*

*Mes très chers frères : **karim, Salah, khaled, oussama**  
En témoignage, De l'attachement de l'amour et de l'affection  
Que je porte pour vous.*

*Ma très chère grand Mère : **Garbi Aicha***

*Mon amie intime Hanane pour son esprit d'équipe et à sa famille*

*Toute ma famille et à tous mes amies : **RAYENE, MERIEM,  
LINA, MAISSA, NIHED**. Et tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime*

***Ismahane***

## Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail qui n'aurait pu voir le jour sans leurs soutiens :  
A Mes parents*

*Ma mère **NACERA** la plus belle chose dans ma vie, Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*Mon père **DJAMEL** pour sa patience, sa confiance et son respect de mes choix, rien au monde ne vout les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*A mes frères **Anis, Imed** que j'adore*

*A mes anges sur terres, **Djihed, Meriem, Belkis** avec qui je partage le meilleur comme le pire, et sans qui la vie n'aurait aucun charme*

*A mes très chers amis **Wadjih, Amine, Ramzy, Seif** avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.*

**Rayenne**

## **Dédicace**

*Je dédie ce modeste travail qui n'aurait pu voir le jour sans leur soutien  
A mes parents, mes frères et à toute ma famille,*

*Pour leur soutien moral, affectif et matériel en toutes circonstances. Merci de  
m'avoir accompagné et de m'avoir inculqué les valeurs humaines tout au long de  
ces années ... J'en suis là aujourd'hui grâce à vous.*

*A ma très chère mère **Farida**:*

*Affable, honorable, aimable : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par  
excellence la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de  
m'encourager et de prier pour moi.*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études,  
Que Dieu vous donne large vie et vous protège pour moi.*

*A mon cher père **Hakim** :*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que  
j'ai toujours eu pour vous.*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon bien  
être. Ce travail et le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour que je sois la  
meilleure.*

*A mes chers frères :*

*Aux personnes de mon cœur, mes compagnons de la vie, mes frères **abed l moujib** et **abed latif**  
et*

*Mes sœurs **safa** et **nada** , les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement , L'amour  
que  
je leurs témoignes.*

*A ma famille :*

*A mes tantes paternel surtout **nadia** et **rahima** et mes tantes maternel **houria** et **habiba**  
ainsi mes cousins .....*

*A mes chers amies :*

*Je dédie ce travail à notre chère amie **Meriem Lebrima**, avec une pensée particulière pour  
les défunt j'implore dieu de l'accueillir dans son vaste paradis, ainsi ma chère **assia** .*

**Fadoua**

Introduction	1
<b>Chapitre 1 : Diabète de type 2</b>	
1. Définition du diabète type 2	3
2. Historique	3
3. Epidémiologie	4
<b>Chapitre 2 : physiopathologie du diabète type 2</b>	
4. physiopathologie	6
4.1. l'insulinosécrétion	6
4.2. l'insulinorésistance	10
5. Facteur de risque	12
6. les complications du diabète type 2	13
6.1. complication métabolique	13
6.2. complication dégénérative	14
<b>Chapitre 3 : Génétique &amp; diabète type 2</b>	
7. Diabète et génétique	18
8. MTHFR	20
<b>Partie pratique</b>	
• PATIENT & METHODE	
1. Recrutement des sujets	26
2. Prélèvement sanguin	26
3. Questionnaire et enregistrement	27
4. Extraction d'ADN	27
5. Génotypage de l'MTHFR	29
6. Analyse statistique	33
• RESULTAT ET DISCUSSION	
1. Aspect clinique des patients diabétiques	36
2. Age et sexe ratio	36
3. Répartition des diabétiques en tranche d'âge	38
4. Moyenne d'âge	39
5. Complication	39
6. Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes	40
7. Répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes	42
• CONCLUSION ET PRESPECTIVE	44
• Références bibliographique	45
• Annexes	
• Résumé	

## Liste des figures

Figure	Page
<b>Figure 01</b> : la structure de l'insuline humaine.	7
<b>Figure 02</b> : Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR.	21
<b>Figure 03</b> : localisation cytogénétique du gène de la MTHFR	22
<b>Figure 04</b> : structure de gène de la MTHFR avec la localisation des protéines et de mutations	23
<b>Figure 05</b> : Répartition des 41 mutations propres aux familles des patients homocystinuriques répertoriés	24
<b>Figure 06</b> : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés (198 pb) par PCR du gène MTHFR	30
<b>Figure 07</b> : site de restriction par l'enzyme Hinf I	31
<b>Figure 08</b> : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage de HinfI présentant différents génotypes d'MTHFR.	33
<b>Figure 09</b> : Répartition en sexe dans chaque complication	37
<b>Figure 10</b> : Répartition des sujets DT2 et témoins selon le sexe	38
<b>Figure 11</b> : Répartition des diabétiques en tranche d'âge	39
<b>Figure 12</b> : Répartition des fréquences génotypiques dans la population de Témoins et dans les diabétiques.	41
<b>Figure 13</b> : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin et dans les diabétiques	42

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 01</b> : Répartition en sexe, dans chaque complication	39
<b>Tableau 02</b> : Répartition des sujets (témoins, et diabétiques) selon le sexe.	40
<b>Tableau 03</b> : Répartition des diabétiques en Tranche d'âge	40
<b>Tableau 04</b> : Moyenne d'âge des Diabétiques	41
<b>Tableau 05</b> : Fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR	42
<b>Tableau 06</b> : Fréquences alléliques de la MTHFR chez les diabétiques et chez les témoins.	44
<b>Tableau 07</b> : Calcul des Odds ratio des sujets diabétiques ayant un allèle T par rapport aux témoins ayant un génotype CC.	44



## LISTE DES ABREVIATIONS :

**AGL** : acides gras libre

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**ARN** : acide ribonucléique

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADCY5**: adenylate cyclase 5

**BET**: Bromure ethidium

**CBS**: cystathionine- $\beta$ -synthase

**CDC123**: Cell Division Cycle 123

**CDKAL1**: regulatory subunit associated protein 1-like 1

**CDKN2A**: cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A

**CDKN2B**: cyclin-dependent kinase Inhibitor 2B

**DPP-4** : dipeptidyl-peptidase-4

**DT2** : diabète type 2

**DNID** : Diabète non insulino-dépendant

**DGKB** : Diacylglycerol kinase beta

**DO** : densité optique

**ENPPI** : ectonucléotidopyrophosphatasephosphodiesterase 1

**EXT2** : exostosinglycosyltransferase

**EDTA**: Éthylène diamine tetraacetic acid

**FGF**: fibroblastgrowth factor

**FAD**: Flavine adénine dinucléotide

**GLP-1** : *Glucagon-Like Peptide-1*

**GLUT2** : glucose transporteur 2

**GLUT 4** : glucose transporteur 4

**GCKR** : glucokinase regulator

**HPGO** : l'hyperglycémie provoquée par voie orale

**HLA**: Human Leucocyte Antigènes

**HbA1c**: hémoglobine a glyquée

**HHEX**: hematopoietically-expressed homeobox

**HSPGs**: glycosyltransférase sulfate protéoglycanes

**IAPP**: islet amyloid polypeptide

**IRS-1**: insulin receptor specific -1

**IGF2BP2**: insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2

**JAZF1**: JAZF zinc finger 1

**KLF14**: Kruppel like Factor 14

**LDL**: low density lipoprotein

**LGR5**: leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5

**MTHFR** : La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase

**MET** : méthionine

**MTNR1B**: melatonin receptor 1B

**NADH**: nicotinamide adénine dinucléotide

**NIDDM** : Non-insulin-dependent diabetes mellitus

**OMS** : l'Organisation mondiale de la Santé

**PROX1**: prospero homeobox 1

**PPARG**: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

**RE** : réticulum endoplasmique

**RCPG** : récepteurs couplés aux protéines G

**RBMS1**: RNA binding motif single stranded interacting protein 1

**SLC30A8**: Solute carrier family 30

**SAM**: S-adénosyl-L-méthionine

**SDS**: Sodium dodécyle sulfate

**TNf $\alpha$** : Tumor Necrosing Factor  $\alpha$

**TCF7L2**: Transcription factor 7-like 2

**TS**: thymidylate synthase

**THF**: tétrahydrofolate

**TMP**: Thymidine monophosphate

**THADA**: armadillo repeat containing

**TSPAN8**: tetraspanin 8

**UKPDS**: UK Prospective Diabetes Study

**Wnt** : signaling pathways

# *Introduction*

---

## Introduction

Plus de 100 millions de personnes sont atteints dans le monde de diabète de type 2 (DT2) (1)

Sa physiopathologie est encore loin d'être élucidée, mais il est à présent reconnu que le déséquilibre glycémique des patients diabétiques de type 2 est la résultante de deux anomalies interdépendantes:

- une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules  $\beta$  du pancréas endocrine, et
- une diminution de la sensibilité tissulaire (muscles squelettiques, tissu adipeux blanc et foie aux effets de l'insuline (insulino résistance).

Le diabète et les complications associées représentent un problème majeur de santé publique croissant à travers le monde. Le traitement du diabète ne restaure que rarement un équilibre glycémique parfait.

Les complications oculaires, rénales, cardiovasculaires et la neuropathie liées aux diabètes sont pour l'essentiel consécutives au déséquilibre glycémique persistant.

L'homocystéine est reconnue comme un facteur de risque cardiovasculaire ; elle est plus élevée chez les diabétiques non insulino dépendants (DNID auparavant) non compliqués que dans la population générale.

Au moment où ce travail a débuté, en Mars 2017, il était connu déjà que l'accumulation de l'homocystéine dans le sang à des concentrations très importantes provoque les complications vasculaires chez le diabétique de type 2 (DNID). Or des valeurs très élevés d'homocystéine dans le sang d'un patient, sont la résultante d'une synergie des plusieurs facteurs, génétiques y comprît.

Selon les données de la littérature une hyperhomocysteinémie est due à un déficit au niveau de la flavoprotéine dimérique 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), qui est une enzyme NADPH dépendante, qui catalyse la réduction du 5,10-MTHFR, le principal donneur de carbone dans la biosynthèse nucléotidique, en 5-MTHFR, qui est la forme prédominante des folates et le donneur du radical méthyl dans la réaction de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine.(2)

C'est dans ce contexte que nous avons tracé comme objectifs pour notre étude :

- ✓ Réaliser l'étude moléculaire du gène MTHFR sur notre population de diabétiques compliqués et, témoins supposés sains
- ✓ Établir la fréquence du polymorphisme MTHFR au sein de la population de patients présentant un diabète de type 2 compliqué de l'est Algérien.

- ✓ Rechercher la relation entre le polymorphisme du gène MTHFR (C677T) et la survenue d'un diabète de type 2 et /ou ses complications.

-

*Partie*

*Bibliographique*

## 1. Définition du diabète type 2

Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique : une glycémie à jeun supérieur à 1,26 g/l (7mmol/L) ou une glycémie à n'importe quel moment de la journée supérieure à 2g/l (11,1 mmol /l), ou encore une glycémie à la deuxième heure de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HPGO) supérieure ou égale à 2g /l, et ce à deux reprises.

Si le diabète est symptomatique (polyurie- polydipsie-amaigrissement), une seule glycémie supérieure à 2g /l à n'importe quel moment de la journée suffit à affirmer le diagnostic. (3)

Le diabète de type 2 (autrefois appelé diabète non insulino-dépendant) est la forme la plus fréquente du diabète sucré, environ dix fois plus fréquent que le diabète de type 1. Sa prévalence augmente nettement dans les pays industrialisés mais aussi dans les pays en voie de développement. Les facteurs génétiques jouent un rôle majeur dans l'apparition de ce type de diabète, bien plus important que dans le diabète de type 1. Plusieurs gènes sont en règle impliqués. (4)

## 2. Historique

Le diabète est signalé dès la plus haute antiquité. Ainsi le papyrus découvert à Thèbes, daté de 1550 avant J.-C. et acheté par Hebers fait mention d'une maladie caractérisée par l'abondance anormale des urines (polyurie). Le terme « diabète » proprement dit est attribué à Demetrios d'Apnée (275 environ avant J.-C.) et dérive de « *diabainen* » « qui passe à travers », désignant ainsi la fuite des urines qui ne sont pas retenues. Le terme latin « *diabètes* » est dû à Arétée de Cappadoce (premier siècle après J.-C.) à qui l'on doit aussi une description de la maladie.

Les Arabes décrivent également les personnes présentant une polyurie et aussi la notion "d'urine sucrée", selon ce qu'il a été rapporté dans les encyclopédies "Lissan El Arab" et "El Kamous El Mouhit". Au VIII<sup>e</sup> siècle de l'Hégire (VIII<sup>e</sup> siècle après J.C.), Ibn Sina puis ElRhazi décrivent la maladie diabétique de façon remarquable et énoncent les premières mesures diététiques.

C'est à l'Université de Strasbourg, en 1886, qu'Oscar Minkowski et Joseph Von Mehring découvrent le rôle du pancréas. L'ablation du pancréas (ou pancréatectomie) chez le chien est suivie d'un diabète, ce diabète étant corrigé par la greffe de pancréas. Il faut attendre 1921 pour que soit faite la découverte majeure, celle de l'insuline. En 1959 la méthode



radioimmunologique, et le dosage de l'insuline dans le plasma ont permis de distinguer les diabètes où l'insuline fait complètement défaut (diabète de type 1 ou insulino-dépendant) de ceux dont la carence en insuline n'est que partielle (diabète de type 2 ou non insulino-dépendant). (5)

### 3. Épidémiologie

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), en 2016 : « Le nombre de personnes vivant avec le diabète a pratiquement quadruplé depuis 1980, s'élevant à 422 millions d'adultes, dont la plupart vivent dans des pays en développement. Le surpoids et l'obésité constituent des facteurs à l'origine de cette augmentation spectaculaire, à annoncer ».

Le nombre de personnes vivant avec le diabète ainsi que la prévalence de la maladie augmentent dans l'ensemble des régions du monde.

- En 1980, 108 millions de diabétiques (4,7 %).
- En 2008, le nombre de diabétiques au Pays du Maghreb à 12% de la population totale.
- En 2012, le diabète était à l'origine de 1,5 million de décès. Un taux de glycémie plus élevé que le niveau optimal a provoqué 2,2 millions de décès supplémentaires, en augmentant les risques de maladies cardiovasculaires et d'autres affections.
- En 2014, 422 millions d'adultes (ou 8,5 % de la population) étaient atteints de diabète, plus d'un adulte sur trois âgé de plus de 18 ans était en surpoids et plus d'un sur dix était obèse. (6)

En Algérie, la prévalence du diabète a considérablement augmenté pour passer de 8% en 1998 à 16% en 2013. Cette augmentation inquiétante, prouvée par plusieurs études menées en Algérie durant les 15 dernières années, a incité les spécialistes à tirer la sonnette d'alarme sur la progression inquiétante de cette pathologie qui pose un sérieux problème de santé publique.

L'étude, dirigée en 1998 par des internistes au CHU de Sétif, avait démontré à l'époque que le taux d'atteinte du diabète de type 2 chez les sujets âgés entre 30-64 ans, était de 8 %

Une étude similaire réalisée par le ministère de la Santé, en coopération avec l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2003 sur la tranche d'âge 25-64 ans a révélé un taux de prévalence globale de 8 %. La prévalence urbaine était de plus de 10 % et rurale de plus de 7 %.

Une autre étude qui a été réalisée en 2005 sur un échantillon de près de 8 000 sujets âgés entre 55 et 59 ans à Tlemcen, a estimé le taux de prévalence globale à plus de 10%. La prévalence urbaine était de 15% et rurale de 12 %. (7)

En 2008, une récente étude réalisée dans la wilaya de Msila sur un échantillon de plus de 1000 personnes âgées entre 30 et 64 ans a révélé que le taux de prévalence du diabète de type 2 a atteint 16 %. Le taux de prévalence est, selon les résultats de plusieurs études, en augmentation constante.

