

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

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMCCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la
Terre et de l'Univers
Département de biologie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie
Option : biologie moléculaire et génétique

THEME :

Elaboration d'amorces pour le gène HLA
DR₃/DR₄ lié au diabète du type 1

Présenté par : BENSENANE Aboubakr

Soutenue le : 10 /10 /2017 Devant le jury composé de :

MR BENAMMAR C	M.C.A	Université de Tlemccen	Président
Mme LOUIKIDI B	M.C.A	Université de Tlemccen	Examineur
Mme BRAHAMI N	M.C.B	Université de Tlemccen	Encadreur

Année universitaire : 2016-2017.



Remerciement

Mes remerciements les plus sincères vont tout d'abord à Madame BRAHAMI N, pour m'avoir orienté tout au long de mon travail avec sa constante disponibilité. C'est grâce à sa compétence que ce travail a pu être réalisé.

Je remercie infiniment Monsieur BENAMMARC de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

J'adresse mes sincères remerciements à MADAME LOUIKIDI B pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens aussi à adresser des remerciements très spéciaux à mes parents pour le fait d'être toujours présent pour moi

Je tiens ensuite à remercier mes frères et sœurs, neveux et nièce, beaux-frères et belles-sœurs.

Je remercie ensuite tous les membres de ma famille pour avoir partagé cette immense joie avec moi et d'être présent à toutes les occasions.

Enfin je remercie tout mes amis et je regrette de ne pas pouvoir citer tous leur noms de m'avoir supporté et d'être comme des frères pour moi.

MERCI tout le monde.

Résumé :

Introduction. L'incidence du diabète de type 1 (DT1) dans différents groupes ethniques est extrêmement variable, suggérant l'implication aussi bien de déterminants génétique que d'éléments de l'environnement. Des études précédentes ont montré que des sujets caucasiens hétérozygotes DR3/DR4 ont 50 fois plus de risques de développer un diabète par rapport à la population générale.

Compte tenu des statistiques élevées du DT1 en Algérie et l'absence d'études d'associations génétiques chez cette même population le but de cette étude est de concevoir des amorces spécifiques encadrant les transcrits des gènes HLA DR3 et DR4 afin d'évaluer, par la suite, le risque conféré par ces allèles sur l'apparition du DT1 dans la population Algérienne au cours d'études ultérieures de type cas-témoins ou des études de familles.

Matériel et méthodes. Les séquences génomiques et des transcrits des gènes HLA-DR3 et HLA-DR4 ont été obtenus grâce à la base de données Ensembl. Le logiciel Primer-Blast a été utilisé pour concevoir des amorces spécifiques encadrant une partie de chaque transcrit.

Résultats. Dans un premier temps, des amorces aspécifiques ont été obtenus, ce qui nous a obligés à changer la séquence à amplifier. Les amorces obtenues sont spécifiques des transcrits des gènes HLA DR3 et DR4 et présentent des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR classique ou une RT-qPCR.

Summary:

Introduction The incidence of type 1 diabetes (T1D) in different ethnic groups is highly variable, suggesting the involvement of both genetic determinants and environmental elements. Previous studies have shown that DR3 / DR4 heterozygous Caucasian subjects are 50 times more likely to develop diabetes than the general population.

Taking into account the high statistics of DT1 in Algeria and the absence of studies of genetic associations in this same population, the aim of this study is to conceive specific primers framing the transcripts of the HLA DR3 and DR4 gene in order to evaluate the risk conferred by these alleles on the occurrence of T1D in the Algerian population in subsequent case-control studies or family studies.

Material and methods. The genomic sequences and transcripts of the HLA-DR3 and HLA-DR4 genes were obtained using the Ensembl database. The Primer-Blast software was used to design specific primers framing a portion of each transcript.

Results. Initially, aspecific primers were obtained, which forced us to change the sequence to be amplified. The primers obtained are specific to the transcripts of the HLA DR3 and DR4 genes and exhibit optimal characteristics for the smooth operation of a conventional PCR or a RT-qPCR.

الملخص:

مقدمة: انتشار مرض السكري من النوع 1 (T1D) في مجموعات عرقية مختلفة هو متغير للغاية، مما يشير إلى مشاركة كل من العوامل الوراثية والعناصر البيئية. وقد أظهرت الدراسات السابقة أن DR3 / DR4 المواضيع القوقازي متخالف هي أكثر عرضة 50 مرة لتطوير مرض السكري من عامة السكان. مع الأخذ بعين الاعتبار إحصاءات عالية من DT1 في الجزائر وغياب الدراسات للرباطات الوراثية في نفس السكان، والهدف من هذه الدراسة هو تصور الإشعال محددة تأطير النصوص من هلا DR3 و DR4 الجينات من أجل تقييم المخاطر التي تمنحها هذه الأليلات على حدوث T1D في السكان الجزائريين في دراسات لاحقة للتحكم في الحالات أو دراسات الأسرة.

المواد والأساليب : تم الحصول على تسلسل الجينومية والنصوص من الجينات هلا-DR3 و هلا-DR4 باستخدام قاعدة بيانات إنزيميل. تم استخدام البرنامج التمهيدي الانفجار لتصميم الإشعال محددة تأطير جزء من كل نص.

النتائج : في البداية، تم الحصول على الإشعال محددة، الأمر الذي أجبرنا على تغيير تسلسل ليتم تضخيمها. الإشعال التي تم الحصول عليها هي محددة لنصوص جينات هلا DR3 و DR4 وعرض الخصائص المثلى للعمل السلس ل ير التقليدية أو رت-قر.

Table des matières

Liste Des Tableaux	
Liste Des Figures	
Liste des abreviations	
1. Définition.....	3
2. Classification étiologique du Diabète de type 1.....	4
2.1. Le diabète de type 1 auto-immun (type 1A).....	4
2.2. Le diabète de type 1 idiopathique (type 1B).....	4
3. Aspect génétique	4
3.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité	7
3.2. Association des allèles du CMH avec l'apparition du diabète de type 1	9
4. Elaboration des amorces.....	11
4.1. La PCR (réaction de polymérisation en chaîne)	11
4.1.1. Principe de la PCR	11
4.1.2. Les acteurs de la PCR	12
4.1.3. Instrumentation et composants pour la PCR.....	12
4.1.4. RT-PCR.....	13
4.1.5. Nature exponentielle de la réaction PCR	14
4.2. Les amorces.....	15
4.2.1 Définition des amorces	15
4.2.2. Conception des amorces pour la PCR	15
4.2.3. Sélection des amorces	15
1. La Séquence du gène DR3	18
2. Séquence du gène DR4 :.....	20
3. L'outil Primer-Blast.....	20
3. Analyse des Résultats du Primer Blast :.....	22
1. La Séquence du transcrit DR3	23
2. La Séquence du transcrit DR4	24
3. Résultats de la conception des amorces	25
3.1. Les amorces encadrant le transcrit du gène DRB3	25
3.2. Les amorces encadrant le transcrit du gène DRB4	31
4. Perspectives.....	34
Conclusion.....	47
References bibliographiques.....	48

Liste Des Tableaux

Tableau 1. Gènes de susceptibilité impliqués dans le déclenchement du diabète de type 1

Liste Des Figures

Figure 01 : Carte simplifier de la région HLA

Figure 02 : Les étapes de l'amplification PCR

Figure 3 : Plateforme de la base de données ENSEMBLE.

Figure 4 : Introduction du gène DR3 dans la base de données

Figure5 : code donnée pour le gène HLA.DRB3

Figure 6 : plateforme de la banque de donnée NCBI

Figure 7 : interface du logiciel Primer-Blast

Figure 8 : le code du transcrit du gène HLA.DRB3 dans la base de données ENSEMBL

Figure 9 : séquence du transcrit du gène HLA.DRB3 depuis la base de données Ensembl.

Figure10 : code du transcrit du gène HLA.DRB4 dans la base de données Ensembl.

Figure11 : séquence du transcrit du gène HLA.DRB4 depuis la base de données Ensembl.

Figure12 : Représentation graphique des 6 paires d'amorces encadrant une partie du transcrit DR3

Figure 13 : Les 6 paires d'amorces obtenues avec l'outil primer-blast, encadrant une partie du transcrit du gène DR3

Figure 14 : caractéristiques du couple d'amorces choisi

Figure 15 : Paire d'amorces N° 2 (en bleu) encadrant une partie de la séquence de l'ARN du gène DRB3

Figure 16 : Représentation graphique des 10 paires d'amorces encadrant une partie du transcrit DR4

Figure17 : Les 10 paires d'amorces obtenues avec l'outil primer-blast, encadrant le transcrit du gène DR4

Figure 18 : caractéristiques du couple d'amorces choisi

Figure 19 : Paire d'amorces N° 8 (en bleu) encadrant la séquence de l'ARN du gène DRB4

Liste Des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique.
ARN	Acide ribonucléique
Chr	chromosome
CMH	complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'antigène
DID	diabète insulino-dépendant
DNNP	Diabète Néonatal Permanent.
DQA/B	holotypes Alpha/Béta
DT1	Diabète Type 1.
DT2	Diabète Type 2.
FID	Fédération International du Diabète
HLA	Humaine Leucocyte Antigène.
IDDM	Insulino-Dependent-Diabetes-Mellitus.
IGF2	Insulin-Like-Growth Factor 2.
INS	Insuline.
PB	paire de bases
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne.
RT-qPCR	Reverse Transcription quantification PCR.
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism.
Tf	température de fusion.
TH	Tyrosine Hydroxylase.