Par ailleurs, l'endocrinologue au CHU de Constantine qui a participé à un dépistage réalisé en 2012 au niveau des établissements publics de santé de proximité de la wilaya de Mila et présenté en 2013 a révélé que plus de 14% des personnes ayant subi un diagnostic, sont exposées au risque d'atteinte. (8)

## 4. Physiopathologie du diabète type 2

L'hyperglycémie à jeun et postprandiale du patient DT2 est la résultante de deux anomalies interdépendantes :

- la diminution de la sensibilité des tissus-cibles à l'insuline (insulinorésistance) et,
- l'altération de la capacité des cellules  $\beta$  à sécréter l'hormone.

Le développement des connaissances sur la maladie font du dysfonctionnement des cellules  $\beta$  l'élément-clé de la détérioration de l'équilibre glycémique. La capacité d'adaptation (plasticité) anatomique (nombre et volume des cellules) et fonctionnelle (quantité d'insuline sécrétée et cinétique de la sécrétion de l'hormone) des cellules  $\beta$  aux besoins en insuline de l'organisme est impressionnante. Elle garantit un contrôle optimal de l'homéostasie glucidique. On comprend donc qu'un défaut de plasticité des cellules  $\beta$ , surtout chez des sujets ayant une demande insulinique supérieure à la normale du fait de l'insulinorésistance, concoure au développement du DT2. Il est ainsi indéniable que l'équipement en cellules  $\beta$  fonctionnelles (masse fonctionnelle) est altéré chez le sujet DT2 et qu'il se dégrade au cours de l'évolution de la maladie. Cette dégradation est largement liée à la détérioration de l'environnement métabolique de la cellule  $\beta$  résultant de l'hyperglycémie et de l'hyperlipidémie (glucolipotoxicité). Dans ces conditions, il est logique que les approches thérapeutiques futures du DT2 intègrent la nécessité d'augmenter la masse fonctionnelle  $\beta$  en ciblant les mécanismes de sa détérioration. (9)

### 4.1. L'insulinosécrétion

L'insulinosécrétion chez le DT2 est caractérisée par l'effondrement de la réponse initiale « pic précoce » au glucose, et par la réduction de la réponse maximale aux stimulations, réduction qui peut aller jusqu'à 80 % dans le DT2 « avancé ». (9)

Chez les sujets atteints de DT2, des concentrations anormalement élevées d'acides gras ont été mises en évidence, et l'oxydation hépatique accrue des acides gras pourrait stimuler la néoglucogenèse en fournissant l'énergie et les cofacteurs nécessaires à son fonctionnement. (10)

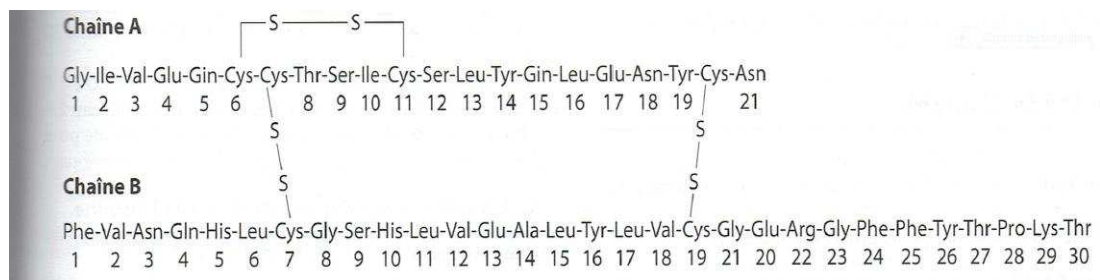
#### ➤ *L'insuline*

L'insuline est une hormone anabolique qui favorise la mise en réserve du glucose, des acides gras et des acides aminés (11). Est un polypeptide de taille plutôt modeste, d'un poids moléculaire d'environ 6 kDa. C'est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne A et la chaîne B, reliées entre elles par deux ponts disulfures. Dans

la plupart des espèces, y compris l'espèce humaine, la chaîne A comporte 21 acides aminés et la chaîne B en comporte 30. Un pont disulfure intracaténaire relie les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A. Sa production et sa sécrétion par les cellules  $\beta$  du pancréas endocrine sont très étroitement contrôlées. (12)

L'insuline est synthétisée sous la forme d'une prohormone plus grosse. Le gène de l'insuline est situé sur le bras court du Chromosome 11 chez les êtres humains. Il contient 2 introns et 3 exons.

Les effets physiologiques de l'insuline sont étendus et complexes. L'effet hypoglycémiant est le mieux connu, mais l'insuline a aussi d'autres effets sur le transport des acides aminés et des électrolytes, sur de nombreuses hormones et sur la croissance. L'effet net de l'hormone est la mise en réserve de glucides, de protéines et de graisses. (11)



**Figure N°1 Structure de l'insuline humain (11)**

### ➤ *Les anomalies de l'insulinosécrétion*

Sont toujours observées au cours du DT2. Elles portent tant sur des aspects quantitatifs (appréciés par l'insulinémie basale ou en réponse à divers stimuli physiologiques de la sécrétion d'insuline) que qualitatifs (disparition de la phase précoce de l'insulinosécrétion après administration intraveineuse de glucose, altération de la potentialisation par le glucose des effets d'autres sécrétagogues, altération de la pulsativité de l'insulinosécrétion; De plus, dans la plupart des cas, les méthodes de dosage immunologique de l'insuline reconnaissent également la pro-insuline (cross-réactivité des anticorps), et il a été montré que le rapport pro-insuline/insuline est plus élevé chez le sujet atteint de DT2 que chez le sujet normal. Cependant, ces réserves n'affaiblissent pas, au contraire, la réalité d'une perturbation de l'insulinosécrétion au cours du DT2. (10)

- GLUT2 (glucose transporteur 2) a une expression limitée au foie, au rein, il participe à la régulation capture-libération du glucose par cet organe ; dans la cellule-pancréatique, il est impliqué dans le contrôle de l'insulinosécrétion en réponse au glucose. (13)

GLUT 2 dans la nomenclature actuelle, qui permet un équilibre rapide entre les concentrations extra- et intracellulaires. Le glucose-6-phosphate ainsi produit peut alors activer la synthèse de glycogène et la glycolyse par effet de masse ou par des mécanismes allostériques. Une diminution de l'activité de la glucokinase entraînera donc une cécité, hépatique au glucose. Lorsqu'il existe une carence absolue en insuline, il est facile d'expliquer une augmentation de la production de glucose. Lorsque les concentrations absolues d'insuline sont normales, et en dehors des problèmes liés aux récepteurs de l'insuline, l'existence d'une hyperglucagonémie tout au long de la journée chez le sujet atteint de DT2 , en s'opposant aux effets de l'insuline, contribue à l'augmentation de la production de glucose. Par ailleurs, chez les sujets atteints de DT2, des concentrations anormalement élevées d'acides gras ont été mises en évidence, et l'oxydation hépatique accrue des acides gras pourrait stimuler la gluconéogenèse en fournissant l'énergie et les cofacteurs nécessaires à son fonctionnement. (10)

✓ Altération de GLUT-2

En résumé, le transporteur de glucose Glut-2 apparaît jouer deux rôles essentiels, d'importances relatives variables chez l'homme et la souris. Chez l'homme, Glut-2 apparaît avant tout comme un transporteur indispensable à la fonction des cellules ayant à sécréter du glucose dans la circulation sanguine, et son déficit entraîne donc une glycogénose, le glucose non sécrété étant détourné vers l'accumulation de glycogène. (14)

➤ ***Perte de la masse des cellules  $\beta$***

La plasticité du pancréas endocrine peut se définir comme sa capacité à adapter la masse des cellules B (en l'augmentant ou en la diminuant) aux modifications de la demande insulinaire, pour garantir un contrôle optimal de l'homéostasie glucidique. (15)

La carence en insuline, en regard des niveaux glycémiques, est liée à des troubles de la cellule Bêta de l'îlot de Langerhans, qui sont aggravés par l'hyperglycémie elle-même «glucotoxicité» par les taux élevés d'acides gras circulants « lipotoxicité ». On constate de façon non constante des dépôts de substances amyloïdes dans les îlots de 50 % au moment du diagnostic de diabète). (16)

➤ *Effet du glucose : la glucotoxicité*

Le glucose est non seulement un régulateur indispensable de la sécrétion d'insuline mais, il est également un stimulant puissant de la croissance des cellules B et peut-être un agent protecteur vis-à-vis de l'apoptose. De manière plus générale, il est nécessaire au développement de la masse des cellules insulaires et probablement à son maintien à l'âge adulte. Cependant, depuis quelques années, est apparu le concept de la glucotoxicité selon lequel l'exposition prolongée des cellules B à une concentration trop élevée de glucose aboutit à un dysfonctionnement de la cellule endocrine qui devient progressivement insensible au glucose selon un processus en partie irréversible.

L'amyline, constituant essentiel des dépôts amyloïdes, augmente le processus d'apoptose des cellules humaines et murines. On sait depuis longtemps que l'infiltration des îlots de Langerhans par l'amyline est caractéristique des lésions des îlots de Langerhans dans diabète de type 2 et son rôle possible dans l'altération de la sécrétion d'insuline est souvent évoqué. Chez le sujet diabétique, la sécrétion d'amyline est augmentée et conduit fréquemment à la formation de dépôts amyloïdes. Lorenzo *et al.* Laissent penser dans leur conclusion que, dans le diabète de type 2, les dépôts amyloïdes pourraient être à l'origine d'une diminution du nombre des cellules  $\beta$  par induction du processus d'apoptose. Fait notable, qui fortifie cette hypothèse, l'exposition d'îlots murins et humains cultivés *in vitro* à une concentration élevée de glucose augmente le contenu insulaire en précurseurs du polypeptide amyloïde. (15)

✓ Peptide amyloïde

Hormis l'insuline, d'autres protéines peuvent s'accumuler dans le RE (réticulum endoplasmique) et causer un stress. C'est le cas de l'IAPP (*islet amyloid polypeptide*), qui est co-exprimée et co-sécrétée avec l'insuline, et dont l'accumulation sous forme d'oligomères induit un stress du RE et une apoptose des cellules  $\beta$ . (9)

✓ Effet des lipides : la lipotoxicité

Nécessaires, en concentration normale, au bon fonctionnement des cellules B, au maintien de la masse insulaire et à la plasticité du pancréas endocrine, ils deviennent pathogènes lorsque leur concentration s'accroît anormalement et reste élevée de manière chronique. Il semblerait aussi, mais ce point reste discuté, que leurs effets indésirables soient limités, s'il

n'existe pas d'anomalie latente de la fonction pancréatique et qu'ils ne s'expriment pleinement que chez des individus présentant une prédisposition génétique au diabète. (15)

Lorsque les îlots de Langerhans sont exposés de manière chronique à des concentrations élevées d'acides gras, comme c'est le cas chez les sujets présentant un diabète de type 2, des triglycérides s'accumulent dans les cellules  $\beta$  et produisent une inhibition de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ainsi qu'une lipotoxicité qui conduit à la destruction des cellules par apoptose. À l'examen anatomopathologique, la présence de vésicules lipidiques à l'intérieur des cellules  $\beta$  des îlots a été observée chez des diabétiques de type 2, suggérant que la lipotoxicité pourrait rendre compte de la disparition des cellules  $\beta$  observée chez les diabétiques de type 2 passant d'un état d'insulinorésistance compensé à un état d'insulinorequérance. (17)

#### 4.2 L'insulinorésistance

C'est une réduction des actions de l'insuline au niveau de ses tissus cibles. Ceux-ci sont constitués par le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux(18). Le principal site de l'insulinorésistance est le muscle, dans lequel le défaut est localisé en aval du récepteur de l'insuline, au niveau de la voie métabolique non oxydative du glucose, la synthèse de glycogène. Les autres sites d'insulinorésistance sont l'adipocyte et le foie. Au niveau de l'adipocyte, l'incapacité de l'insuline à inhiber la lipolyse est responsable d'une augmentation des concentrations plasmatiques des acides gras libres, qui stimulent la néoglucogénèse, la synthèse des triglycérides et la production glucosée hépatique. Préférentiellement utilisés par le muscle, les acides gras libres plasmatiques y diminuent le captage et le catabolisme du glucose, et altèrent l'insulinosécrétion. L'insulinorésistance hépatique rend compte, du fait d'une moindre «freinabilité» de la production glucosée hépatique, d'un débit de glucose inapproprié, même en présence de l'hyperglycémie. (11)

En ce qui concerne les bases moléculaire de l'insulinorésistance, les modèles animaux d'insulinorésistance ont permis de mettre en évidence certaines anomalies des premières étapes de l'action de l'insuline. chez la souris obèse diabétique (ob/ob) par exemple, la phosphorylation du récepteur de l'insuline est diminuée de 50% et celle d'IRS-1 (substrat majeur du récepteur de l'insuline) est de 80% parallèlement à une diminution de plus 90% de la stimulation de l'activité de la PI 3-kinase par l'insuline. ainsi, dans ce modèle, il existe des anomalies de ces trois étapes précoces de la traduction du signal de l'insuline. (13)

✓ Anomalies dans l'action de l'insuline, rôle de la sérine phosphorylation d'IRS-1 dans la régulation négative du signal insulinique

La résistance à l'insuline, combinée avec un défaut de sécrétion d'insuline, contribue au développement du diabète de type 2. L'insulinorésistance se caractérise par une diminution de l'effet de l'insuline sur le transport de glucose dans les muscles et les adipocytes. La phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus de tyrosine et sa liaison à la phosphatidylinositol 3-kinase sont nécessaires à la stimulation du transport de glucose par l'insuline. Des modifications du niveau de phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus de sérine est un des mécanismes pouvant conduire à une diminution de sa phosphorylation sur des résidus de tyrosine et à une diminution du transport de glucose. Des facteurs diabétogènes comme les acides gras libres, le TNF $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale), l'hyperinsulinémie et différents stress, augmentent la sérine phosphorylation d'IRS-1 sur 3 résidus différents : les sérines 307, 612 et 632. De plus de nombreuses sérine/thréonine kinases phosphorylent ces trois résidus de sérine. Ces résultats récents suggèrent qu'une augmentation de la sérine phosphorylation d'IRS-1 puisse être une caractéristique des états d'insulinorésistance. (19)

✓ GLUT4

Dans le muscle, le transporteur de glucose majoritaire est le même que celui du tissu adipeux GLUT 4 (Le transporteur de glucose 4) et l'insuline semble là encore agir par translocation du transporteur vers la membrane plasmique. Chez l'homme, les résultats sont actuellement contradictoires en ce qui concerne l'expression de GLUT 4 dans le DT2 puisque celle-ci a été trouvée normale dans certaines études et diminuée dans d'autres. Chez l'homme non diabétique, la capacité de l'insuline à stimuler le captage musculaire de glucose est proportionnel à l'activation du glycogène synthase. Cette activation est, pour une raison qui reste à éclaircir anormale dans le DT2 et de façon plus générale, chez les sujets insulinorésistants L'oxydation musculaire du glucose est contrôlée par le pyruvate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale dont l'activité est diminuée par des concentrations élevées des produits dès l'oxydation mitochondriale des acides gras. Chez le sujet atteint de DT2, l'augmentation de l'oxydation des acides gras pourrait donc entraîner une diminution de l'oxydation du glucose. L'intérêt récent concernant l'amyline a également trouvé un écho dans l'étude de la résistance périphérique à l'insuline. Chez l'animal, l'amyline peut entraîner une diminution marquée des effets périphériques de l'insuline. Toutefois, les concentrations circulantes dans le DT2, de l'ordre de 2 à 4  $\mu$ M, sont très faibles par rapport aux concentrations efficaces (de l'ordre du nM) permettant de s'opposer aux effets de l'insuline. En outre, il n'existe pas de différence marquée dans les concentrations circulantes



d'amyline entre des sujets témoins et des sujets atteints de DT2, que ce soit à l'état basal ou à la suite d'un repas glucidique. La résistance à l'insuline chez les sujets atteints de DT2 ne peut expliquer à elle seule l'apparition du diabète. En effet, il existe un certain nombre de situations où l'on trouve une insulino-résistance comparable (obésité) ou beaucoup plus marquée (anomalie génétique du récepteur de l'insuline) sans hyperglycémie postabsorptive. C'est donc la combinaison d'une insulino-résistance et d'un déficit de sécrétion d'insuline qui détermine l'apparition du DT2. (10)

✓ Les acides gras libres

Les lipides circulants sont souvent élevés dans le diabète de type 2 et sont également un facteur déterminant de l'insulino-résistance. Ainsi les AGL diminuent le captage musculaire de glucose et augmentent sa production par le foie. Le vieillissement favorise également le développement d'un diabète de type 2 car la diminution de la masse musculaire est responsable d'une augmentation des besoins en insuline. (15)

## 5. Facteurs de risque

✓ *L'obésité* (20)

L'obésité, en particulier ses formes sévères, est l'un des principaux facteurs de risque de diabète de type 2. Par ailleurs, l'explosion de l'épidémie d'obésité infantile s'accompagne de l'apparition de formes précoces de diabète de type 2, avec un syndrome métabolique et une intolérance au glucose détectables dès l'adolescence. Ces données suggèrent l'existence de déterminants moléculaires primitifs communs entre obésité sévère et précoce et diabète de type 2, qui partageraient une insulino-résistance génétiquement déterminée. Dans ce contexte, l'identification sur la région chromosomique 6q liée à la «diablierie», du gène *ENPPI* codant pour un inhibiteur du récepteur de l'insuline, dont des variants codants et non codants contribuent au risque génétique de cette affection, est un pas vers la dissection génétique des obésités les plus diabétogènes. Ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles vers le profilage génétique et biologique des adolescents obèses, dans une optique de prévention et de traitement de la « diabète » et de ses complications vasculaires. (19)

✓ *L'âge* (21)

Bien que l'âge ne soit pas à proprement parler un facteur d'environnement, la prévalence et l'incidence du diabète de type 2 augmentent en fonction de l'avancement en âge .cette évolution pourrait correspondre à un phénomène Natural physiologique faisant partie

intégrante du processus de vieillissement, et alors s'expliquer par une insulino-résistance des tissus périphériques augmentant progressivement avec l'âge.

✓ *Facteurs nutritionnels* (21)

Une alimentation hypercalorique ne participe à l'éclosion d'un diabète que lorsqu'elle provoque une obésité. On a toutefois incriminé l'effet spécifique de deux nutriments : d'une part l'excès de sucres (saccharose), d'autre part l'insuffisance de fibres alimentaires.

✓ *Le stress* (21)

Si les sociétés développées se caractérisent par une alimentation et une sédentarité accrues, il est vraisemblable que la situation d'agression y est plus fréquente. Cela est bien évidemment très difficile à chiffrer et l'influence du stress dans l'accroissement de la prévalence du diabète dans ce type de société est purement spéculative.

## 6. Les complications

Le diabète se complique parfois d'acidose et de coma et avec le temps, d'autres complications surviennent, notamment des atteintes micro-et macro vasculaire et de neuropathies. Les anomalies micro vasculaire comprennent des lésions prolifératives de la rétine (rétinopathie diabétique) qui peuvent aboutir à la cécité et une atteinte rénale (néphropathie diabétique) conduisant à un défaut de fonctionnement des reins. Les anomalies macro-vasculaires résultent d'une accélération de l'athérosclérose, elle-même secondaire à l'augmentation des LDL (low density lipoprotein) plasmatique. Ceci entraîne une fréquence accrue d'accidents vasculaires cérébraux et infarctus du myocarde.

Les anomalies neuropathiques (neuropathie diabétique) touchent le système nerveux autonome les nerfs périphérique au niveau des extrémités, l'association de la neuropathie, de l'insuffisance circulatoire athérosclérotique et d'une moindre résistance aux infections peut provoquer des ulcérations chroniques et la gangrène notamment au niveau des pieds. (9)

### 6.1. Les complications métaboliques

✓ *L'acidocétose*

L'acidocétose diabétique est une complication du diabète qui peut être fatale pour le patient. Elle correspond à une augmentation de l'acidité du sang, entraînant une déshydratation, des nausées, des vomissements ainsi que des douleurs abdominales. En l'absence de prise en charge, les symptômes peuvent évoluer vers une détresse respiratoire et aboutir au coma. (22)

### ✓ *Coma Hyperosmolaire*

Le coma hyperosmolaire survient dans les cas où la glycémie est très élevée, et est souvent associée à une infection. Il se caractérise par une déshydratation massive associée à une diminution de la pression artérielle pouvant aussi aboutir au coma. (21)

Il s'agit de la décompensation classique du sujet âgé diabétique de type 2, ou inaugural du diabète, lorsque la polyurie a été compensée par des boissons sucrées ou insuffisamment compensée (rôle de l'inaccessibilité aux boissons). Ce coma induit 20 à 40 % de mortalité chez le sujet âgé. Les signes cliniques sont :

- la déshydratation intense avec des troubles de la vigilance qui sont parfois révélateurs d'un diabète de type 2 méconnu.

-État d'hyperosmolarité (osmolarité supérieure à 350 mmol/l) provoquée par une Hyperglycémie majeure. (24)

### ✓ *L'acidose lactique*

Est due à l'accumulation d'acide lactique entraînant une acidose métabolique. Elle survient chez le diabétique âgé, sous la double influence : d'une cause d'hypoxie : insuffisance cardiaque ou respiratoire, d'une accumulation de biguanides : posologie excessive chez un insuffisant hépatique ou rénale(ou lors d'une exploration radio-iodée). (24)

Il s'agit d'une complication exceptionnelle mais redoutable. Elle requiert l'existence d'une situation d'hypoxie tissulaire grave (insuffisance cardiaque, hépatique, voire rénale) et d'autres facteurs dont la prise de Biguanide. Ceci contre indique l'administration de cette Famille d'antidiabétiques oraux, en cas d'insuffisance cardiaque ou hépatique importante et d'insuffisance rénale. (16)

## **6.2. Les complications dégénératives**

### - Rétinopathie diabétique

La rétinopathie correspond à une perte progressive de la vision consécutive à l'atteinte des vaisseaux sanguins de la rétine. Il s'agit de la complication la plus fréquente du diabète(22). C'est une complication chronique de l'hyperglycémie : elle n'est jamais présente au début du diabète de type 1. Sa présence au moment du diagnostic du diabète de type 2 est le témoin du retard au diagnostic de diabète, marqué par des années d'hyperglycémie modérée et ignorée. (25)

La rétinopathie diabétique consiste en l'apparition progressive de lésions de la rétine survenant chez les patients présentant un diabète qui évolue depuis de nombreuses années non traitée, elle peut entraîner une perte totale de la vision. Elle débute par l'apparition de microanévrismes et est progressée vers des lésions oxydatives. L'évolution se fait vers l'œdème maculaire et les lésions ischémiques avec la prolifération anarchique de néo-vaisseaux à la surface de la rétine pouvant envahir le vitré et conduire à des hémorragies intravitréennes. La vision peut être altérée de façon définitive par l'œdème maculaire, ischémie maculaires, les membranes épitréiniennes et les décollements de rétine. Malgré l'augmentation de la prévalence du diabète, l'incidence de la rétinopathie et des altérations de la vision a fortement diminué au cours des dernières décennies. Ceci est le résultat d'une amélioration du contrôle de la glycémie, de la pression artérielle et des paramètres lipidiques sanguins. Les personnes présentant un diabète de type 2 doivent bénéficier d'un dépistage annuel de la rétinopathie diabétique, soit par l'examen direct du fond d'œil, soit par la réalisation d'un examen par rétinographie (photographie du fond d'œil). (26)

#### - Néphropathie diabétique

Est une complication qui survient au niveau des reins qui touche jusqu'à 50% des personnes diabétiques au cours de leur vie. Le diabète est la première cause d'insuffisance rénale. Une personne diabétique dont les glycémies sont mal contrôlées oblige ses reins à travailler fort afin d'éliminer l'excès de sucre à travers l'urine. L'évolution de la néphropathie diabétique, parfois lente, est souvent associée aux autres complications vasculaires du diabète, soit au niveau des yeux (rétine) et des jambes (membres inférieurs). (27)

La néphropathie diabétique est une atteinte glomérulaire, s'accompagnant d'une élévation de la pression intra-glomérulaire, secondaire à la souffrance endothéliale décrite dans la section consacrée à la physiopathologie des complications. On constate un déséquilibre du tonus des artères afférentes et efférentes, et les glomérules sont moins à l'abri de la pression artérielle systémique. Sous l'augmentation de la pression intraglomérulaire, les glomérules se dilatent (les reins des diabétiques sont gros) et filtrent mieux à court terme (les diabétiques ont initialement une hyperfiltration). (25)

Le diabète est l'une des toutes premières causes d'insuffisances rénales chroniques et terminales. Dans le diabète de type 2, les mécanismes impliqués sont multiples et complexes. Les changements hémodynamiques précoces conduisent à une augmentation de la perfusion glomérulaire et à l'hyperfiltration suivie d'une fuite d'albumine urinaire. Sur le plan clinique, on retrouve une hyperfiltration transitoire puis une augmentation progressive de l'albumine et

enfin l'installation d'une insuffisance rénale pouvant évoluer jusqu'à l'insuffisance rénale terminale. Seuls environ un tiers des patients diabétique développent une néphropathie. Les facteurs favorisants sont essentiellement les mauvais contrôles glycémique et tensionnel. Il existe également des facteurs génétiques prédisposants. La détection précoce de la néphropathie à ses stades initiaux, notamment par le dosage annuel de la microalbuminurie, permet l'instauration de thérapeutique ralentissant l'évolution vers l'insuffisance rénale terminale. L'approche thérapeutique est multifactorielle, comprenant contrôle tensionnel strict, blocage du système Rénine-angiotensine -aldostérone, contrôle glycémique et contrôle lipidique. La présence d'une microalbuminurie (albuminurie entre 30 et 300 mg par 24 heures ou 20 à 200 milligramme par minute) est non seulement un signe d'atteinte rénale mais aussi un marqueur de risque cardiovasculaire. (26)

- Neuropathie diabétique

La neuropathie autonome diabétique est une complication plutôt tardive. Il est rare qu'elle précède la rétinopathie. À l'inverse, la neuropathie périphérique est une complication multifactorielle (glycémie, lipides, alcool...etc.) et donc précoce dans le diabète de type 2. (25)

Est une atteinte du système nerveux. Lorsque le taux de sucre dans le sang demeure trop élevé sur une longue période de temps, cela peut endommager les nerfs, surtout ceux des membres inférieurs (neuropathie périphérique). Certains organes peuvent également être affectés, tels que le cœur, les organes génitaux, l'estomac, les intestins et la vessie. (27)

Le diabète représente la principale cause de neuropathie. Les mécanismes ne sont pas clairement élucidés mais sont liés à un effet toxique de l'hyperglycémie sur les cellules nerveuses. Sur le plan anatomopathologique, on retrouve des dégénérescences axonales et des lésions de démyélinisation segmentaires. Les formes distales et symétriques (polynévrite) sont les plus fréquentes, représentant 89% des cas de neuropathie périphérique. Plus rarement, on retrouve des formes focales (mononeuropathies) voire multifocales (mononeuropathies multiples). (26)

- Complications infectieuses.

Ces complications évoluent longtemps sur le mode silencieux. Ainsi un bilan systématique régulier doit être effectué pour les dépister à un stade précoce et mettre en œuvre les mesures thérapeutiques adéquates. (4)

-Le pied diabétique

Se caractérise par une ulcération ou une destruction du tissu du pied, infecté ou non.

La neuropathie périphérique se définit par :

- une perte de sensibilité des pieds due à une atteinte des nerfs
- une diminution de l'hydratation naturelle du pied engendrant sécheresse, fissures et callosités
- des déformations osseuses du pied résultant en l'apparition de points de pression(28)

Actuellement au cours de sa vie, un patient diabétique sur dix risque de subir au moins une amputation d'orteil. L'amputation résulte toujours d'une plaie du pied. En évitant les plaies on prévient l'amputation. (27)

## 7. Diabète et génétique

Les gènes de prédisposition au diabète, ce sont des gènes du développement et de la différenciation. Ils interviennent dans la voie Wnt, une voie de croissance très importante, qui est aussi un carrefour entre la croissance, la différenciation et l'apoptose, la mort programmée. Les facteurs de croissance de cette voie sont différents selon les tissus, et lorsqu'ils la stimulent, ils induisent une prolifération cellulaire. C'est la raison pour laquelle ce sont souvent des oncogènes ou des suppresseurs de tumeur.

Si on inhibe la voie Wnt, on aiguille généralement la cellule vers la différenciation ou, plus rarement vers l'apoptose. La découverte de l'association entre les gènes impliqués dans cette voie et le diabète est importante. (29)

La voie des Wnt/ $\beta$ -caténine, probablement interagissant au moins avec les trois gènes (Hhe, TCF7L2, EXT2), peut jouer un rôle dans la différenciation cellulaire de la cellule  $\beta$  et dans d'autres tissus, ainsi que la diminution de la masse active de cellules  $\beta$  pancréatique, et peut-être également dans l'insulinorésistance, et donc dans le développement du DT2. (30)

Parmi ces gènes figure : transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) qui joue un rôle clé dans la voie de signalisation Wnt, se trouve et est localisé sur le chromosome 10 (10q25.2) (31); il est activé par la  $\beta$ -caténine, protéine essentielle dans cette voie (29). Les variantes génétiques de ce gène sont associées à un risque accru de diabète de type 2. (31)

- Hematopoietically-expressed homeobox (HHEX); se trouve et est localisé sur le chromosome 19. (32) est un autre facteur de transcription qui intervient dans le développement du pancréas, dans la première phase de développement des bourgeons pancréatiques, et dans le contrôle de la voie des Wnt. Ce facteur de développement du pancréas est aussi une cible de TCF7L2 qui contrôle l'expression de HHEX. (30)

-Le troisième gène associé à cette maladie est l'exostosine glycosyltransférase 2 (EXT2); et localisé sur le chromosome 11 (11p11.2) (33) est une glycosyltransférase qui synthétise des héparanes sulfatés protéoglycanes (HSPGs), très importants pour le développement et la différenciation de très nombreuses cellules et pour le fonctionnement du système des Wnt. Ce facteur est indispensable pour le développement de facteurs de croissance comme le FGF10 (fibroblast growth factor), nécessaire au développement normal des cellules pancréatiques. (25)

-Un quatrième gène associé au risque de diabète c'est le solute carrier family 30 member 8 (SLC30A8); ce gène se localise dans le chromosome 8 (8q24.11) (34) il code pour la protéine

ZnT8 qui est un transporteur de zinc présent dans les granules de sécrétion des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Une mutation faux-sens fréquente très significativement associée au risque de DT2(35). Il existe des variantes alléliques de ce gène qui confèrent une susceptibilité au diabète sucré, non-insulino-dépendant (NIDDM). (36)

Les cellules bêta contiennent des granules d'exocytose renfermant un hexamère d'insuline, 6 molécules fixées au milieu par une molécule de zinc. ZnT8 fait entrer l'oligo-élément dans la granule, où il est apparemment plus concentré que dans le cytoplasme. Donc sans zinc ou sans concentrateur de zinc, pas de granule correcte, pas de sécrétion d'insuline. (29)

Récemment, des études d'association sur le génome entier, réalisées dans des populations d'origine européenne, ont permis d'identifier de nouveaux polymorphismes hautement associés au diabète de type 2 (DT2) tel que: Cell Division Cycle 123(CDC123) , regulatory subunit associated protein 1-like 1 ( CDKAL1), cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A /2B ( CDKN2A / B), insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2 (IGF2BP2), JAZF zinc finger 1 (JAZF1), (NOTCH2), RNA binding motif single stranded interacting protein 1 ( RBMS1), armadillo repeat containing (THADA) , tetraspanin 8 (TSPAN8), leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5) , melatonin receptor 1B (MTNR1B), Diacylglycerol kinase beta (DGKB), prospero homeobox 1(PROX1), adenylate cyclase 5 (ADCY5) et glucokinase regulator (GCKR) , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*), Kruppel Like Factor 14 (*KLF14*) , insulin receptor specific -1 (*IRS1*) . Cependant, l'impact de ces marqueurs dans des populations non européennes ainsi que leurs effets combinés restent méconnus. (37)

Des études d'association pangénomique récentes : ont permis de découvrir de nouveaux variants génétiques associés au DT2, notamment dans l'intron du gène MTNR1B. Ce gène code pour le récepteur de la mélatonine ( MT2) , un membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G(RCPG) impliqué dans la régulation des rythmes circadiens et saisonniers.