Introduction

Le diabète de type 1 (DT1) est caractérisé par une destruction auto-immune des cellules β du pancréas, c'est une maladie multifactorielle vu la coalition de facteurs génétique et environnementaux. C'est pour cela qu'aucun facteur étiologique n'a été clairement défini jusqu'à présent (Craighead et al. 1978).

Le diabète de type 1 représente 5 à 10% des cas de diabètes observés dans le monde, bien loin derrière le diabète de type 2 (OMS).

Le diabète est une cause majeure de cécité, d'insuffisance rénale, d'accidents cardiaques, d'accidents vasculaires cérébraux et d'amputation des membres inférieurs.

Le nombre des personnes atteintes de diabète est passé de 108 millions en 1980 à 422 millions en 2014(OMS)

La prévalence mondiale du diabète chez les adultes de plus de 18 ans est passée de 4,7% en 1980 à 8,5% en 2014.(OMS)

En ce qui concerne le système HLA 90 à 95% des sujets caucasiens qui développent un DT1 dès l'enfance ou l'adolescence sont porteur des allèles DR3 /DR4 (Deloor-Demay ; 2014). Les sujet hétérozygotes DR3/DR4 ont 50 fois plus de risques de développer un DT1 que la population générale (Deloor-Demay ; 2014)

La mise en évidence des génotypes des individus par rapport aux allèles DR3/DR4 se fait par la technique de polymérisation en chaîne (PCR). Une technique utilisée aussi bien en recherche que pour le diagnostic de certaines maladies, chaque fois qu'un acide nucléique doit être recherché ou analysé (salouatoudjani ; 2012).

Ainsi, cette technique est employée pour établir le diagnostic prénatal de maladies héréditaires, par l'étude du gène en cause dans les cellules du fœtus, ou dans le cadre des maladies infectieuses, pour la mise en évidence de germes présents en très faible quantité dans les prélèvements ou de ceux dont la culture est longue ou difficile.

La technique consiste à reproduire spécifiquement en grandes quantités un fragment d'ADN correspondant à un gène connu, puis à l'identifier grâce à une sonde spécifique capable de reconnaître le gène. Il s'agit de techniques de pointe couramment utilisées en recherche, dont les coûts diminuent régulièrement, et qui seront de plus en plus utilisées à l'avenir pour le diagnostic de certaines maladies (LAROUSSE Medicale). L'efficacité de cette technique repose sur le bon choix d'amorces conçues spécifiquement pour l'amplification d'une séquence en particulier.

Introduction

Déterminer le risque génétique est une condition fondamentale pour la mise en œuvre des essais de prévention primaire du diabète de type 1. En effet il a été trouvé dans des études précédentes que des sujets caucasiens hétérozygotes DR3/DR4 ont 50 fois plus de risques de développer un diabète par rapport à la population générale (Deloor-Demay, 2014).

Compte tenu des statistiques élevées du diabète de type 1 en Algérie et l'absence d'études d'associations génétiques chez cette même population le but de cette étude est de concevoir des amorces spécifiques encadrant les transcrits des gènes HLA DR3 et DR4 afin d'évaluer, par la suite, le risque conféré par ces allèles sur l'apparition du DT1 dans la population Algérienne au cours d'études ultérieures de type cas-témoins ou des études de familles.

1. Définition

Le diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1 (DT1) est une maladie chronique touchant l'enfant ou le jeune adulte, il résulte d'une destruction des cellules β des îlots de Langerhans, et aboutit à une insulite (KuKKo et al. 2003).

Ce processus débute plusieurs années avant le déclenchement de la maladie. Un des marqueurs de cette réaction auto-immune est la présence dans le sang d'anticorps dirigés contre les îlots de Langerhans, amas de cellules β (Bouhours et Coutant, 2011).

Ce dysfonctionnement n'est pas induit par la présence d'un gène pathologique. Ce qui est transmis d'une génération à l'autre, c'est une susceptibilité de développer la maladie, portée par plusieurs gènes. D'ailleurs, l'hérédité familiale reste faible dans le diabète de type 1, puisqu'on ne la retrouve qu'une fois sur dix chez un nouveau diabétique (Axel, 2002).

Actuellement, l'étiologie de la maladie reste inconnue. Cependant, des facteurs génétiques (gènes HLA / non HLA) et des facteurs environnementaux (agents infectieux) sont incriminés dans l'apparition du diabète de type 1 (Giannoukakis et Trucco, 2012)

L'incidence du DT1 dans différents groupes ethniques est extrêmement variable, suggérant l'implication aussi bien de déterminants génétiques que des éléments de l'environnement (Park et al. 2000).

Les études épidémiologiques montrent que l'incidence du DT1 est inégalement répartie dans la population mondiale, avec un taux d'incidence élevé chez les caucasiens (40/100000/an en Finlande) et un taux extrêmement faible chez les asiatiques et les populations sud-américaines (0.1/100000 par an) (Karvonen et al. 2000).

Le nombre des personnes atteintes de diabète est passé de 108 millions en 1980 à 422 millions en 2014. En 2011 environ 490 000 enfants de 0 à 14 ans sont atteints de DT1, avec une augmentation annuelle de l'incidence de 3 %, soit environ 78 000 nouveaux cas par an, mais avec de grandes différences selon les régions (IDF, 2011).

La prévalence mondiale du diabète chez les adultes de plus de 18 ans est passée de 4,7% en 1980 à 8,5% en 2011 (OMS).

Près de la moitié des décès dus à l'hyperglycémie surviennent avant l'âge de 70 ans. L'OMS prévoit qu'en 2030, le diabète sera la 7^e cause de décès dans le monde.

En 2015, on a estimé que 1,6 million de décès étaient directement dus au diabète et que 2,2 millions de décès supplémentaires devaient être attribués à l'hyperglycémie en 2012.

La prévalence du diabète a augmenté plus rapidement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire.

Le diabète est une cause majeure de cécité, d'insuffisance rénale, d'accidents cardiaques, d'accidents vasculaires cérébraux et d'amputation des membres inférieurs.

Un régime alimentaire sain, l'activité physique, des médicaments, un dépistage régulier et le traitement des complications permettent de traiter le diabète et d'éviter ou de retarder les conséquences qu'il peut avoir.

2. Classification étiologique du Diabète de type 1

2.1. Le diabète de type 1 auto-immun (type 1A)

La destruction de la cellule β est essentiellement due à une infiltration des îlots par des lymphocytes Thelper CD4 et des lymphocytes T cytotoxiques CD8 (Grimaldi, 2009).

La maladie peut se manifester quelques mois après le début de la destruction des îlots comme elle peut apparaître des années plus tard (Knip et al. 2005).

Au cours de cette réaction sont produits 4 types d'auto-anticorps : anticorps anti-cellules d'îlots, anti-insuline, anti-glutamate décarboxylase (GAD), anti-tyrosine phosphatase (IA-2) (Arvan et al., 2012). Tous dirigés contre certains antigènes pancréatiques.

Ces auto-anticorps sont des marqueurs fiables du déroulement du processus auto-immun pathologique (Knip, 2002). Ce dernier est fortement lié aux gènes du système HLA (DQA ; DQB) et influencé par les gènes HLA-DRB (Drouin et al. 1999).

2.2. Le diabète de type 1 idiopathique (type 1B)

C'est une forme de diabète assez rare à forte composante héréditaire touchant une minorité de personnes (sujets asiatiques et sujets noirs d'origine africaine) (Drouin et al., 1999).

Certains présentent une insulino-pénie permanente avec céto-acidose d'origine inconnue. Chez les africains, une forme voisine se caractérise par une céto-acidose révélatrice après laquelle l'insulinothérapie n'est pas indispensable (ADA, 2012).

Une thérapie de remplacement de l'insuline chez les patients touchés est recommandée (ADA, 2009).

3. Aspect génétique

Le risque de diabète chez le jumeau homozygote d'un patient diabétique de type 1 est d'environ 36% ; 4% pour la fratrie à l'âge de 20 ans et de 9,6% à l'âge 60 ans ; comparé à 0,5% pour la population générale et le risque est plus élevé chez les frères et sœurs si le diabète a été diagnostiqué à un plus jeune âge (Ghanem, 2013).

Le diabète de type 1 est 2 à 3 fois plus fréquent chez les enfants d'un père qui a un diabète de type 1 (3,6- 8,5%) que si c'est la mère (1,3-3,6%) ; la transmission se ferait préférentiellement d'un père à sa fille, et de façon plus prépondérante dans la tranche d'âge des 0-4 ans (Ghanem, 2013)

Le déterminisme de la maladie est polygénique.