En 2013 Bernard C et ses collaborateurs, ont parlé de l'implication du gène ectonucléotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1(*ENPP1*), le *ENPP1* est un gène candidat de la diabésité sur le chromosome 6q1.

En effet, un des rôles suggérés d'ENPP1 serait d'inhiber le récepteur de l'insuline par interaction directe, affectant du même coup la cascade de signalisation en aval du récepteur. En outre, un polymorphisme fonctionnel de l'exon 4 (K121Q), entraînant une inhibition plus marquée du récepteur de l'insuline a été associé à l'insulinorésistance dans diverses ethnies. (38)





En outre, plusieurs études ont rapporté une association de polymorphismes MTHFR avec le diabète de type 2 et leur rôle comme facteurs de risque extrêmement importants dans les événements vasculaires qui peuvent engendrer des complications irréversibles, y compris la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie, les accidents vasculaires cérébraux et les maladies cardiovasculaires chez les populations Diabète.

## 8. MTHFR

La 5,10 méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), représente l'enzyme clé du métabolisme des folates. Elle catalyse la réduction irréversible du 5,10 méthylène tétrahydrofolate en 5 méthyl tétrahydrofolate. Ce dernier substrat constitue, d'une part, la forme biologique circulante et majeure des folates et, d'autre part, le donneur de carbone pour la reméthylation de l'acide aminé soufré «homocystéine» en acide aminé essentiel «méthionine». (40)

La MTHFR assure les processus de méthylation de l'ADN, des protéines de neurotransmetteurs et de phospholipides. En fait la méthylation de l'ADN joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de la stabilité génomique. La MTHFR est également impliquée dans la production de dNTP, via la synthèse des purines. La MTHFR est donc un élément essentiel à la provision de nucléotides nécessaires à la synthèse d'ADN. (41)

### 8.1. La protéine MTHFR

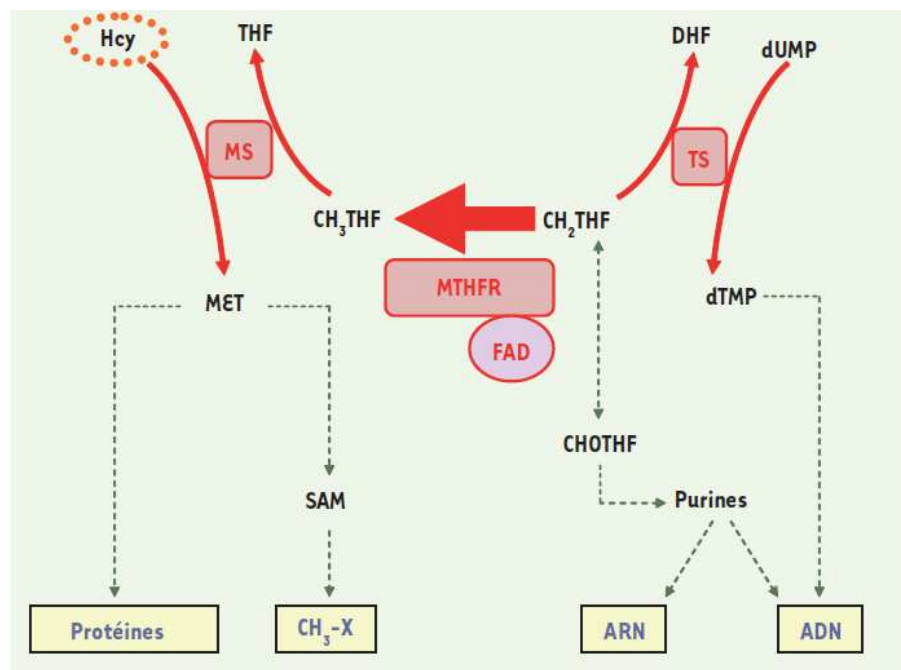
La MTHFR est un dimère de 150 kDa comprenant deux isoformes de tailles variables : 77 kDa et 70 kDa. L'expression de l'ADNc humain de 2,2 kpb donne une protéine de 70 kDa. Le site de démarrage de la traduction de l'isoforme de 77 kDa permet l'ajout de codons additionnels en amont de la séquence de l'isoforme de 70 kDa. (42)

C'est une protéine comportant 654 acides aminés(43) présente dans le cytoplasme. Elle est localisée dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. La protéine est composée : D'un domaine catalytique: représenté par l'extrémité N-terminale de poids moléculaire de 40 KDa, présentant un site de liaison pour le coenzyme FAD, NADPH. Un domaine régulateur: à l'extrémité C terminale de poids moléculaire de 37 KDa. Entre ces deux domaines se trouve une forte région hydrophobe avec une séquence d'acides aminés Lys-Arg-Arg-Glu-Glu constituant un site de clivage par la trypsine, où se lie l'inhibiteur allostérique la SAM. (44)

La protéine s'exprime fortement dans les testicules, modérément dans le cerveau et les reins et faiblement dans les autres tissus. Une isoforme plus petite de cette protéine, approximativement de 70 KDa, a été retrouvée dans certains tissus. (45)

## 8.2. Rôle de la MTHFR

La MTHFR intervient dans le métabolisme de l'homocystéine. L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré intermédiaire du métabolisme de la méthionine. Elle est synthétisée par l'ensemble des cellules de l'organisme et peut être catabolisée selon deux voies métaboliques, la voie de la transulfuration et la voie de la reméthylation (Figure 2). En cas d'apport protéique excessif, la voie de la transulfuration est favorisée par rétrocontrôle positif de la cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) et rétrocontrôle négatif de la 5,10 méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR), le régulateur allostérique étant la S-adénosyl-L-méthionine (SAM). À l'inverse, en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée et l'Hcy est recyclée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine. Dans les deux cas, l'Hcy est métabolisée dès sa formation, et sa concentration intracellulaire demeure faible (de l'ordre de 5 nmol/g de tissu). Dans les conditions physiologiques normales, l'homocystéinémie également faible puisque l'Hcy plasmatique dérive du métabolisme cellulaire (voir figure 2). En revanche, tout déficit portant sur l'un des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme de l'Hcy entraîne une augmentation de ses concentrations cellulaire, plasmatique et urinaire. La C677T de la MTHFR est un exemple de ces déficits.(45)

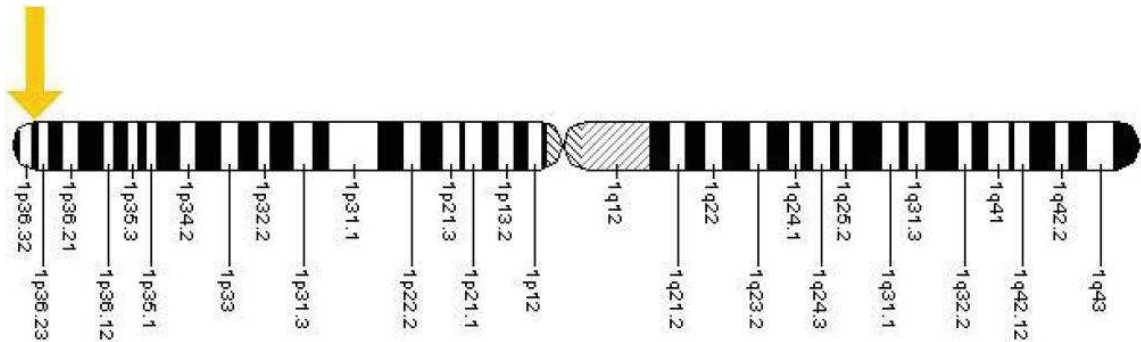


**Figure N°2 : Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR** (42)

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) en 5-méthyltétrahydrofolate ( $\text{CH}_3\text{THF}$ ). L'activité de la MTHFR affecte ainsi la disponibilité du  $\text{CH}_2\text{THF}$ , ce qui influence la synthèse de l'ARN et de l'ADN. Le  $\text{CH}_3\text{THF}$  est requis pour la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine (MET), qui intervient elle-même dans la synthèse protéique et la méthylation de l'ADN et d'autres composés ( $\text{CH}_3\text{-X}$ ). Le FAD est le cofacteur de la MTHFR. MS, méthionine synthase ; TS, thymidylate synthase ; THF, tétrahydrofolate ; DHF, dihydrofolate ; CHOTHF, 10-formyltétrahydrofolate ; SAM, S-adenosyl méthionine. (45)

### 8.3. GENE de la MTHFR

Le gène codant MTHFR a été localisé dans le chromosome 1 (1p36.3) et a 13 exons. (46)



**Figure№3 : localisation cytogénétique du gène de la MTHFR.(ref :US National library of medicine)**

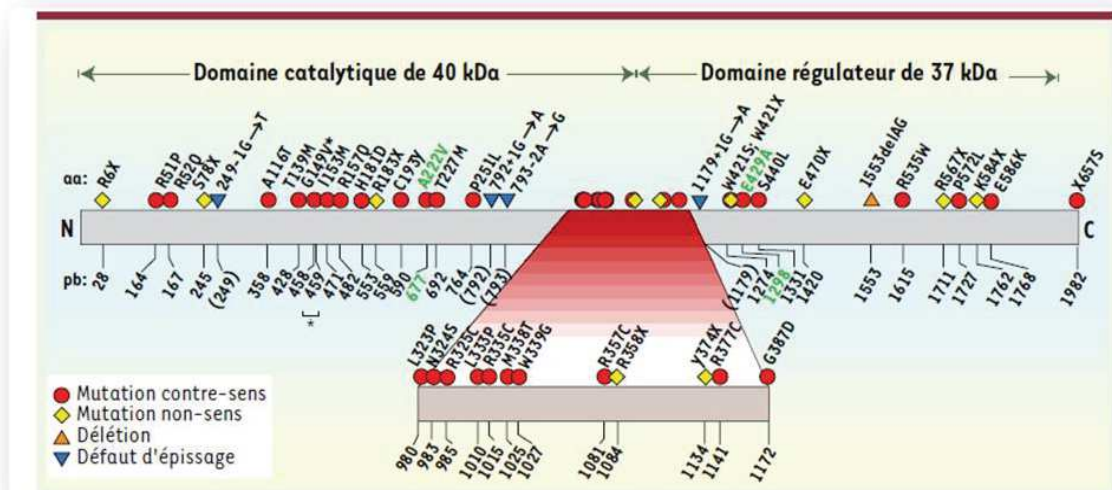
Sa région de promoteur a plusieurs sites de liaison de facteur de transcription, mais n'a pas de séquence de boîte TATA. Dans l'exon 1 du gène MTHFR, il existe un site d'épissage alternatif; Les séquences UTR de ce gène sont longues, ce qui peut être corrélé avec une régulation génétique complexe. (44)



#### 8.4. Les polymorphismes du MTHFR (42)

Plusieurs mutations ont été identifiées sur ce gène dont le nombre est de 41 mutations. Une soixantaine de polymorphismes de MTHFR ont été rapportées.

La Figure N°3 ci-dessous présente 41 mutations (numérotation en noir) qui sont propres aux familles des patients homocystinuriques répertoriés. Plusieurs mutations ont été exprimées en utilisant des systèmes bactériens ou des systèmes de levures, afin de vérifier leur effet sur l'activité enzymatique. Comme chacune de ces mutations graves n'est généralement observée que dans une ou deux familles, il peut être avantageux de procéder à un diagnostic moléculaire prénatal par étude de liaisons génétiques.



**Figure N°5 : Répartition des 41 mutations propres aux familles des patients homocystinuriques répertoriés (42)**

Les 41 mutations spécifiées n'ont été identifiées que dans des familles de patients présentant un déficit important de MTHFR. La protéine MTHFR est représentée par un rectangle et les acides aminés mutés sont indiqués au-dessus, ainsi que les mutations affectant l'épissage du gène. Les nombres sous le rectangle désignent la position des mutations dans la séquence de l'ADNc (GenBank GI: 6174884); 2 mutations différentes ont été identifiées à la position 1274. Les nombres entre parenthèses désignent la présence d'une mutation intronique à proximité du résidu mentionné. Les 2 polymorphismes de MTHFR les plus étudiés sont aussi indiqués, en vert.

### 8.5. Le polymorphisme C677T (47)

Le polymorphisme C677T caractérisé par une transition du nucléotide cytosine par la thymine en position 677, la partie N- terminal de l'exon 4.ils' ensuit une substitution du résidu alanine par la valine en position 222 (A222V). Cette mutation, à l'état homozygote ou hétérozygote est corrélée avec une réduction de 50% de l'activité enzymatique et une augmentation de sa thermolabilité. Les individus homozygotes pour cette mutation ont une élévation très significative de la concentration de l'homocystéine plasmatique, associée à une baisse du taux des folates. En revanche, des taux élevés en folates plasmatiques semblent neutraliser les effets dus à la mutation C677T MTHFR. En plus, le polymorphisme MTHFR C677T influence l'état de méthylation du DNA génomique par l'entremise de son interaction avec le métabolisme des folates.

### 8.6. Études moléculaires et biochimiques du polymorphisme 677C → T (48)

Le polymorphisme C → T à la pb 677 a été identifié de manière paradoxale en examinant un patient souffrant d'une altération sévère de *MTHFR*. De fait, ce polymorphisme se retrouve autant dans les groupes témoins que chez les patients homocystinuriques. bien que ,ces derniers soient en plus victimes de mutations graves. La substitution 677 C → T met en jeu une enzyme thermolabile possédant une activité moindre, c'est pourquoi le génotype mutant homozygote (677TT) est associé à une légère hyperhomocystéinémie. Cette association est encore plus évidente lorsque l'on considère des individus dont le sang présente un taux de folates réduit. Les études biochimiques des versions 677C et 677T de l'enzyme ont fourni une explication à l'effet protecteur de l'acide folique sur l'hyperhomocystéinémie des individus mutants.

Bien que l'identité des mutations sévères soit un bon indicateur de l'activité enzymatique résiduelle des patients homocystinuriques, le polymorphisme (et des facteurs externes comme l'acide folique ou la riboflavine) contribue à la complexité de la relation génotype-phénotype.

*Partie*  
*Pratique*



## PATIENTS ET METHODES

L'étude que nous avons entrepris est de type transversale cas-témoins a durée 03 mois, et elle a porté, sur, une population de 35 patients présentent un diabète de type 2 compliqué, et 60 témoins supposés sains.

### 1. Recrutement des sujets

35 sujets des deux sexes atteints d'un diabète de type 2 compliqués âgés entre 18 et 85 ans admis au niveau du centre Hospitalier universitaire de Constantine (CHUC) essentiellement au niveau du service d'Endocrinologie-Diabétologie, et, 60 témoins supposés sains, recrutés au niveau du service de médecine du travail, CHUC, et choisis par appariement aux patients diabétiques.

Des critères d'inclusions et d'exclusion ont été établis pour les diabétiques et pour la population témoins.

#### • *Critères d'inclusion* :

- *Pour les témoins* : sujets sains des deux sexes résidents à Constantine et âgé de 18 à 85 ans.