Des études du génome ont permis de localiser des régions génétiques impliquées dans la susceptibilité au diabète de type 1 (Gorochov et Papo, 2000). En effet, l'existence d'un terrain génétique de susceptibilité au diabète de type 1 est démontrée (Deloor-Demay, 2014). L'étude de gènes candidats a été longtemps la principale méthode pour l'identification des gènes de susceptibilité au diabète de type 1, ce qui a permis la découverte des gènes HLA, INS, PTPN22, CTLA4 et IL2.

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

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

En revanche, les gènes candidats ont été choisis en fonction de leurs rôles connus ou putatifs dans la fonction immunitaire et auto-immunitaire où la fonction cellulaire des cellules β et les résultats d'association positive fourni une preuve directe du mécanisme de la maladie.

Par conséquent, l'examen des gènes candidats, avec la charge d'explorations antérieures de ces gènes, est apparue comme une source prometteuse pour identifier et/ou confirmer les gènes associés au DT1 ou de nouveaux SNP associés à des gènes connus, en utilisant la meilleure technologie disponible et la meilleure information génomique, ainsi que la grande taille des cohortes. (Pociot et al. 2010).

LOCUS	CHROMOSOME	Gène candidat ou Microsatellite
IDDM1	6p21	HLA-DQ\DR
IDDM2	11p15	Insulin VNTR
IDDM3	15q26	D15s107
IDDM4	11q13	MDU1, ZFM1, RT6, FADD/MORT1, LRP5
IDDM5	6q24-27	ESR, MnSOD
IDDM6	18q12-q21	D18s487, D18s64, JK (Kidd locus)
IDDM7	2q31	D2s152, IL-1, NEUROD, GALNT3
IDDM8	6q25-27	D6s264, D6s446, D6s281
IDDM9	3q21-25	D3s1303
IDDM10	10p11-q11	D10s193, D10s208, D10s588
IDDM11	14q24.3-q31	D14s67
IDDM12	2q33	CTLA-4, CD28
IDDM13	2q34	D2s137, D2s164, IGFBP2, IGFBP5
IDDM14	?	NCBI # 3413
IDDM15	6q21	D6s283, D6s434, D6s1580
IDDM16	?	NCBI # 3415
IDDM17	10q25	D10s1750-D10s1773

Tableau 1. Gènes de susceptibilité impliqués dans le déclenchement du diabète de type 1

Les études des gènes candidats susceptibles ont également identifié le gène de l'insuline sur le chromosome 11 comme facteur génétique de susceptibilité, contribuant à 10% de susceptibilité génétique au DT1, des formes plus courtes d'une (VNTR) dans le promoteur de l'insuline sont associées à la susceptibilité à la maladie, tandis que de plus longues formes sont associées à la protection (Pociot et al. 2010).

Le nombre variable des répétitions en tandem du VNTR à l'extrémité 5' du gène de l'insuline règle l'expression de l'insuline au niveau du thymus, Un polymorphisme dans l'extrémité 5' flanquant la région du gène de l'insuline (INS) sur le chromosome 11p15.5 a été considéré pendant deux décennies c'est le SNP -23 Hph1 (Pociot et al. 2010). Il se compose d'un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR), également dénommé un polymorphisme de minisatellite, situé dans la 365ème Pb en amont de l'INS, en dehors des séquences codantes

(Pociot et al. 2010). Il y'a répétition en tandem d'un oligonucléotide de 14 à 15 pb qui est lié à une séquence consensus ACAGGGGTGTGGGG (Pociot et al. 2010).

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

Pendant la dernière décennie, l'analyse du génome en entier a montré qu'il existe au moins 15 autres locus liés au DT1, dont 2 gènes intimement associés avec l'activation de cellule-T ont été identifiés récemment (Deloor-Demay, 2014).

La région génétique de plus forte susceptibilité (appelée IDDM1) est située sur le bras court du chromosome 6, dans le CMH qui comprend les gènes HLA. Elle intervient pour 40% de l'ensemble du risque génétique. La région promotrice du gène de l'insuline (IDDM2) contribue pour 10% à ce risque (Deloor-Demay, 2014).

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

3.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'homme est une région de quatre millions de nucléotides sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3) et comporte de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune (Al Youssef, 2006).

Cette région présente une forte densité de gènes, dont la caractéristique est le déséquilibre de liaison, les allèles de loci voisins étant transmis en haplotype (Al Youssef, 2006).

Elle se subdivise en 3 régions : Classe I, II et III sur la base de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles (Al Youssef, 2006).

Un grand nombre de gènes a été identifié dans la région de classe I qui permettent la synthèse de molécules antigéniques glycopeptidiques transmembranaires portées par toutes les cellules de l'organisme, elle comprend les loci HLA-A, B et C dits classiques. (Al Youssef, 2006).

Les gènes HLA-A, B et C sont constitués de 8 exons séparés par 7 introns. L'exon 1 code la séquence signal, les exons 2, 3 et 4 codent respectivement pour les domaines extracellulaires de la molécule HLA, α , C12 et C13, l'exon 5 code la partie transmembranaire de la molécule et les exons 6, 7 et 8 pour la partie intracytoplasmique (Al Youssef, 2006).

Les gènes de classe II, sont situés en position centromérique du chromosome 6 et forment une famille homogène plus restreinte (une quinzaine chez l'homme). Ces gènes codent les chaînes α et β des molécules HLA de classe II, les molécules TAP1 et TAP2, protéine transporteuse de peptides (Al Youssef, 2006) (figure 1). Ces gènes comprennent principalement trois familles de gènes : DR, DP et DQ qui codent pour 3 molécules portées par la membrane cellulaire des macrophages et lymphocytes T (Al Youssef, 2006).

La région de classe II contient 23 à 25 gènes ou pseudo-gènes. Les gènes DRA, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1 et DPB1 sont fonctionnels et produisent, selon les haplotypes les 3 ou 4 molécules de classe II (Al Youssef, 2006). Les autres gènes de classe II ne sont pas transcrits (DRB2, DPA2, DPB2, DQB3, DQA2, DQB2) (Al Youssef, 2006).

Les gènes de classe III : CMH III compte de nombreux gènes codant des produits diversifiés impliqués dans des phénomènes immunitaires notamment « facteurs de nécrose des tumeurs » TNF α et TNF β , les composants du complément, les transporteurs de peptides TAP1 et TAP2 (Al Youssef, 2006).

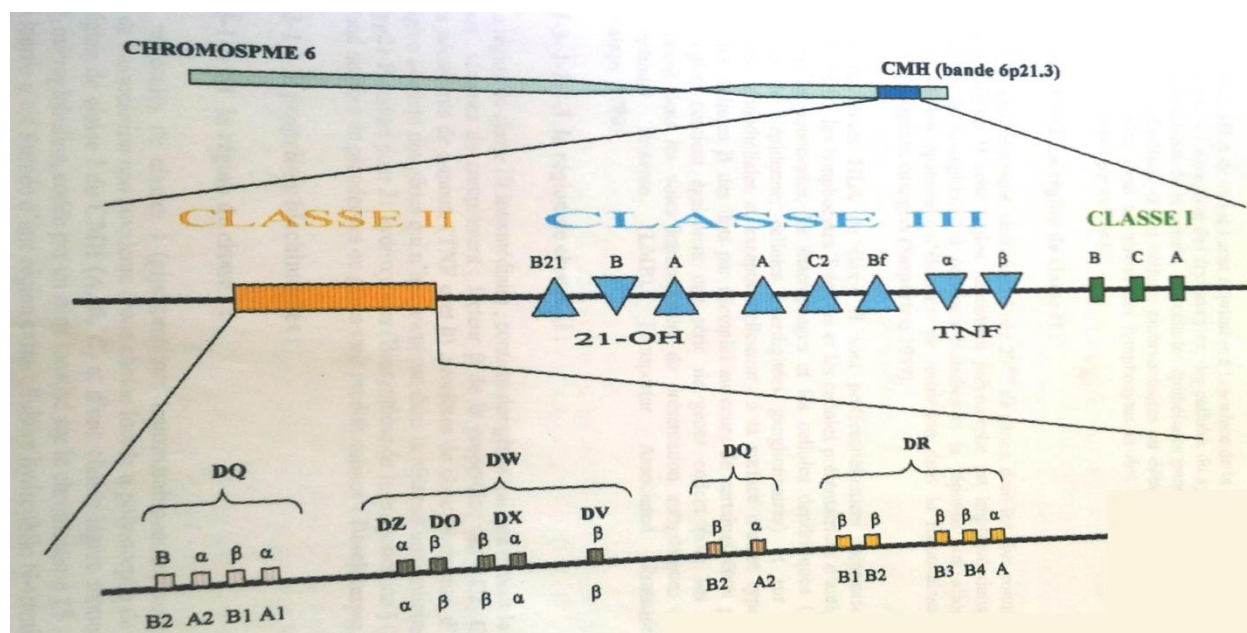


Figure 01 : carte simplifier de la région HLA

3.2. Association des allèles du CMH avec l'apparition du diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie complexe et multigénique. Les premiers rapports d'association génétique au DT1 étaient pour la région de l'antigène du leucocyte humain (HLA) (Singal et Blajchman 1973 , Cudworth et Woodrow 1974 , Nerup et al., 1974).