- *Pour les diabétiques* : sujets diabétiques de type 2, compliqués, et âgés entre 18 à 85 ans.

#### • *Critères d'exclusions* :

-*Pour les témoins* : □ infection urinaire (provoque une élévation de la micro albuminurie)

□ Antécédents familiaux d'atteinte cardiovasculaire, de néphropathies, de rétinopathies,

*Pour les diabétiques* : □ présence d'autres pathologies associés. Les critères de détermination des complications diabétique sont standardisés par les cliniciens.

### 2. Questionnaire et Enregistrements

#### 2.1. *Questionnaire* :

Un recueil de données a été effectué au niveau du service d'hospitalisation concerné ; en plus du dossier médical du (patient) malade un interrogatoire du patient est mené par nous-même. (Annexe N° 1).

#### 2.2. *Enregistrement*

Tous les prélèvements recrutés sont étiquetés soigneusement, portant le nom et prénom des sujets associés à la numérotation 1, 2, 3, 4... sur chaque questionnaire, est mentionnés le numéro de dossier et le lieu de prélèvement, ainsi que le numéro d'enregistrement de chaque sujet correspondant à celui sur notre registre.

### 3. Prélèvement Sanguin

Le prélèvement sanguin est effectué, systématiquement à chaque hospitalisation d'un patient pour cause de DT2. Avant le prélèvement, il est demandé au sujet de se placer en position semi assise pendant quelques minutes, de façon à limiter les effets hémodynamiques sur les taux de lipides, la position debout augmente la valeur de la cholestérolémie, tout comme une occlusion veineuse prolongée avec un garrot (49)

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube en présence d'EDTA (en quantité de 6 à 10 ml), et on ne prélève pas sur héparine parce que c'est un inhibiteur de la Taq polymérase.

- Acheminements au laboratoire dans les plus brefs délais.

### 4. Extraction de l'ADN

Toutes les études génétiques nécessitent la disposition d'échantillons d'acides nucléiques, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN, les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies (biopsie de villosités chorales...). Dans la grande majorité de cas la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre de copies et de méthodes de biologie moléculaire utilisée ultérieurement (PCR...) Les méthodes d'extraction des acides nucléiques sont diverses (50)

Celle employée dans notre étude est une méthode utilisant un solvant inorganique, Na Cl.

#### - Principe :

L'extraction de l'ADN consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges ; ils seront ensuite traités par :

-un détergent Sodium dodécyle sulfate (SDS), qui possède une action lytique sur les membranes cellulaires, il inhibe les nucléases et dénature les protéines par destruction de leur structure tertiaire ; et une protéinase K, qui dénature et dégrade les protéines.

Dans le lysat, l'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par précipitation au Na Cl. Le surnageant ainsi récupéré est traité par de l'éthanol pur, dans lequel une pelote de l'ADN se forme par précipitation.

L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (Tris EDTA 10 :1). Sa pureté ainsi que sa concentration sont estimées par spectrophotométrie à UV (Annexe N° 2).

• L'ETDA : est un agent chélateur des ions divalents (tels que  $Mg^{2+}$ ) nécessaires au fonctionnement des nucléases. Il est donc couramment employé comme inhibiteur indirect des DNAses.

#### 4.1. Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN

##### 4.1.1. Détermination de la pureté

###### • Principe

- l'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) Absorbent à 280 nm.

- l'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée (10  $\mu$ l de l'ADN solubilisé dans 990  $\mu$ l de l'eau stérile).

- Les DO (densité optique) sont lues à 260 et 280 nm (longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines) dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile).

- Par le moyen du rapport de DO 260 nm/ DO 280 nm, la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

On considère que

▪ L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport  $R = DO_{260} / DO_{280}$  est compris entre 1,6 et

2 ( $1,6 < R \leq 2$ ).

▪ L'ADN est contaminé par les protéines si:  $DO_{260} / DO_{280} < 1,6$ .

▪ L'ADN est contaminé par les ARN si:  $DO_{260} / DO_{280} > 2$ .

-La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée (Annexe 2). Les ADN purs sont conservés à + 4 °C jusqu'à utilisation.

##### 4.1.2. Détermination de la concentration de l'ADN :

###### • Principe

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

À 260 nm une unité de densité optique correspond à :

- 50 mg / ml pour une solution d'ADN double brin

- 250 mg / ml pour une solution d'ADN simple brin.

**1 unité de DO<sub>260</sub> nm = 50  $\mu$ g/ml d'ADN double brin.**

Exemple :

Pour un ADN solubilisé dans 1000 µl de TE 10 :1 ayant une DO<sub>260 nm</sub> = 0,139

1 unité de DO<sub>260 nm</sub> 50 µg/ ml d'ADN

0,139 de DO<sub>260 nm</sub> X

$X = 0,139 \times 50 = 6,95 \mu\text{g/ml}$

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100 (10 ml de l'ADN dilué dans 990 ml d'eau stérile), Donc  $6,95 \times 100 = 695\mu\text{g/ml}$ .

Donc :

***La concentration de l'ADN en µg/ml = facteur de dilution × DO 260 × 50µg/ml.***

La qualité de l'ADN peut être vérifiée par un contrôle de taille des molécules d'ADN qui doivent être suffisamment longues pour être digérés. L'ADN génomique doit donc être manipulé en évitant toute action mécanique violente.

## **5. Génotypage de la MTHFR**

Elle consiste à amplifier une partie de l'ADN contenant le gène, puis de différencier les génotypes par digestion d'une enzyme de restriction spécifique.

La détermination du génotype a été effectuée en plusieurs étapes successives :

- la PCR (Polymérase Chaîne Réaction) et contrôle de PCR sur gel d'agarose.
- La digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction Hinf I.
- La séparation des produits de digestion par migration électrophorétique sur un gel d'agarose et distinction des différents génotypes par transillumination sous UV.

### **5. 1. La PCR (Polymérase Chaîne Réaction)**

La PCR est une technique de biologie moléculaire(51) mise au point en 1985 par Kary Mullis et développée par Henri A. Herlich et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA).

#### ***1.1. Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR***

Pour préparer le milieu réactionnel (Annexe N° 3), multiplier la quantité de chaque composant par le nombre de tubes voulu + un, c'est le tube témoin négatif dans lequel on met uniquement le mélange sans ADN.

L'ADN est amplifié par PCR avec deux amorces encadrant la région avec les deux codons polymorphes d'acide aminé 222 de la MTHFR (Annexe N° 3: Tableau 9).

#### ***1.2. Déroulement des cycles de la PCR***

Chaque cycle de la PCR repose sur trois étapes indispensables : Dénaturation, hybridation et élongation (Annexe N° 3 : Tableau 10)

### 1.3. Contrôle des produits de la PCR

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % additionné à 10 µl de BET (Bromure d'éthidium), ce dernier est un réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition aux UV (le gel est ensuite coulé sur plaque d'une cuve horizontale).

Dans chaque puits du gel, il est déposé :

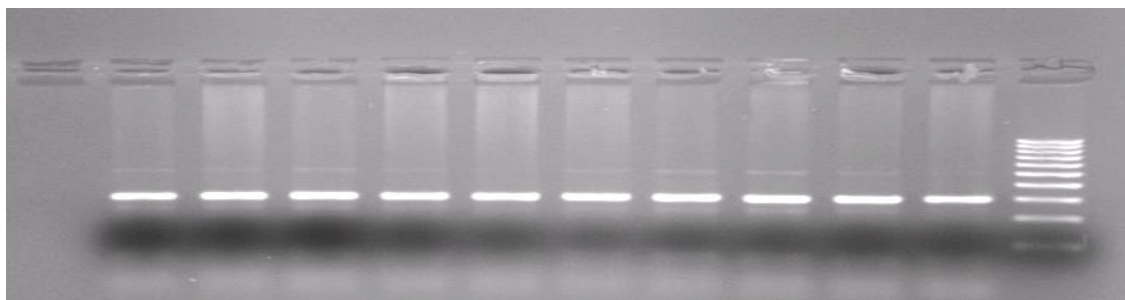
-10 µl de produit d'amplification + 3 µl BBP (Bleu de Bromophénol) qui permet de suivre le front de migration.

-3 µl de marqueur de taille (PM 100pb) +10µl H<sub>2</sub>O +2µl BBP.

Les dépôts se font du côté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant de 60 à 120 volts pendant 45 min Cette analyse permet aussi, d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN survenue au cours de la PCR.

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de bromure d'éthidium fixées aux ADN émettent une lumière visible et photographiable et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille (figure 6). Ce control permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR grâce au puits contenant le blanc (témoin négatif : T).

T      1      2      3      4      5      6      7      8      9      10      M



**Figure N°6 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés (198 pb) par PCR du gène MTHFR.**

### 5.2. Digestion des produits de PCR

Préparer le milieu de digestion de l'enzyme Hinf I pour de tubes voulu + 1 témoin (Annexe 4 : tableau 11).

### 1. Digestion par l'enzyme de restriction *HinfI* :

L'*HinfI* est une enzyme de restriction produite par la bactérie *Haemophilus influenzae*. Elle reconnaît et clive la séquence G/ANTC codant pour l'Alanine en position 222 (figure7).



**Figure N°7: site de restriction par l'enzyme *Hinf I***

Les produits de la PCR sont soumis à une digestion enzymatique par *HinfI*. Ils sont incubés pendant une nuit dans une étuve à 37°C.

Après incubation ils sont concentrés dans la même étuve à 65°C pendant 1 heure 30 à 2 heures.

### 2. Conditions de migration

#### - Préparation du gel d'agarose (Annexe 4) :

Après préparation du gel d'agarose (3g d'agarose dans 100 ml de TBE 1 X).

Monter le support du gel.

Homogénéiser, couler immédiatement en versant le contenu de bûcher dans le support en plaques de verre en ayant soin de ne pas faire de bulles.

Placer le peigne plat afin de former les puits et laisser polymériser à température ambiante pendant 1h 30 min à 2h 30 minutes.

#### - Dépôts des échantillons :

Quand le gel est polymérisé, plonger le système (gel + électrodes) dans la cuve horizontale contenant un volume (450ml) du tampon Tris Borate EDTA (TBE 1 X)

Oter le peigne et déposer délicatement au fond de chaque puits un échantillon ou marqueur (Annexe 4).

Nous déposons dans chaque puits du gel 12 à 14 µl du produit digéré et 3 µl du bleu de Bromophénol.

#### - Migration :

La migration se fait en parallèle avec des fragments d'ADN appelés marqueurs de taille (leurs tailles sont connues), à un voltage de 80 volts

## 2. Révélation du profil électrophorétique

Le BET fluorescent aux UV s'est fixé sur l'ADN (cette molécule s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN) et va permettre de visualiser les fragments de restriction dans le gel placé sur la table à UV.

Lorsqu'on obtient une séparation nette des différents fragments du marqueur (après 2h 30mn), le gel est photographié après transillumination aux UV (figure 8).

## 4. Profils RFLP obtenus

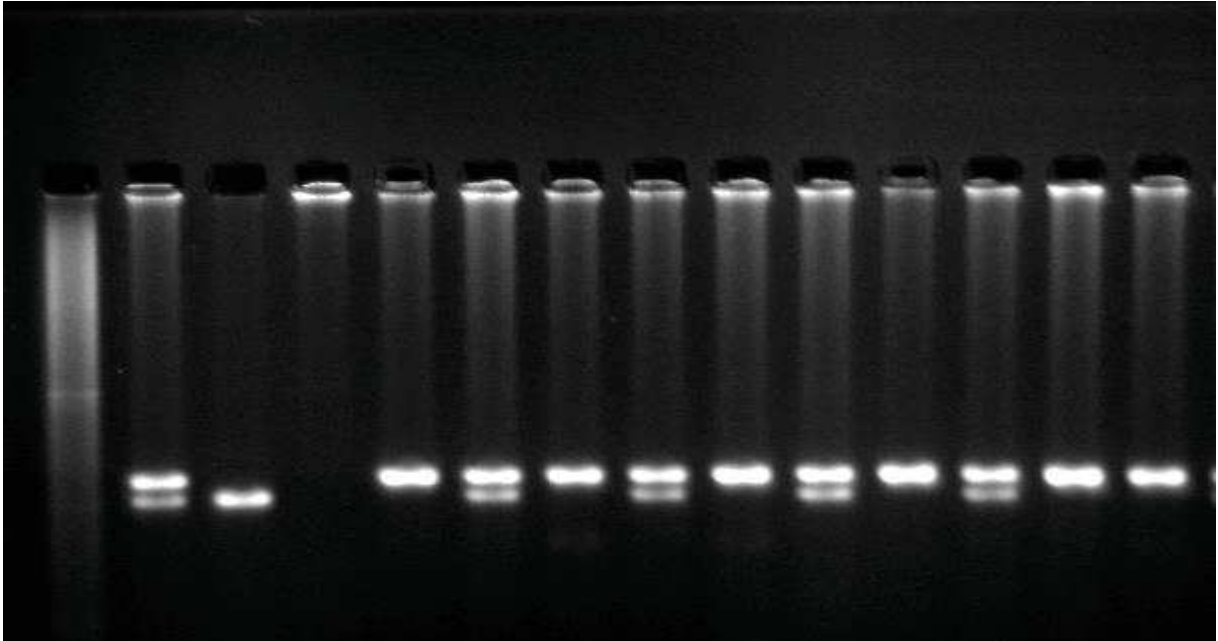
Ce polymorphisme, noté C677T, correspond à une substitution d'une cytosine par une thymine en position 677 dans la séquence nucléotidique et qui, se traduit dans la séquence protéique par la substitution d'une alanine par une valine sur le codon 222.

La digestion enzymatique de l'amplification de la MTHFR par la Hinf I a donné des fragments :

175 pb, 198 pb et 23 pb, le premier apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté (TT), le deuxième apparaît aussi sous forme d'une seule bande, il s'agit du type homozygote sauvage (CC). Les deux bandes ensemble, correspondent au type hétérozygote (CT) (voire la figure 8 ci dessous). Le troisième n'est pas visible à cause de son intensité trop faible.

Donc les conditions d'amplification étaient comme suit : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 65 °C pendant 30 secondes et une élongation à 72 °C pendant 40 secondes, et enfin une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes.

L'amplification a été suivie d'une digestion enzymatique par l'enzyme HinfI. Les produits de digestion ont été analysés sur un gel d'agarose à 3 % parallèlement à un marqueur de poids moléculaire. La révélation a été réalisée sous lumière ultraviolette (UV) après coloration au bromure d'éthidium. La présence du polymorphisme se traduisait par la visualisation d'une bande de 175 pb.



**Figure № 8 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage de Hinfl présentant différents génotypes d'MTHFR.**

## 6. Analyse statistique :

### 6.1. Statistique descriptive :

Vu que notre étude est transversal cas-témoins, nous avons opté, pour utilisés la statistique Descriptive.

- Le calcul de la moyenne arithmétique, et l'écart type

$$\bar{X} = \sum (n_i x_i) / n \quad \text{si } n > 30$$

$$\bar{X} = \sum (n_i x_i) / (n - 1) \quad \text{si } n \leq 30$$

Pour l'écart type de la moyenne

$$\text{L'écart type} = \delta = \sqrt{\text{Variance}} = \sqrt{\sum (X^- - X)^2 / N - 1} \quad \text{si } n \leq 30$$

$$\text{L'écart type} = \delta = \sqrt{\text{Variance}} = \sqrt{\sum (X^- - X)^2 / N} \quad \text{si } n > 30$$

Les variables quantitatives sont décrites par la moyenne  $\pm 1$  écart type, sauf exception qu'on précisera dans le texte.

### 6.2. L'enquête analytique :

Dans l'enquête analytique: pour étudier la relation entre un facteur d'exposition et la maladie, nous avons :



- Comparé la moyenne de la variable mesurant l'exposition chez les malades et les non malades.