Après la découverte d'anticorps reconnaissant des spécificités de classe II a permis d'aborder le polymorphisme de classe II. Ainsi, les spécificités DR3 et DR4 ont été retrouvées considérablement augmentées chez les diabétiques insulino-dépendants par rapport aux témoins (90 % des diabétiques insulino-dépendants, 30 % des témoins) et, plus particulièrement, la combinaison hétérozygote DR3/DR4 témoignant d'un effet synergique des deux spécificités (FroguetPassa, 1991).

Dans les quatre décennies écoulées depuis cette découverte, les chercheurs ont recherché non seulement pour déterminer quels allèles dont les gènes codant HLA sont responsables de l'association DT1, mais aussi pour lesquels d'autres loci génétiques, en plus de HLA, contribuent au risque DT1(Bluestone et al. 2010 ; Pociot et al., 2010 ; Steck and Rewers 2011).

La plus grande de ces études, terminée en 2010, était le Consortium de génétique du diabète de type 1 (T1DGC) (Rich et al. 2006).

Le T1DGC est une collaboration internationale, conçue pour créer un dépôt de taille et de diversité suffisante pour identifier tous les loci génétiques qui contribuent au risque T1D, grâce à quoi plus de 14 000 échantillons ont été collectés et génotypés. De tous les gènes et régions génétiques associés à DT1 révélés par toutes les études, cependant, l'association HLA demeure la plus forte de loin, les rapports de probabilité rapportés (OR) allant de 0,02 à 11 pour les haplotypes DR-DQ spécifiques (Erlich et al. 2008).

Synthèse bibliographique

Le risque global pour les diabétiques de type 1 associé à la molécule HLA DR et DQ (IDDM1) est déterminé par des combinaisons des allèles polymorphes. Des études fonctionnelles indiquent que cette susceptibilité, est liée au HLA DR-DQ protecteur et présente des peptides non –recouvrant (Knerr et al. 2005).

L'homozygotie pour l'allèle de la classe I confère un risque relatif de 2-3 contre la présence d'au moins un allèle de classe III. Inversement, les allèles de classe III, moins fréquents ont un effet protecteur dominant (Knerr et al. 2005).

En ce qui concerne le système HLA, 90 à 95% des sujets caucasiens qui développent un diabète de type 1 dès l'enfance ou l'adolescence sont porteurs des allèles DR3 et/ou DR4, DQB1 * 0302 (Deloor-Demay, 2014). Les sujets hétérozygotes DR3/DR4 ont 50 fois plus de risques de développer un diabète que la population générale (Deloor-Demay, 2014).

Il y a un risque relatif de 3 à 5, lorsqu'il existe un allèle HLA DR3 ou DR4. Le risque relatif atteint 20 à 40 lorsque les deux allèles DR3 et DR4 sont associés (Ghenem, 2013).

Ainsi, le risque pour des frères et sœurs d'un enfant diabétique peut être précisé en fonction de l'identité HLA avec l'enfant atteint. Le risque est de 15 % lorsque les frères ou sœurs présentent les deux haplotypes HLA en commun avec l'enfant diabétique (Ghenem, 2013). Il n'est que de 7 % lorsqu'ils n'ont qu'un seul haplotype en commun et il est inférieur à 1 % lorsque les deux haplotypes sont différents.

D'autres allèles comme DR15 (ancien DR2) et DQB1 *0602 semblent au contraire "protecteurs" vis-à-vis du diabète de type 1 (Gorochov et Papo, 2000).

Les hétérozygotes DR3/DR4 ont un risque accru de diabète témoignant d'un effet synergique des deux haplotypes. Ces associations caractérisent les Caucasiens et ne sont pas retrouvées chez les Noirs dont la susceptibilité au diabète de type 1 est associée à DR7 et DR9 (Al Youssef, 2006), ni chez les japonais (DR4 et DR9) (Al Youssef, 2006). Considérons les différents loci présents sur le même haplotype, il apparaît que DQ (en fort déséquilibre de liaison avec DR) soit plus particulièrement impliqué.

L'analyse de la structure des molécules par cristallographie démontre que les allèles du HLA-DQ8 confèrent une susceptibilité à la maladie par la nature de l'acide aminé en position 57 (Croxford *et al.*, 2006).

Ainsi, dans la population caucasienne, cet acide aminé en position 57 est une asparagine qui interagit avec une arginine de la chaîne α favorisant une stabilité de la molécule du CMHII (Croxford *et al.*, 2006).

Chez les patients diabétiques, l'acide aminé en position 57 est soit une valine, sérine ou alanine qui n'interagissent pas avec l'arginine de la chaîne α par conséquent la molécule du CMHII est instable et pourrait ainsi lors de la sélection thymique entraîner un moins bonne déletion des lymphocytes T auto-réactifs (Croxford *et al.*, 2006).

4. Elaboration des amorces

4.1. La PCR (réaction de polymérisation en chaîne)

Le concept technologique de la réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction ou PCR), découvert par Kary Mullis en 1983 (Mullis *et al.* 1987) et qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993, est aujourd'hui devenu un outil quasiment universel dans le domaine de la biologie.

La PCR est une méthodologie hautement sensible et spécifique pour la détection des acides nucléiques. Son usage s'est considérablement étendu à de nombreuses applications, dont l'analyse quantitative d'acides nucléiques spécifiques (ADN et ADNc) dans un échantillon donné.

Les techniques PCR sont devenues essentielles pour beaucoup de procédures communes, telles que le clonage de fragments d'ADN spécifiques, la détection et l'identification de gènes à des fins de diagnostic et en médecine légale ainsi que dans la recherche sur les modes d'expression génique (M Somma, M Querci - Module, 2004)

Plus récemment, la PCR a permis l'exploration de nouveaux domaines, tels que le contrôle de l'authenticité de denrées alimentaires, la présence d'ADN génétiquement modifié et la contamination microbiologique (M Somma, M Querci - Module, 2004)

4.1.1. Principe de la PCR

La PCR est basée sur le mécanisme de la répllication de l'ADN *in vivo*: l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et «ré enroulé». Cette technique comprend les cycles répétitifs (figure 3) suivants:

- dénaturation de l'ADN par fusion à haute température (90°C pendant 30 secondes à une minute) pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire;
- hybridation à l'ADN cible de deux oligonucléotides utilisés comme amorces (50°C pendant 30 secondes à une minute) ;
- extension de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides (dNTPs) à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions Mg^{2+} (72°C pendant 30 secondes à 2 minutes).

Les oligonucléotides consistent généralement en séquences relativement courtes qui sont différentes les unes des autres et complémentaires des sites de reconnaissance flanquant le segment d'ADN cible à amplifier. Les étapes de dénaturation de la matrice, d'hybridation des amorces et d'extension des amorces constituent un « cycle » dans la méthode de réaction de polymérisation en chaîne. La figure 3 illustre les trois étapes principales du processus d'amplification PCR.

Figure 3. Les étapes de l'amplification PCR (image: Andy Vierstraete, 1999)

4.1.2. Les acteurs de la PCR

L'ADN : Généralement sous forme de double-brin, contient le fragment à amplifier.

Deux amorces, sens et anti-sens : Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

Une enzyme: La Taq Polymerase (Taq POL), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermusaquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

Les Nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs

(DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

4.1.3. Instrumentation et composants pour la PCR

Deux progrès majeurs ont permis d'automatiser le processus de la PCR:

a. L'utilisation d'ADN polymérases thermostables, qui résistent à l'inactivation aux hautes températures. Ainsi, une partie aliquote initiale de polymérase peut durer pendant un grand nombre de cycles du protocole.

b. Le développement des bains de température, qui peuvent augmenter et abaisser rapidement leur température de manière automatisée et programmée. On les appelle des thermocycleurs ou machines PCR.

Plusieurs types de dispositifs de variation de la température sont utilisés. Par exemple : chauffage et refroidissement par des fluides, chauffage par résistance électrique et refroidissement par un fluide, chauffage par résistance électrique et refroidissement par semi-conducteurs.

4.1.4. RT-PCR

Les premières approches de quantification de gènes par PCR ou de transcrits géniques par rétro transcription PCR (RT-PCR) ont reposé sur une analyse de titration faisant appel à l'utilisation d'une solution titrée d'acide nucléique (ou standard externe) servant à l'élaboration d'une gamme d'étalonnage obtenue par dilutions en série du standard externe (Noonan *et al.* 1990). Le résultat de l'analyse donne une évaluation de la quantité relative de matrice cible par rapport au standard.

Cependant, la précision des résultats obtenus est très souvent limitée, du fait de la grande variabilité d'efficacité d'une PCR à l'autre. L'introduction d'un standard interne coamplifié au cours de la même réaction PCR a permis de corriger en partie la variabilité tube à tube et a conduit au développement de deux méthodologies différentes de quantification : celles par PCR différentielle et celles par PCR compétitive.