Nous avons crée des classes et utilisé des méthodes qualitatives .Ces méthodes permettent de décrire la relation entre le facteur d'exposition et la maladie de manière plus concrète et permet l'utilisation de méthodes statiques plus simples (52) Le test utilisé dans ces conditions est le  $\chi^2$ .

### 6.3. Calcul de l'odds ratio :

Pour calculer l'odds ratio nous avons établi un tableau de contingence. Il est présenté sous forme de tableau croisé 2x2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

	Malades	Témoins	Total
Exposée (E+)	A	b	a + b
Non exposés (E-)	C	d	C + d
Total	a + c	b + d	a+ b +c+ d

La mesure de la cote d'un événement est un concept différent du taux ou de survenue de cet événement. La cote est le rapport entre la probabilité de survenue d'un événement et celle de la survenue d'un autre événement en général opposé au premier.

Dans notre enquête on ne peut pas calculer directement le taux de maladie, pas plus que la cote correspondante, puisque les nombres de la maladie sont fixés arbitrairement.

Cependant on peut calculer :

- La cote d'être exposé (Exposure Odds ; EO) pour les cas EO malades =  $a/c$ , pour les témoins EO témoins =  $b/d$

- Le rapport des cotes d'exposition qui est l'Odds ratio (Exposure Odds ratio)

$$\text{OR} = a \times d / b \times c$$

L'Odds ratio représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population (Prévalence <5%). Dans ce cas l'Odds ratio peut être une bonne approximation du risque relatif que donnerait une enquête de cohorte pour la population.

Pour déterminer s'il existe une stabilité épidémiologique, on a utilisé trois tests statistiques, en cherchant à tester l'hypothèse nulle  $H_0$  selon laquelle il n'y aurait pas d'association entre la maladie et le facteur de risque l'hypothèse nulle et formulé d'une seul manière qui est ( $H_0$ : OR=1).

#### 6.4. Les intervalles de confiance:

Les intervalles de confiance : ont été calculés par la méthode de Cornfield. L'approche estimative de l'analyse statistique vise à quantifier l'effet étudié et le degré de Certitude de cette estimation grâce à un intervalle de confiance, qui identifie généralement une fourchette de valeurs situées de part et d'autre de l'estimation et l'on peut être sur à 95% de trouvé la valeur réelle.

La notion d'un intervalle de confiance repose sur l'idée suivante : Si la même étude était réalisée sur un échantillon différent de patients, les résultats ne seraient pas identiques, mais Seraient proches du résultat véritable qui reste inconnu .l'intervalle de confiance estime cette variation due à l'échantillon (53)

L'intervalle de confiance pour les Odds ratio a été calculé à partir de l'approximation de Fliess.

#### 6.5. Choix de la "p value ":

Le seuil critique a priori est de 0.05 (risque $\alpha$ ) .Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative pour apparemment arbitraire est nécessaire pour l'homogénéité de la présentation des résultats.

L'usage a retenu de manière consensuelle l'ensemble des seuils (0.05, 0.01, 0.001) qui représentent des risques raisonnables pour prendre une décision.

Le seuil 0.01 doit être choisi lorsqu'en complément d'une étude épidémiologique descriptive, on teste le lien entre deux variables sans que l'on puisse a priori argumenter quand il existe une relation logique entre ces variables.

## **Résultats**

Notre étude est une observation transversal cas-témoins, qui a porté, sur 95 sujets, recrutés, au niveau du centre Hospitalier universitaire de Constantine (CHUC), comprenant 35 sujets atteints d'un diabète de type 02 compliqués, admis, au niveau du service d'endocrinologie-Diabétologie, et 60 témoins sains recrutés au niveau du service de médecine du travail.

### **1. Aspect Clinique des patients diabétiques**

Nos patients sont de diabétiques de type 2, présentant des complications (tout type confondu), avec des degrés de sévérité différentes.

Il ressort de nos enquêtes que les causes de ces états de sévérité sont multiples et additionnelles :

- la première cause est le diabète de type 2 lui-même du fait qu'il est asymptomatique pendant des périodes prolongées, la maladie s'installe de manière insidieuse, pendant des années, sans créer d'inconfort, de douleurs, ou même la sensation que « quelque chose ne va pas ». Le diabète de type 2 est souvent découvert par hasard, et en moyenne sept ans entre la découverte du diabète et son début réel, période suffisante pour le développement des lésions des petits et des gros vaisseaux sanguins, d'où l'installation des complications invalidantes.
- les diabétiques Algériens, ne sont pas disciplinés en matière d'hygiène de vie, on a remarqué ainsi chez nos patients le manque d'acceptation de réaliser de manière répétée un ensemble d'actions recommandées dans un objectif de santé à long terme.
- le refus de la maladie elle-même chez la majorité d'entre eux. Il s'agit d'une constatation d'un état de fait qui demande à être amélioré par une promotion de l'éducation thérapeutique et par un effort visant à remplacer une médecine centrée autour de la maladie par une médecine centrée autour du patient, en s'intéressant à toutes les dimensions bio-psycho-sociale et éducative, et surtout, de passer de la théorie à la pratique.

### **2. Age et Sexe Ratio**

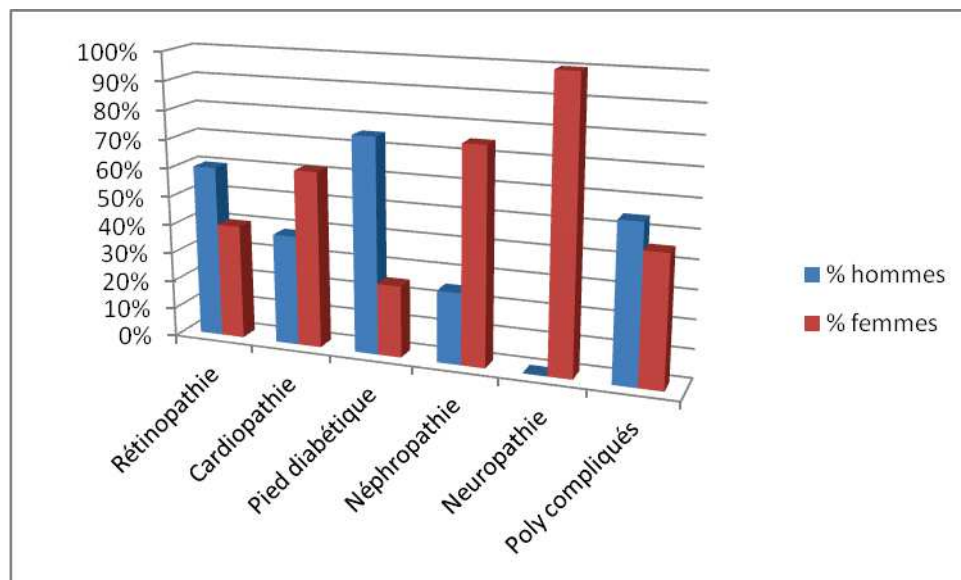
L'âge de nos patients est entre 18 et 85 ans.

-Les sujets témoins sont au nombre de 60 répartis (par appariement au diabétiques) en 40 % de sexe masculin, et 60% de sexe féminin.

-Les DT2 sont au nombre de 35 représentant 35,84% du total de sujets, répartis en 42,86 % de sexe masculin, et 57,14% de sexe féminin. Parmi ces diabétiques 14,28 % présentant comme complication une rétinopathie, répartis en 40 % femmes et 60 % hommes ; 37,14% ont une cardiopathie, 5,71% pied diabétique, 11,42% néphropathie, 2,86% neuropathie, et 28,59% poly-complicés (voir tableau N° 1 ci-dessous pour la répartition en sexe)

**Tableau N°1 : Répartition en sexe, dans chaque complication**

Complication	%	% hommes	% femmes
Rétinopathie	14,28 %	60 %	40 %
Cardiopathie	37,14%	38,46%	61,54%
Pied diabétique	11,42%	75%	25%
Néphropathie	11,42%	25%	75%
Neuropathie	2,86%	0%	100%
Poly compliqués	22,88%	54,55%	45,45%
Total	100%	42,86%	57,14%

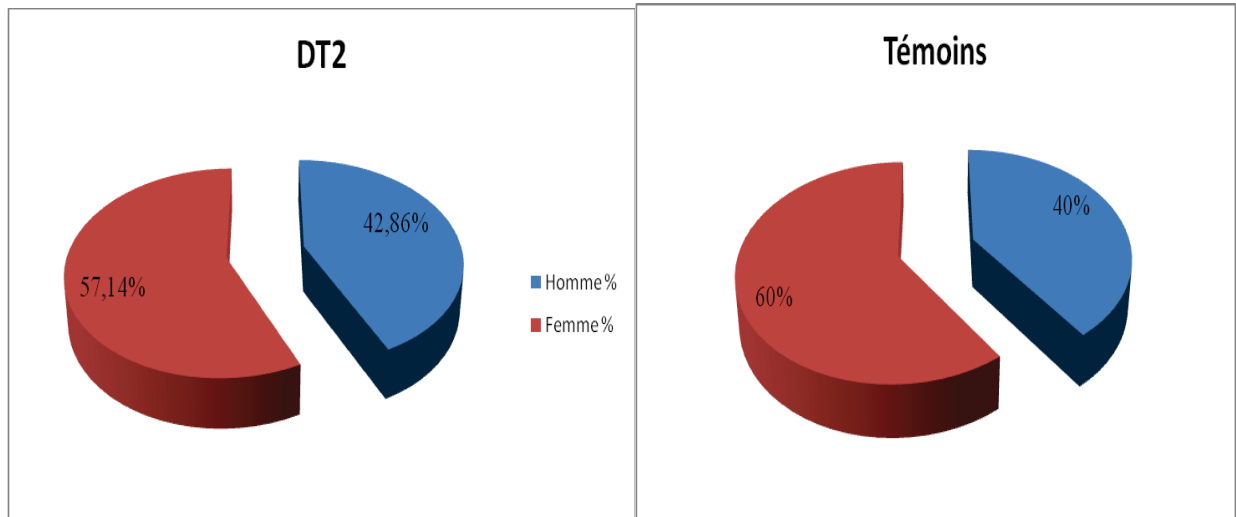
**Figure N°9 : Répartition en sexe dans chaque complication**

Cet échantillonnage a été réalisé au hasard (Tableau 1, Figure 9). Selon différentes études le DT2 montre un effet prononcé d'excès de femmes dans toutes les populations avec cependant des évidences d'une prépondérance masculine dans l'âge moyen. Les femmes ont une probabilité accrue de transmettre le DT2 à leur descendance (54)

Les données de la littérature concordent avec notre résultat, le sex-ratio dans notre échantillon a été de 0,75.

**Tableau N°2: répartition des sujets (témoins, et diabétiques) selon le sexe.**

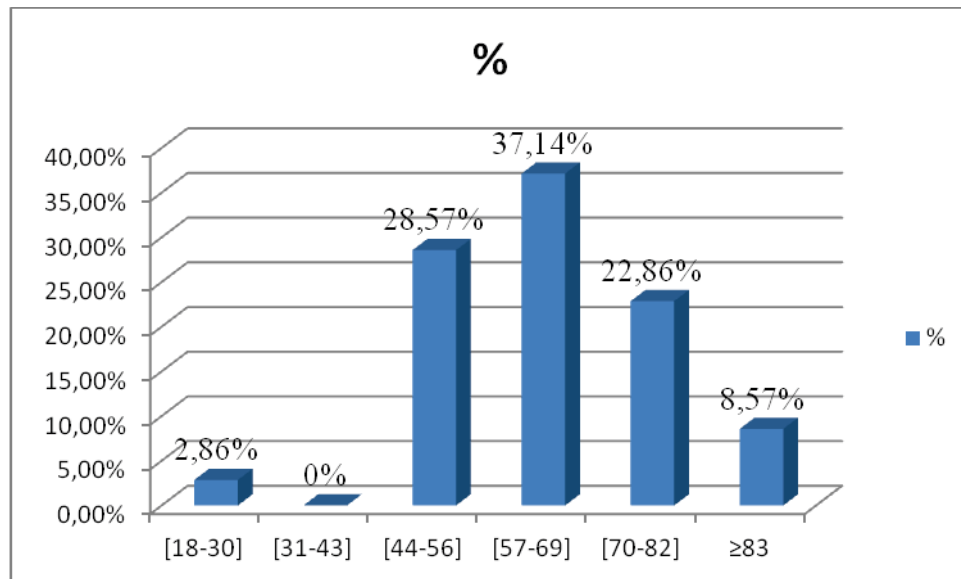
	Homme	Femme	Total
DT2	42,86 %	57,14%	35
Témoins	40 %	60%	60

**Figure N° 10 : Répartition des sujets DT2 et témoins selon le sexe**

### 3. Répartition des diabétiques en tranche d'âge

**Tableau N° 3: Répartition des diabétiques en Tranche d'âge**

Classe	N	%
[18-30]	01	2,86 %
[31-43]	0	0 %
[44-56]	10	28,57%
[57-69]	13	37,14%
[70-82]	8	22,86%
≥83	3	8,57%
Total	35	100 %



**Figure No 11 : Répartition des diabétiques en tranche d'âge**

Pour ce qui est de la répartition en tranche d'âge le Tableau 3 et la Figure 11 ci-dessus montrent que l'apparition du DT2, augmentent avec l'âge, et c'est ce qui a été démontré par de nombreuses études (55)

#### 4. Moyennes d'âge

**Tableau No 04 : Moyenne d'âge des Diabétiques**

	Hommes	Femmes	Total
<b>Moyenne d'âge</b>	68,21 ± 11,35	65,05 ± 17,19	62,6 ± 17,25

La moyenne d'âge de diabétiques est de  $62,6 \pm 17,25$  Ce que concorde avec des nombreuses études qui montrent que le DT2 s'observe indépendamment de sexe dans la plupart des cas après l'âge de 50 ans, et ne suit aucune répartition géographique ou ethnique particulière (56)

#### 5. Complications :

Les infections représentent la première cause d'hospitalisation des patients diabétiques. La raison d'hospitalisation pour les femmes était un DT2 compliqué et non équilibré, par contre la majorité des hommes présentent une artériopathie chronique des membres inférieurs, et un certain nombre d'entre eux avaient un pied diabétique ou une amputation. Et ceci concorde avec les données internationales, où le sexe ratio pour l'artériopathie diabétique est de 02 hommes pour une femme, alors que chez le patient non diabétique le rapport est de 10 hommes pour une femme (54)

Ainsi nous avons constaté au cours de notre enquête, dans la répartition des sujets selon les complications et le sexe, que les hommes présentant une rétinopathie, sont plus nombreux que les femmes.

La rétinopathie diabétique est une maladie du capillaire rétinien qui devient anormal et va avoir un comportement responsable de la pathologie oculaire. Souvent asymptomatique, la rétinopathie se caractérise par des changements au niveau des vaisseaux sanguins qui alimentent la rétine. Sa prévalence augmente avec la durée du diabète et le niveau de l'hyperglycémie chronique.

Selon l'UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) chez 2964 patients diabétiques de type 2 dont le diabète venait d'être découvert, la prévalence de la RD était de 39 % chez les hommes et de 35 % chez les femmes au moment du diagnostic du diabète (57) Résultat qui concorde avec le notre. Cependant pour la cardiopathie nous avons constaté une prédominance féminine, avec une proportion de (61,54%) et c'est ce qui corrobore avec différentes études réalisées à travers le monde tel que celle de Y.Hdidou, H.Aynaou et H.Latrech **réalisée en 2014, qui a concernée 51 cas (58).**

#### **6. Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes**

L'étude moléculaire a concernée nos 35 patients diabétiques ainsi que les 60 témoins présumés sains.