Dans les approches de quantification par PCR (ou RT-PCR) différentielle (Frye *et al.* 1989), une séquence endogène, c'est-à-dire appartenant à un gène dit de référence présent dans l'échantillon testé (séquence endogène d'un gène présent à l'état d'une seule copie par génome haploïde ou transcrit d'un gène domestique dont la transcription est constante et indépendante de l'environnement extracellulaire), sert de standard interne. La séquence endogène standard est coamplifiée avec la séquence cible au cours d'une même réaction PCR utilisant deux couples d'amorces spécifiques (Frye *et al.* 1989).

La méthode permet d'évaluer la quantité relative du gène cible par rapport au gène de référence, ce dernier permettant de normaliser la quantité et la qualité d'acide nucléique extrait (Frye *et al.* 1989).

Néanmoins, la quantification à l'aide d'un gène endogène comme standard interne nécessite des conditions d'application extrêmement normalisées afin de s'assurer que l'amplification des deux séquences différentes (gène cible et gène de référence) s'effectue avec des efficacités identiques.

Les approches de quantification par PCR (ou par RT-PCR) compétitive utilisent une séquence exogène comme standard interne (Siebert *et al.* 1992). Ce type d'approche repose sur une coamplification compétitive de la séquence cible avec des quantités connues de standard interne et en présence du même couple d'amorces. Le standard interne (ou compétiteur) est une séquence exogène d'ADN ou d'ARN synthétique que l'on construit de façon à être la plus proche possible de la séquence cible à quantifier, qui doit partager les mêmes sites d'amorçage que la séquence cible, qui doit être amplifié avec une efficacité d'amplification équivalente à celle de la séquence cible et dont le produit d'amplification doit cependant pouvoir en être différencié (Zimmermann *et al.*, 1996).

La quantification s'effectue par comparaison du signal PCR correspondant au gène cible avec ceux qui sont obtenus pour chaque concentration du gène compétiteur. Cependant, le choix du compétiteur et la validation des efficacités d'amplification sont difficiles à établir et relativement laborieux. L'autre limite des techniques de PCR compétitive est la nécessité de coamplifier par échantillon, au moins 4 ou 5 dilutions du standard interne pour couvrir le domaine des concentrations attendues en gène cible (Higuchi *et al.* 1993).

Le nombre élevé de stratégies de quantification proposées dans la littérature reflète bien la difficulté à obtenir des résultats fiables et reproductibles. L'introduction d'une molécule reportée fluorescente dans le milieu réactionnel de PCR et la détection des produits de PCR par une méthode fluorimétrique a conduit au développement récent des techniques de PCR quantitative en temps réel (Higuchi *et al.* 1993).

Ces dernières reposent, non plus sur une détection en point final des produits de PCR formés, mais sur une analyse de la cinétique de la réaction PCR au moyen d'un système capable de détecter « en tube fermé » les produits de PCR formés après chaque cycle d'amplification (Higuchi *et al.* 1993).

4.1.5. Nature exponentielle de la réaction PCR

La PCR est par définition une réaction en chaîne au cours de laquelle les produits issus d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Ainsi, la réaction en chaîne qui s'établit par la répétition des cycles de dénaturation-hybridation-élongation aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADN. Autrement dit, la quantité de produits de PCR double à chaque cycle d'amplification suivant la relation mathématique suivante : $N = N_0 \cdot 2^n$ (où : N est le nombre de molécules amplifiées au final, N_0 le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification). (C. Tse, J. Capeau ; 2003)

4.2. Les amorces

4.2.1 Définition des amorces

Les amorces sont de courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire, utilisées lors des Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour borner l'amplicon. Elles doivent être spécifiques de la séquence à amplifier, stables et compatibles entre elles.

4.2.2. Conception des amorces pour la PCR

La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. En effet, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR

La séquence d'amorce détermine plusieurs choses, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Innis et Gelfand, 1994).

Une amorce mal conçue peut conduire à une production faible, voire nulle, en raison d'une amplification non spécifique et/ou à la formation de dimères d'amorce, qui peuvent devenir suffisamment compétitifs pour inhiber la formation du produit d'amplification (Dieffenbach *et al.* 1995).

4.2.3. Sélection des amorces

Plusieurs variables doivent être prises en considération lors de la conception des amorces pour la PCR. En voici quelques-unes des plus importantes:

- longueur de l'amorce,
- température de fusion (T_f),
- spécificité,
- séquences d'amorce non complémentaires,
- teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G),
- séquence à l'extrémité 3'.

La longueur : la spécificité, la température et le temps d'hybridation dépendent en partie de la longueur de l'amorce, ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR. En général, les oligonucléotides ayant une longueur entre 18 et 24 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence, à condition que la température d'hybridation soit optimale. La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation.

En général, plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace. Le nombre de matrices amorcées diminuant à chaque étape, cela peut aboutir à une diminution sensible du produit amplifié (Sharrocks, 1994).

La Température de fusion (Tf) : Il est important de se rappeler que deux amorces sont ajoutées à une PCR dirigée sur un site ou une cible. Les deux amorces d'oligonucléotides doivent être conçues de sorte qu'elles aient des températures de fusion semblables. Si les amorces ne concordent pas en termes de Tf, l'amplification sera moins efficace ou peut ne pas fonctionner du tout, car l'amorce avec la Tf la plus élevée va mésamorcer aux basses températures et l'amorce avec la Tf plus basse peut ne pas fonctionner aux hautes températures.

Le plus simple est d'utiliser les logiciels de conception d'amorces déjà disponibles sur le marché (Sharrocks, 1994).

La Spécificité : La spécificité de l'amorce dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce. Il est évident qu'il y a beaucoup plus d'oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases.

Ceci dit, les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié. Une amorce conçue avec une séquence hautement répétitive conduira à une traînée lors de l'amplification d'ADN génomique.

Toutefois, la même amorce peut donner une bande unique si un clone unique d'une bibliothèque génomique est amplifié. Comme l'ADN polymérase Taq est active dans une large gamme de températures, l'extension de l'amorce se produira aux basses températures d'hybridation. Si la température est trop basse, un amorçage non spécifique peut se produire, qui peut être étendu par la polymérase s'il y a une homologie courte à l'extrémité 3'. En général, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats.

Séquences d'amorce non complémentaires : Les amorces doivent être conçues absolument sans aucune homologie intra-amorce au-delà de 3 paires de bases. Si une amorce possède une telle région d'auto homologie, des structures partiellement doubles brin en «épingles à cheveux» peuvent se former, qui perturberont l'hybridation avec la matrice. Un autre risque connexe est l'homologie inter-amorce. L'homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces peut interférer avec l'hybridation. Si l'homologie se situe à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre amorce, la formation de dimères d'amorce se produira, ce qui, par compétition, empêchera le plus souvent la formation du produit désiré.

Teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G)

Les amorces devraient être composées à 45-55 % de GC. La séquence d'amorce doit être choisie de telle sorte qu'il n'y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique. Les suites poly-A et poly-T doivent également être évitées, car

elles «respireront» et ouvriront des parties du complexe amorce-matrice. Cela peut réduire l'efficacité de l'amplification.

Les suites polypyrimidine (T, C) et polypurine (A, G) devraient également être évitées. Idéalement, l'amorce présentera un mélange presque aléatoire de nucléotides, une teneur de 50 % en GC et une longueur d'environ 20 bases. La T_f se situera alors entre 56 et 62 °C (Dieffenbachet *al.* 1995).

Séquence à l'extrémité 3' Il est établi que la position terminale 3' dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le mésamorçage. Le problème des homologies d'amorce se produisant dans ces régions a déjà été examiné. Une autre variable à considérer est l'inclusion d'un résidu G ou C à l'extrémité 3' des amorces. Ce « crampon GC » contribue à la fixation correcte à l'extrémité 3' en raison de la liaison hydrogène plus forte des résidus G/C. Cela contribue également à une plus grande efficacité de la réaction en réduisant au minimum la «respiration» qui pourrait se produire.

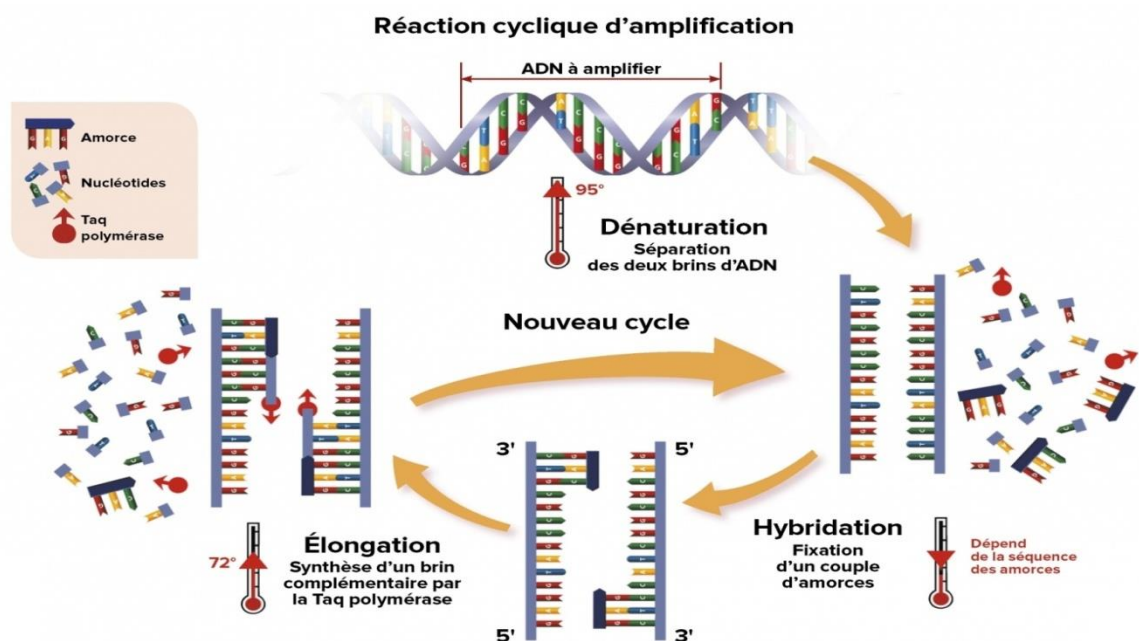


Figure2. Les étapes de l'amplification PCR

1. La Séquence du gène DR3

La molécule HLA-DRB3 appartient aux paralogues de la chaîne bêta HLA classe II. Cette molécule de classe II est un hétérodimère constitué d'une chaîne alpha (DRA) et bêta (DRB), ancrée dans la membrane. [Fourni par RefSeq, juillet 2008].

Il joue un rôle central dans le système immunitaire en présentant des peptides dérivés de protéines extracellulaires. Les molécules de classe II sont exprimées dans les cellules présentatrices d'antigène (APC: lymphocytes B, cellules dendritiques, macrophages). La chaîne bêta est d'environ 26-28 kDa et son gène contient 6 exons : l'exon 1 code pour le peptide leader, les exons 2 et 3 encodent les deux domaines extracellulaires, l'exon 4 code pour le domaine transmembranaire et l'exon 5 code pour la queue cytoplasmique.

Dans la molécule DR, la chaîne bêta contient tous les polymorphismes spécifiant les spécificités de liaison aux peptides. Le typage de ces polymorphismes est systématiquement fait pour la transplantation de moelle osseuse et de rein. DRB1 est exprimé à un niveau cinq fois plus élevé que ses paralogues DRB3, DRB4 et DRB5. La présence de DRB3 est liée à des variantes alléliques de DRB1, sinon elle est omise. Il existe 4 pseudogènes apparentés : DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 et DRB9. [Fourni par RefSeq, juillet 2008].

Afin de génotyper les sujets diabétique et les témoins pour l'expression de l'allèle DR3, il faut détecter l'ARN messager (ARNm) transcrit à partir du gène DR3. Et pour détecter des variants de séquence dans le transcrit. Pour cela les amorces encadrant l'ARNm du gène DR3 sont conçues au cours de cette étude.

La séquence du transcrit DR3 a été obtenu grâce à la base de donnée Ensembl (figure 4) en inscrivant le nom du gène et spécifié l'espèce humaine.



Figure 3 : Plateforme de la base de données Ensembl.

La plateforme de la base de données montre où la séquence complète du gène peut être trouvée sous le code ENSG0000023043 (figure 4 et 5).

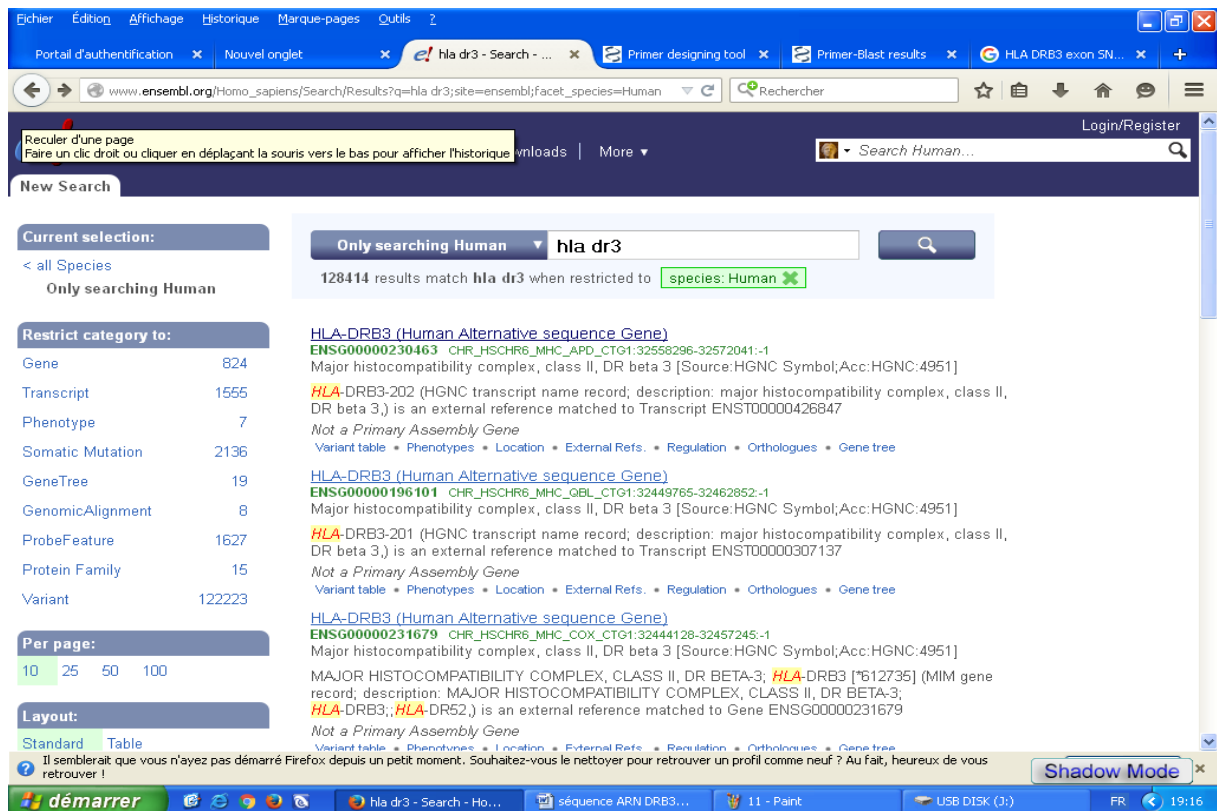


Figure 4 : Introduction du gène DR3 dans la base de données ENSEMBL

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene HLA-DRB3. The main content area displays the following information:

- Gene: HLA-DRB3** ENSG00000230463
- Description:** major histocompatibility complex, class II, DR beta 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4951]
- Synonyms:** HLA-DR3B
- Location:** Chromosome CHR_HSCHR6_MHC_APD_CTG1: 32,558,296-32,572,041 reverse strand. GRCh38: GL000250.2
- About this gene:** This gene has 1 transcript (splice variant), 1 gene allele and is a member of 1 Ensembl protein family.
- Transcripts:** [Show transcript table]
- Summary:**
 - Name:** HLA-DRB3 (HGNC Symbol)
 - Ensembl version:** ENSG00000230463.2
 - Other assemblies:** This gene maps to 32,470,408-32,484,153 in GRCh37 coordinates. View this locus in the GRCh37 archive: ENSG00000230463 ENSG00000206241
 - Gene type:** Protein coding
 - Annotation method:** Annotation for this gene includes both automatic annotation from Ensembl and Havana manual curation, see article.

The left sidebar shows a tree view of navigation options under 'Gene-based displays', including Summary, Splice variants, Transcript comparison, Gene alleles, Sequence, Secondary Structure, Comparative Genomics, Genomic alignments, Gene tree, Gene gain/loss tree, Orthologues, Paralogues, Ensembl protein families, Ontologies, Phenotypes, Genetic Variation, Variant table, Variant image, Structural variants, Gene expression, Regulation, External references, Supporting evidence, ID History, and Gene history.

Figure 5 : code donnée pour le gène HLA.DRB3

La séquence du transcrit d'HLA. DRB3 est ensuite copiée dans un document word afin de faciliter son utilisation.

2. Séquence du gène DR4 :

La molécule HLA-DRB4 appartient également aux paralogues de la chaîne bêta HLA classe II. La présence de DRB4 est liée à des variantes alléliques de DRB1, sinon elle est omise. Il existe 4 pseudogenes apparentés : DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 et DRB9. [Fourni par RefSeq, juillet 2008].

Les mêmes étapes pour retrouver la séquence du transcrit du gène DR3 ont été reprises pour extraire la séquence du transcrit du gène DR4 à partir de la base de donnée Ensembl.