**Tableau 05 : fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR**

Témoins			Diabétiques		
	N	%		N	%
CC	22	36,67%	CC	14	40%
CT	21	35%	CT	12	34,29%
TT	17	28,33%	TT	09	25,71%
Total	60	100%	Total	35	100%

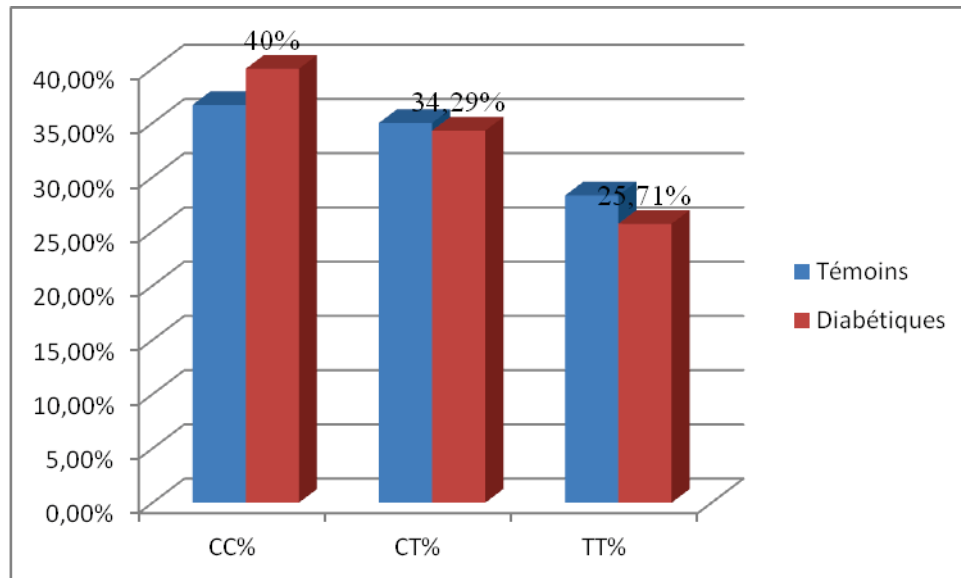
Le tableau 05 montre la comparaison des fréquences génotypiques entre les témoins et les Diabétiques.

Nous avons déterminé le génotype de 60 témoins et 35 diabétique de type 2 compliqué.

Le génotype C/T présente la même fréquence que le génotype C/C, dans les deux groupes, pris séparément.

Dans notre population témoin, prise au hasard, il représente 35 % ceci diffère avec certains études réalisées à travers le monde, et concorde avec d'autres (59)

La distribution des génotypes du polymorphisme de la C677T du MTHFR ne diffère pas beaucoup entre les témoins et les diabétiques, et elle présente le même ordre décroissant en fréquences, correspondant aux génotypes CC, CT, en premier lieu, puis, à un degré moins, TT respectivement (Tableau 05).



**Figure 12 : Répartition des fréquences génotypiques dans la population de Témoins et dans les diabétiques**

Selon les résultats obtenus (Figure 12), on peut observer que le génotype CT a, la même, fréquence, que le génotype homozygote, normal : CC, et, chez les diabétiques, et chez les témoins.

Le génotype homozygote muté TT, correspond à une fréquence de 25,71% chez les diabétiques, et il est de 28,33% chez, les témoins, montrant que la présence de cette mutation, n'est pas corrélée ni à la maladie ni à la présence d'un diabète de type2 compliqué. Ce résultat concorde avec certain nombre d'études(60)

En revanche d'autres études démontrent que la mutation TT 677 de la MTHFR est associée au, diabète de type 2 compliqué tel que l'étude réalisée par Najiba Fekih et al en 2017(61) (62)

La discordance entre notre étude et ces études, peut être expliquée par la taille de l'échantillon ; vu que notre échantillon est très restreint.

Un plus grand nombre d'études exhaustives, et/ou multicentriques, peut aider à expliquer cette disparité entre les résultats.

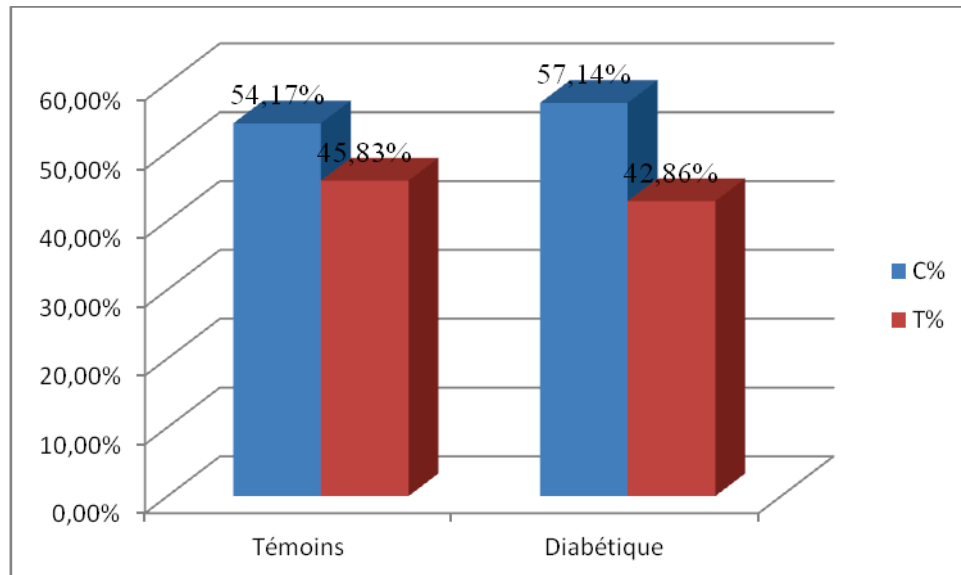


## 7. Répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes

**Tableau N°06: Fréquences alléliques de la MTHFR chez les diabétiques et chez les témoins.**

	Témoins		diabétiques	
	N	%	N	%
<b>C</b>	65	54,17%	40	57,14%
<b>T</b>	55	45,83%	30	42,86%
<b>Total</b>	120	100%	70	100%

Le tableau 6 montre que la répartition des allèles de la MTHFR est inégale sur l'ensemble de deux groupes. Cependant on trouve que l'allèle T présente la même fréquence dans les deux groupes (Figure 13), chez les témoins il est de 45,83 % par rapport à 42,86 % chez les diabétiques compliqués ; ce que confirme la non implication de l'allèle T dans la survenue d'un diabète de type 2.



**Figure N°13 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin et dans les diabétiques**

À ce stade de notre travail nous ne pouvons tirer des conclusions en ce qui concerne la relation entre la présence de l'allèle T et chaque type de complication pris séparément, comme rapporté dans la littérature (61) (62)

**Tableau 07 : Calcul des Odds ratio des sujets diabétiques ayant un allèle T par rapport aux témoins ayant un génotype CC.**

	Odds ratio	P
TT vs CC	0,77	ns
TT+CT vs CC	0,86	ns

\* : Limites de confiance selon Cornfield à 95%

---

Le calcul de l'Odds ratio montre que :

- les porteurs de l'allèle T ne présentent pas une association significative vis-à-vis d'un diabète de type 2 compliqué, suggérant que les sujets ayant un allèle T ne sont pas prédisposés à développer un diabète de type 2.

Ceci ne concorde pas avec les nombreuses études qui démontrent l'implication de l'allèle T dans la survenue d'un diabète de type 2 et /ou ses complications (36) (64)

# *Conclusion*

---

## Conclusions et perspectives

Notre étude sur des diabétiques de type 2 poly compliqués a révélé l'absence d'une association significative au polymorphisme C677T de la MTHFR.

Les travaux doivent se poursuivre, en étudiant l'interaction de ce polymorphisme avec d'autres facteurs génétiques, ainsi qu'avec des facteurs non génétiques

Le diabète de type2, reste de nos jours la pathologie chronique au pronostic le plus sombre. Il est classé parmi les maladies les plus mal diagnostiqué parce qu'il est asymptomatique dans les premiers stades de développement (expression clinique tardive)

Plusieurs facteurs de risque ont été débattus, mais les données scientifiques disponibles sont insuffisantes pour conclure.

Cependant, la prédisposition génétique reste, à ce jour, le seul facteur de risque ayant un impact sur l'incidence du diabète de type2.

Beaucoup de nouveaux techniques et méthodes sont proposées à travers le monde par des chercheurs afin de poser un diagnostic le plus tôt possible.

Un domaine clé de l'activité de recherche consiste à élaborer des meilleures méthodes de diagnostic du diabète de type2. De plus, il y a maintenant de forte présomption pour que les microARN puissent également servir de biomarqueurs circulants pour le diabète de type2. Malgré toutes ces avancées, l'impact sur le pronostic n'est toutefois pas prouvé.

Ce travail donne déjà une idée sur les particularités épidémiologiques du diabète de type2 dans l'Est-Algérien, étant donné que le CHU de Constantine draine la majorité des malades atteints d'un diabète de type2.

Les travaux doivent se poursuivre, dans ce but il nous apparaît intéressant, de réaliser des études multicentriques.

*Référence*

*bibliographique*

- [1] : **Froguel P.** Gènes de prédisposition au diabète, une belle avancée! Inserm–Actualités N° 207 Novembre-décembre 2007.
- [2] : **Berrut G et al.** La mutation C677T du gène de la 5,10–méthyltétrahydrofolate réductase est associée aux thromboses veineuses idiopathiques. La Revue de Médecine Interne. sept 2003;24(9):569-76.
- [3] : **Grimaldi A, Agnès H.** Guide pratique du diabète. 5<sup>e</sup> éd. paris: Elsevier Masson; 2012. 2-5 p.
- [4] : **VALENSI P, VIVIANI V, DUTEIL R.** Diabète Maladies métaboliques & Nutrition 2e édition. Paris: VERNAZOBRES GREGO; 2005. 65-115 p.
- [5] : **COLETTE C, Monnier L.** Diabétologie. 2<sup>e</sup> éd. paris: Elsevier Masson; 2014. 33-34 p.
- [9] : **Cerasi E, Ktorza A.** Plasticité anatomique et fonctionnelle des cellules  $\beta$  du pancréas endocrine et diabète de type 2. médecine/sciences. oct 2007;23(10):885-94.
- [10] : **Chanson P, Ferré P, Timsit J.** Physiopathologie du diabète non insulino-dépendant. 1991;7(4):336-45.
- [11] : **Barman S et al.** Physiologie médicale .3<sup>e</sup> éd. De Boeck Supérieur;2012. 315-316-317-318-319-321 p.
- [12] : **Magnan C, Ktorza A.** Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique. EMC - Endocrinologie. 1 déc 2005;2(4):241-64.
- [13] : **Avignon A, Monnier L.** Homéostasie glucidique et insulino-résistance. Application aux situations de stress. Nutrition Clinique et Métabolisme. 1 mars 1999;13(1):5-16.
- [14] : **Mihout F, et al.** Acute metabolic acidosis in a GLUT2-deficient patient with Fanconi-Bickel syndrome: new pathophysiology insights. Nephrol Dial Transplant. sept 2014;29 Suppl 4:iv113-116.
- [15] : **Bernard C, Ktorza A.** La plasticité du pancréas endocrine : une piste nouvelle pour le diabète de type II ? Médecine thérapeutique / Endocrinologie. 23 févr 2000;2(1):18-30.
- [17] : **Girard J.** Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline : mécanismes de la lipotoxicité. Med Sci (Paris). 1 août 2003;19(8-9):827-33.
- [18] : **Grimaldi A.** Diabète type 2. Elsevier SAS; 2004. 48 p.
- [19] : **Tanti JF et al.** Le Marchand-Brustel Y. Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. Annales d'Endocrinologie. 1 févr 2004;65(1):43-8.
- [20] : **Meyre D, Froguel P.** ENPP1, premier exemple d'un déterminant génétique commun à l'obésité et au diabète de type 2. Med Sci (Paris). 1 mars 2006;22(3):308-12.
- [21] : **Tchobroutsky G et al.** traité de diabétologie. 1990 éditions pradel- servier médical paris; 1990. 337-338 p.
- [22] : **Schlienger J-L.** Complications du diabète de type 2. Prise en charge du diabète de type 2 Dossier thématique. 2013;42(5):839–848.

- [23] : **PILLON F et al.** Diabète de type 2 : l'essentiel sur la pathologie. Actualités pharmaceutiques.2014 ; (541):145 p.
- [24] : **LUBETZKI J, CHANSON P, GUILLAUSSEAU PJ.** Endocrinologie et maladies métaboliques. 2<sup>e</sup> éd. Flammarion et C; 2000. 376 p.
- [25] : **Young J.** Endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques. 3<sup>e</sup> éd. paris: Elsevier Masson; 2016. 361-369-377-389-395-396-402 p.
- [26] : **Collèges des enseignants de nutrition France.** Nutrition: enseignement intégré, UE nutrition. 5<sup>e</sup> éd. Elsevier Masson; 2014. 193-1994 p.
- [27] : **Mc Farlane et al.** La néphropathie chronique en présence de diabète. Dans, Lignes directrices de pratique clinique 2013 pour la prévention et le traitement du diabète au Canada, Canadian Journal of Diabetes.2013;37Suppl 5:S504-S512p.
- [28]: **Bakker K, Apelqvist J, Schaper NC.** International Working Group on Diabetic Foot Editorial Board. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. Diabetes Metab Res Rev. févr 2012; 28 Suppl 1:225-31p.
- [29]: **Sladek R et al.** A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. Nature. 2007;445(7130):881-5.
- [30] : **GARNIER J.P.** G.LE MOEL, J.L.BEAUDEUX. Biologie endocrinienne et métabolique. Paris: John Libbey Eurotext; 2007. 50-51 p.
- [35]: **Flannick J et al.** Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. Nat Genet. avr 2014;46(4):357-63.
- [36]: **Davidson HW, Wenzlau JM, O'Brien RM.** ZINC TRANSPORTER 8 (ZNT8) AND BETA CELL FUNCTION. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. août 2014;25(8):415.
- [37]: **Cauchi Set al.** O25 Les nouveaux gènes associés au diabète de type 2 : impact dans des populations non européennes et mesure de leurs effets combinés. Diabetes & Metabolism. 1 mars 2008;34:H17.
- [38] : **Bernard C, Zuana OD, Ktorza A.** Interaction entre facteurs d'environnement et fonds génétique dans le diabète de type 2 - L'apport des modèles animaux. Med Sci (Paris). 1 août 2013;29(8-9):791-9.
- [39] : **LECOMPTE S.** Etude du rôle du gène PROX1 dans le diabète de type 2. UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE 2; 2012.
- [40] : **Jerbi Z, Abdennebi M et al.** Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. Annales de Biologie Clinique. 17 sept 2005;63(5):487-91.
- [41] : **Seriket I, Henia S.** Le polymorphisme C677T de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) chez des patients présentant un cancer du poumon. Université des Frères Mentouri Constantine; 2015.