3. L'outil Primer-Blast

L'outil Primer-Blast est le logiciel qui nous permet une conception d'amorces les plus spécifiques de la séquence que l'on veut amplifier. Ce Logiciel (Primer3) (Ye et al., 2012) est retrouvé en ligne en libre-service, dans la banque de données du National Center for Biotechnology Information (ncbi) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Les figures suivantes représentent les étapes à suivre dans l'utilisation de cet outil

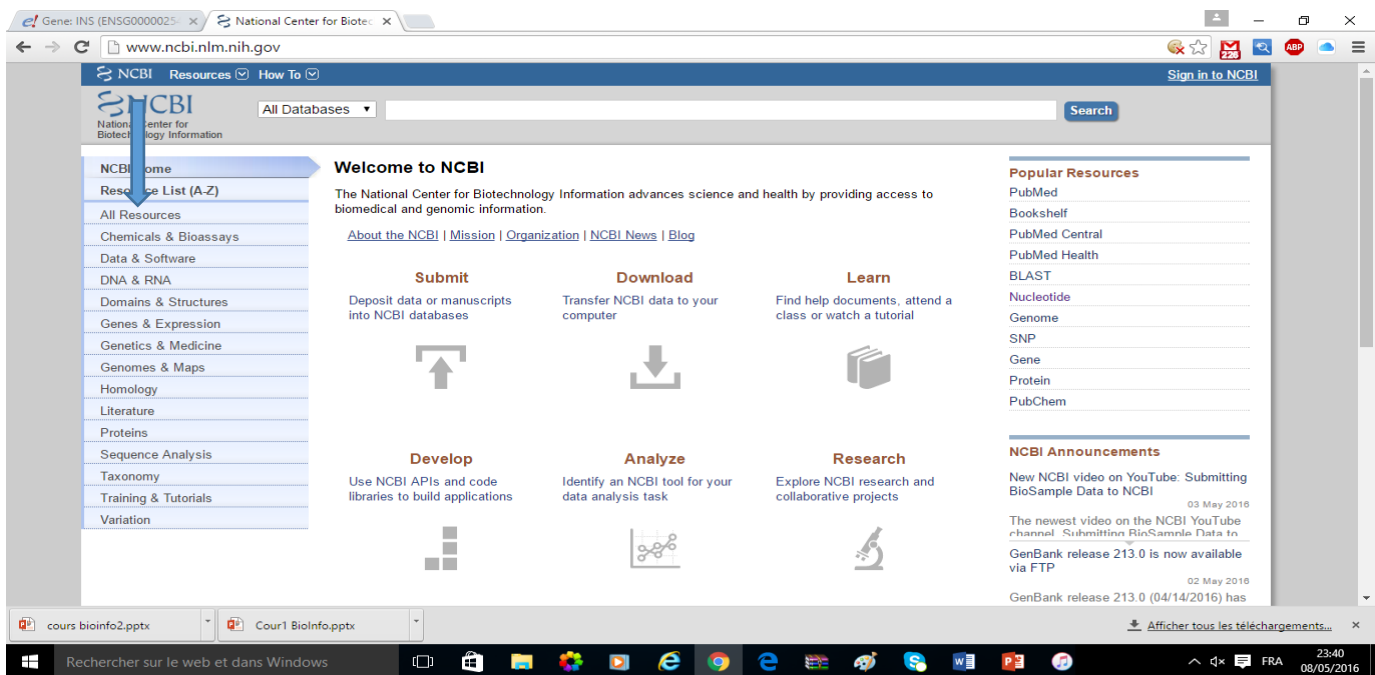


Figure 6 : Plateforme de la banque de donnée du NCBI

Le logiciel Primer-Blast est retrouvé dans les outils de la banque de donnée NCBI. Il présente une interface facile à utiliser (figure 7).

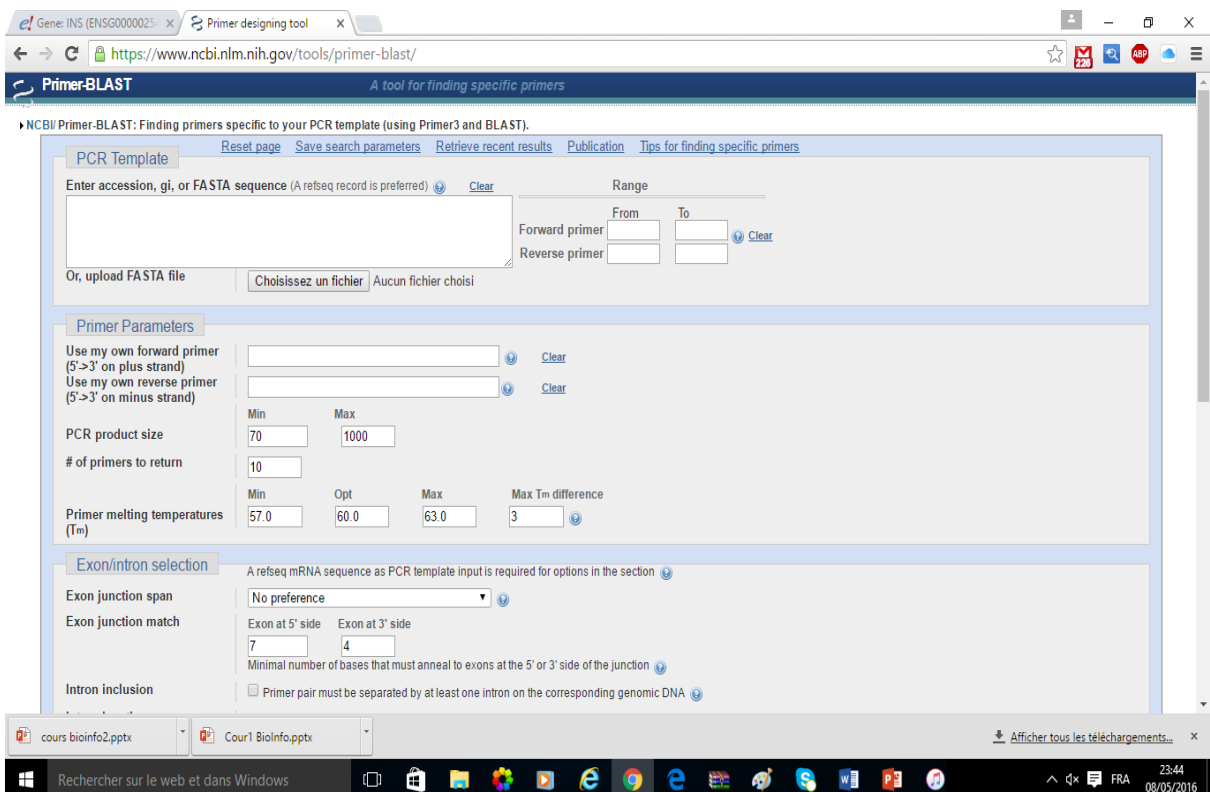


Figure 7 : Interface du logiciel Primer-Blast

3. Analyse des Résultats du Primer Blast :

Le couple d'amorces choisi doit répondre aux critères suivant :

- Choisir le couple d'amorces qui donne le moins de produits aspécifiques, afin d'amplifier que le produit étudié
- Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être les plus proches possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR est programmée en une seule température.
- La teneur en GC doit être proche de 40%
- Ignorer les produits aspécifiques de plus de 1000 pb, car lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence de plus de 1kb

1. La Séquence du transcrit DR3

Les résultats de la recherche de la séquence du transcrit, ou ADN complémentaire (ADNc) du gène DR3 ont été obtenus grâce à la base de donnée Ensembl. Ce transcrit est enregistré sous le code ENST0000042847.2 (figure 8).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the transcript HLA-DRB3-202 (ENST0000042847.2). The main content area displays the following information:

- Transcript:** HLA-DRB3-202 ENST0000042847.2
- Description:** major histocompatibility complex, class II, DR beta 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4951]
- Synonyms:** HLA-DR3B
- Location:** Chromosome CHR_HSCHR6_MHC_APD_CTG1: 32,558,296-32,572,041 reverse strand.
- About this transcript:** This transcript has 6 exons, is annotated with 14 domains and features, is associated with 356 variations and maps to 997 oligo probes.
- Gene:** This transcript is a product of gene ENSG00000230463. [Show transcript table]

The cDNA sequence section includes a "Download sequence" button and a "BLAST this sequence" button. Below the sequence, there are sections for "Codons" (Alternating codons) and "Exons" (Alternating exons). The "Variants" section lists several types of mutations: 5 prime UTR, Frameshift, Inframe deletion, Inframe insertion, Missense, Protein altering variant, Splice, Stop gained, and Synonymous.

Figure 8 : le code du transcrit du gène HLA.DRB3 dans la base de données Ensembl.

La séquence nucléotidique, avec les différents variant (SNP, Single Nucléotide Polymorphism), ainsi que la séquence en acides aminés sont représentés dans la figure 9.