- [42]: **Palizban A, Rezaei M, Khanahmad H, Fazilati M.** Transcription factor 7-like 2 polymorphism and context-specific risk of metabolic syndrome, type 2 diabetes, and dyslipidemia. *J Res Med Sci.* 2007; 23(3):297-302.
- [44]: **Gos M, SZPECHT-POTOCKA A.** Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. 2002;43(4):511-24.
- [45] : **BENLATRECHE M.** Étude de la relation entre le polymorphisme de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR), et la survenue des complications dégénératives chez le diabétique de type 2 (DNID) dans la commune de Constantine. Préparer un magister en Génétique des pathologie Humaine. Université Mentouri Constantine ; 2008.
- [47]: **Thierry P-T et all.** Fréquence du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les populations arabe et berbère du Maroc. 2009;11-7.
- [48] : **Leclerc D, Rozen R.** Génétique moléculaire de MTHFR - Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. *Med Sci (Paris).* 1 mars 2007;23(3):297-302.
- [49] : Médecine/Science Mars 2007 Volume 23 n° 3
- [50] : **VALDIGUIE. P.** *Biochimie clinique.* Médicales internationales. 2eme édition .paris .1995.
- [51] : **DELPECH M.** *les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin.* *Ann Biol Clin.* 1997 ; 57 :77-84.
- [52] : **Rumeau-Rouquette C., Blondel B., Kaminski M, Bréart G.** *Epidémiologie : méthodes et pratique.* Flammarion-Médecine, Paris, 1993.
- [53] : **FRANOIS D., DRUCKER J., MOREN A.** *Epidémiologie d'intervention.* Editions Arnette (1992) :589.
- [54] : **André Grimaldi et al.** *Traité de Diabétologie.* (Ed) Flammarion. (2005): 1-522.
- [56]: **Delahanty L M et al.** For the DPP Reseach Group, Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin, *N Engl J Med* 2002 ;346 :393-403.
- [57]: **KOHNER E. et al.** United Kingdom Prospective Diabetes Study, 30. Diabetic retinopathy at diagnosis of non-insulin dependent diabetes mellitus and associated risk factors. *Arch Ophthalmol*, 1998; 116: 297-303.)
- [58]: **Y.Hdidou., H.Aynaou., H.Latrech.** La cardiopathie ischémique chez les diabétiques de type 2 : à propos de 51 patients. *Diabetes & Metabolism.* Volume 40, Supplement 1, March 2014, Pages A38-A39.
- [59]: **Lorenzo D., Botto, Quanhe Yang.** National Office of Public Health Genomics, HuGENetTM, November 2, 2007.
- [60] : **M Chadli-Chaieb1 et al.** Polymorphisme C677T et A1298C du gène de la Méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et risque cardiovasculaire chez le diabétique de type 2. *Diabetes Metab* 2008, 34, A40-A100).



[61]: *Najiba Fekih et al.* Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) (C677T and A1298C) Polymorphisms and Vascular Complications in Patients with Type 2 Diabetes Can J Diabetes xxx (2017) 1–6.

[62]: *Dariusz Moczulski et al.* Effects of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene on the genetic predisposition for diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant (2003) 18: 1535–1540.

[63]: *Settin. A et al.* Association of ACE and MTHFR genetic polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: Susceptibility and complications. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2015 Dec; 16(4):838-43

[64]: *Zhou. TB et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism and diabetic nephropathy susceptibility in patients with type 2 diabetes mellitus. Ren Fail.2015; 37(8):1247-59.

### Webographie :

[6] : OMS : Rapport mondial sur le diabète [en ligne]. WHO. 2016 [page consulté le 25juin2016]. Disponible sur: <http://www.who.int/diabetes/global-report/fr/>

[7] : rédaction L. Le diabète progresse en Algérie [en ligne]. Algérie Focus. 2014 [page consulté le 2 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.algerie-focus.com/2014/10/le-diabete-progresse-en-algerie/>

[8] : Algérie : Le diabète gagne du terrain [en ligne]. Al Huffington Post. 2014 [page consulté le 2 juin 2017]. Disponible sur: [http://www.huffpostmaghreb.com/2014/10/18/diabete-taux-prevalence-a\\_n\\_6007374.html](http://www.huffpostmaghreb.com/2014/10/18/diabete-taux-prevalence-a_n_6007374.html)

[16] : *Serge Halimi.* Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) (223b) - Corpus Médical de la Faculté de Médecine de Grenoble [en ligne]. 2003 page consulté le4 juin 2017]. Disponible sur: <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/endoc/diabeto/233b/lecon233b.htm>

[31] : TCF7L2 transcription factor 7 like 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [en ligne]. [page consulté 16 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=6934h>

[32]: Hhex hematopoietically expressed homeobox [ *Mus musculus* (house mouse) ] –Gene-NCBI [en ligne]. [Page consulté 16 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/15242>

[33] : EXT2 exostosin glycosyltransferase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [en ligne]. [Page consulté 5 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2132>

[34] : Gene: SLC30A8 (ENSG00000164756) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 88 [en ligne]. [Page consulté 12 mai 2017]. Disponible sur: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000164756;r=8:116950273-117176714](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000164756;r=8:116950273-117176714)

[43] : methylenetetrahydrofolate reductase [Mus musculus] - Gene - NCBI [en ligne]. [Page consulté 16 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAD20313.1>

[46] : MTHFR methylenetetrahydrofolate reductase [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI [en ligne]. [Page Consulté 20 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4524>

[55] : *Serge HALIMI*, le diabète de type 2 ou DNID Avril 2005, <http://www-sante.uifgrenoble.fr/sante/>



## Annexe 1 : Le questionnaire

Date :

No.

Nom : ..... Prénom ..... Sexe :

Age :  Poids :  Taille :  Tour de taille :

Situation familiale Marié (e) :  Célibataire :  Autre :

Niveau d'étude : Primaire :  Secondaire :  universitaire :  Autre....

Fonction : .....

Origine ethnique :

Autres : .....

Fumeur :   Nbre/J :  Café :  Nbre/J :

Chique :  Alcool :

Tension artérielle :   Systolique :  Diastolique :

Contraceptifs :   Types de contraceptifs : .....

Age de diabète :

Pathologies associées :

Antécédents Personnels	Antécédents Familiaux

Diagnostic : .....

Examens complémentaires : .....

Traitements : .....

Chol : ... TG : ... HbA1c : ...  $\mu$ Alb : ... Hcy : ... Glycémie : ... Autre :

## Annexe 2:

### -Les étapes de l'extraction de l'ADN :

#### 1- Préparation des leucocytes

- Dans un tube Falcon de 50 ml ; mettre le sang total (7-10 ml) et compléter à 45ml avec du TE 20 :5. Laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger 15 min à 3900 g (3900 rpm).
- Déverser le surnageant prudemment afin de garder le culot leucocytaire précipité au fond de tube.
- Rajouter le TE 20:5 au culot jusqu'à 25-30 ml, agiter pour le remettre en suspension et laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.
- Déverser le surnageant : obtention d'un culot de leucocytes. (Si on s'arrête à ce niveau, les mettre dans un tube nunc de 15 ml avec du TE 10 :1 et les conserver à -20°C dans un congélateur).

#### 2- Extraction de l'ADN

- Décongeler les leucocytes.
- Centrifuger pendant 15 min à 3900 rpm
- dilacérer le culot de leucocytes soigneusement afin de les prendre complètement et les mettre dans un tube Falcon conique de 15 ml.
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (Na Cl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2)
- Ajouter 200 µL de SDS à 10% (100 g SDS + 1000 ml H<sub>2</sub>O)
- Ajouter 100 µL de protéinase K (PK) à 10 mg / ml.
- dans l'étuve, Agiter le tube sur une roue rotative à 37°C pendant une nuit.
- Le lendemain ; refroidir dans la glace.
- Ajouter 1 ml de Na Cl 4 M et agiter rigoureusement à la main.
- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
- Centrifuger 15 min à 2500 rpm.
- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu (100%) préalablement refroidi et agiter en tournant le tube plusieurs fois : **la formation de la méduse** visible à l'œil nu. (Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote d'ADN ne se forme pas).
- Récupérer la pelote d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube nunc (ependorf) stérile.

### **3-Solubilisation de l'ADN :**

- L'ADN est réhydraté en ajoutant entre 300 et 1000  $\mu\text{L}$  de TE 10 :1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (de 1 jusqu'à 3 jours).
- Pour la réextraction de l'ADN, dans le cas où il est contaminé (par des protéines ou par un ARN), ajouter à la solution d'ADN, 200  $\mu\text{l}$  SDS et 200  $\mu\text{l}$  PK, agiter et laisser dans la roue à une température de 37°C pendant 7 jours, puis déterminer la DO de cette ADN.

### Annexe3

**Tableau 9: Préparation du milieu réactionnel du PCR pour MTHFR**

PCR	MIX	X Nombre D' ADN	Quantité
H2O	35.2 $\mu$		
Tampon 10x sans Mg cl2			
Dntp 2Mm	5 $\mu$		
MgCl2 Mm (1,5mM)	3 $\mu$		
Oligo F (100 pmol/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$		
Oligo R (100pmol/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$		
Taq polymérase	0,4 $\mu$		

**Dans l'ependorf : 2 $\mu$ l ADN + 49  $\mu$ l Mix ; puis dans le thermocycleur et appliquer le programme de l'MTHFR.**

➤ **Oligo nucléotides utilisés :**

Oligo F (forward primer) : 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'

OligoR (reverse primer) : 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

➤ **Dilutions des solutions mères utilisées**

- ❖ Oligo F solution mère 268 ,2ml (dilution 1/25)

Oligo F solution fille : 37,28 ml de Oligo F solution mère + 62,72 ml H2O distillé.

- ❖ Oligo R solution mère 333ml

Oligo R solution fille : 30 ml de Oligo R solution mère + 69,97 ml H2O distillé.

- ❖ dNTP solution mère

dNTP solution fille : 10 ml de dNTP solution mère + 90 ml H2O

- ❖ MgCl2 solution mère

50ml MgCl2 + 50ml H2O distillé

**Tableau 10: Déroulement des cycles de la PCR dans le thermocycleur**

<b>Nombre de cycles</b>	<b>Étape</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Durée</b>
<b>X1</b>	<b>Dénaturation</b>	<b>94</b>	<b>5min</b>
<b>X30</b>	<b>Dénaturation</b>	<b>94</b>	<b>30s</b>
	<b>Hybridation</b>	<b>65</b>	<b>30s</b>
	<b>Elongation</b>	<b>72</b>	<b>40s</b>
		<b>72</b>	<b>10min</b>
		<b>4</b>	<b>5min-24h</b>



## Annexe 4

**Tableau 11: préparation du milieu de digestion par l'enzyme Hinf I**

Milieu de digestion	Quantité en $\mu$ l
Tampon de Hinf I	5
Hinf	1
H <sub>2</sub> O	4
BSA (Bovine sérum albumine)	0,2

**X (nombre de produit de PCR) 30 ml produit PCR +10 ml de Mix**  
- le BSA est un activateur.

**Préparation du gel d'agarose :**

**1, 5 g d'agarose + 100 ml TBE 1X + 10 ml BET (Bromure d'etidium)**

**Dépôts des échantillons :**

- 15  $\mu$ l de produits de digestion + 2 à 3  $\mu$ l de Bleu de promophéno

- 3  $\mu$ l de marqueur (PM 20pb LADDER ref.018206) + 2 à 3  $\mu$ l de Bleu Bromophéno.

**Préparation de Bleu de Bromophéno (BBP) : BBP 20mg**

[(Tris 0.5M: 2ml + Glycérol: 5ml) PH 7.5] Qsp 10 ml H<sub>2</sub>O

**Préparation de TBE 10X: Tris 108g**

- Acide borique 55g

- Ajuster le PH à 8.3 avec l'acide acétique glacial

- EDTA 9.3g

- QSP 1L H<sub>2</sub>O

# *Résumé*

---

## Résumé

Dans toutes les études de taille suffisante pour se prêter à ce type d'analyse, Il est, reconnu que le polymorphisme C677T est significativement corrélé au degré de gravité des complications cardiovasculaires diabétiques, et surtout responsable de l'augmentation du taux de mortalité.

L'objectif de cette étude a été de réaliser une approche sur, la relation entre le polymorphisme C677T du gène MTHFR et la survenue d'un diabète de type 2 et /ou ses complications dans l'est Algérien. Le polymorphisme C677T est un paramètre, selon différentes études, susceptible, d'être impliquer dans l'apparition des complications cardiovasculaires du diabète de type 2.

Les résultats de notre étude, montrent que les porteurs de l'allèle T ne présentent pas une association significative vis-à-vis d'un diabète de type2 compliqué, suggérant que les sujets ayant un allèle T ne sont pas prédisposés à développer un diabète de type 2 et /ou ses complications.

Les résultats de notre étude, ne, nous permettent pas, de tirer des conclusions en ce que concerne l'implication, du polymorphisme C677T dans, chaque type de complication prise indépendamment des autres

Cela ne signifie pas autant que l'implication du polymorphisme C677T, ne soit pas corrélée à certains d'autres facteurs non génétiques.

### **Mots Clés :**

Diabète de type 2 Compliqué- mutation C677T- MTHFR.

## Abstract

In all studies of sufficient size to lend themselves to this type of analysis, it is recognized that the C677T polymorphism is significantly correlated with the degree of severity of diabetic cardiovascular complications, and mostly responsible for the increased mortality rate.

The aim of this study was to investigate the relationship between the polymorphism C677T of the MTHFR gene and the occurrence of type 2 diabetes and / or its complications in eastern Algeria. The C677T polymorphism is a parameter, according to different studies, likely to be involved in the appearance of cardiovascular complications of type 2 diabetes.

The results of our study show that the T allele carriers do not have a significant association with complex type 2 diabetes, suggesting that subjects with a T allele are not predisposed to develop diabetes Type 2 and / or its complications.

The results of our study do not allow us to draw conclusions as far as the involvement of the polymorphism C677T in each type of complication taken independently of the other this does not mean as much as the involvement of the polymorphism C677T, Is not correlated with some other non-genetic factors.

Keywords: Diabetes type 2, mutation C677T, MTHFR.

## ملخص

في جميع البحوث الموسعة حول هذا النوع من الدراسة تبين أن هناك علاقة بين التنوع C677T و مضاعفات مرض السكري المؤدية إلى ارتفاع نسبة الوفيات.

الهدف من هذه الدراسة هو معرفة طبيعة العلاقة بين التنوع C677T للجين MTHFR مع ظهور مرض السكري و مضاعفاته في شرق الجزائر .

وفقا للعديد من الدراسات تبين أن هذا التنوع C677T مرتبط بظهور مضاعفات القلب و الأوعية الدموية لمرضى السكري .

نتائج دراستنا لم تسمح لنا باستخلاص استنتاجات فيما يخص ارتباط التنوع C677T بمضاعفات مرض السكري 2 لكن هذا لا ينفي وجود علاقة بين هذا التنوع و عوامل أخرى غير وراثية ;

كلمات مفتاحية : مرض السكري نوع 2 ، طفرة C677T ، MTHFR .

*Année Universitaire : 2016/2017*

*Présenté par : Benguedouar Rayenne  
Bouseksou Ismahane  
Daba Fadoua*

**Etude de la relation entre le polymorphisme C677T de la méthylentetrahydrofolate réductase (MTHFR), et la survenue des complications chez le diabétique de type2 dans l'Est Algérie**

*Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en génétique moléculaire.*

**Résumé**

Dans toutes les études de taille suffisante pour se prêter à ce type d'analyse, Il est, reconnu que le polymorphisme C677T est significativement corrélé au degré de gravité des complications cardiovasculaires diabétiques, et surtout responsable de l'augmentation du taux de mortalité.

L'objectif de cette étude a été de réaliser une approche sur, la relation entre le polymorphisme C677T du gène MTHFR et la survenue d'un diabète de type 2 et /ou ses complications dans l'est Algérien. Le polymorphisme C677T est un paramètre, selon différentes études, susceptible, d'être impliquer dans l'apparition des complications cardiovasculaires du diabète de type 2.

Les résultats de notre étude, montrent que les porteurs de l'allèle T ne présentent pas une association significative vis-à-vis d'un diabète de type2 compliqué, suggérant que les sujets ayant un allèle T ne sont pas prédisposés à développer un diabète de type 2 et /ou ses complications.

Les résultats de notre étude, ne, nous permettent pas, de tirer des conclusions en ce que concerne l'implication, du polymorphisme C677T dans, chaque type de complication prise indépendamment des autres.Cela ne signifie pas autant que l'implication du polymorphisme C677T, ne soit pas corrélée à certains d'autres facteurs non génétiques.

**Mots clés :** Diabète de type 2 Compliqué- mutation C677T- MTHFR.

**Structure de recherche :** Service d'Endocrinologie du CHU de Constantine.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Biologie et de Génétique Moléculaire de l'UC3.

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** BENHIZIA Hayette (MCB-UFM Constantine1)

**Rapporteur :** BENLATRECHE Moufida (MAA-UFM Constantine1)

**Examineurs :** REZGOUNE Mohamed Larbi (MCB-UFM Constantine1)

**Date de soutenance:** 04/07/2017