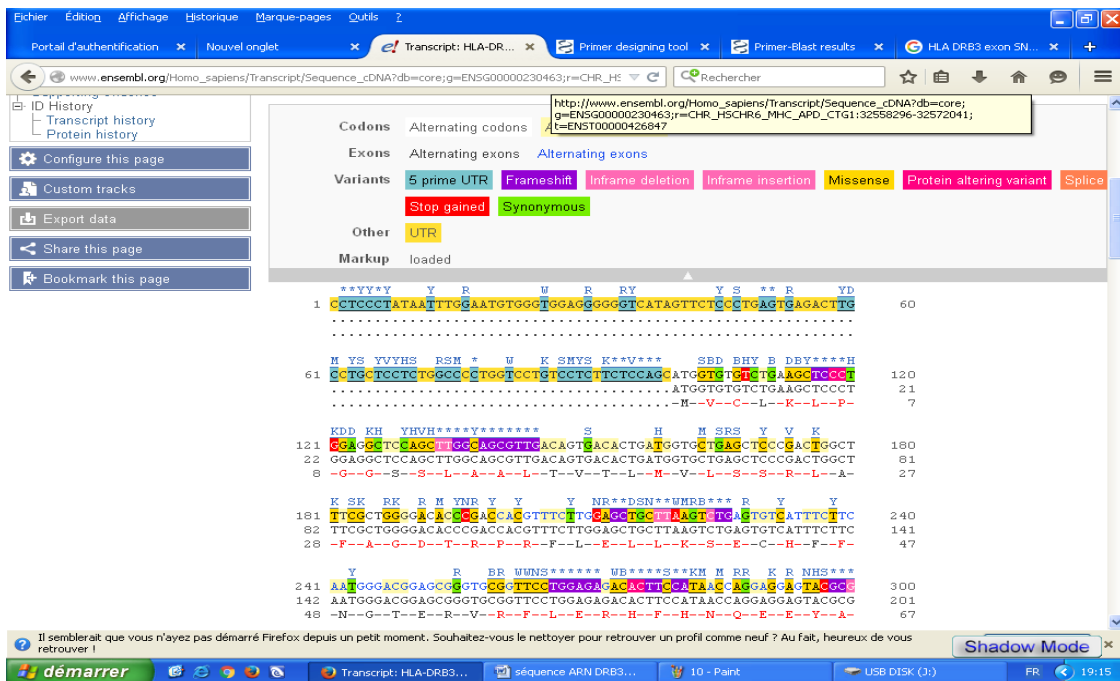


Figure 9 : séquence du transcrit du gène HLA.DRB3 depuis la base de données Ensembl.

Seulement la séquence nucléotidique a été copiée dans un document Word afin de l'utiliser dans le logiciel Primer-Blast.

2. La Séquence du transcrit DR4

Les résultats de la recherche de la séquence du transcrit, ou ADN complémentaire (ADNc) du gène DR4 ont été obtenus grâce à la base de donnée Ensembl. Ce transcrit est enregistré sous le code ENST00000411959.6 (figure 10).

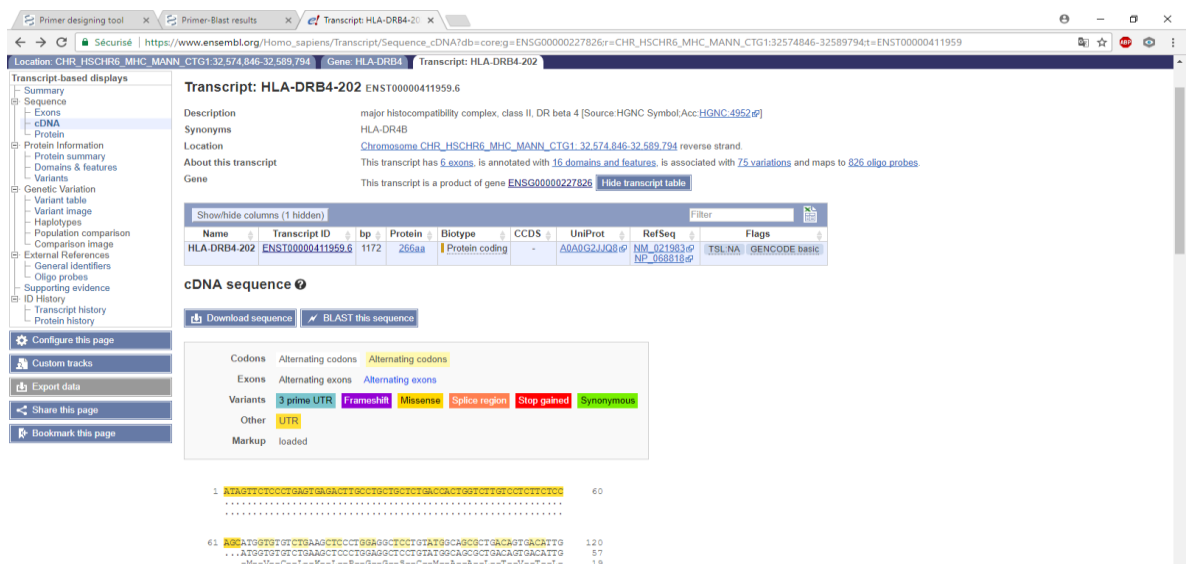


Figure 10 : code du transcrit du gène HLA.DRB4 dans la base de données Ensembl.

La séquence nucléotidique, avec les différents variants (SNP, Single Nucléotide Polymorphism), ainsi que la séquence en acides aminés sont représentés dans la figure 11.

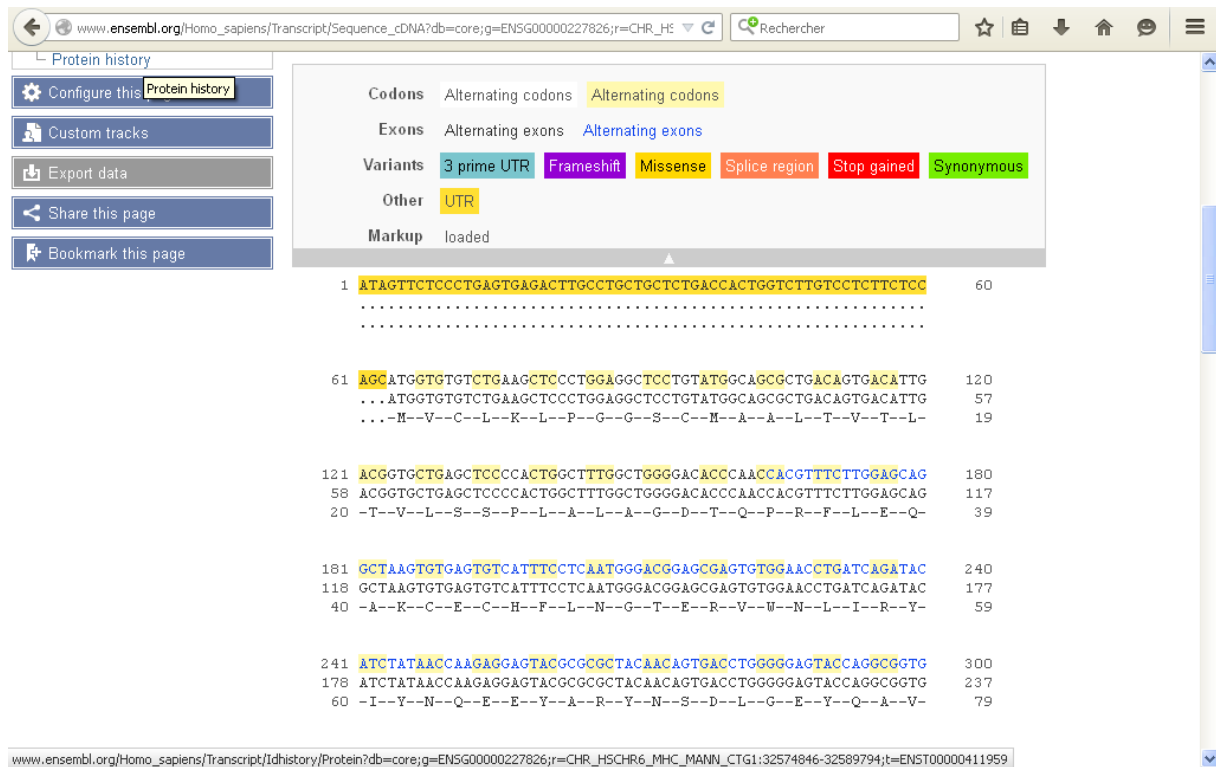


Figure 11 : séquence du transcrit du gène HLA.DRB4 depuis la base de données Ensembl.

Seulement la séquence nucléotidique a été copiée dans un document Word afin de l'utiliser dans le logiciel Primer-Blast.

3. Résultats de la conception des amorces

3.1. Les amorces encadrant le transcrit du gène DRB3

Dans un premier temps les couples d'amorces donnés par l'outil Primer-blast, n'amplifierais pas que la région voulu du transcrit. En effet chaque couple d'amorces amplifierait en plus, du transcrit du gène DR3, un produit aspécifique de moins de 900 Paires de bases (Pb) d'un autre transcrit, donc ce résultat n'est pas pris en compte.

Nous avons travaillé ensuite avec la seconde partie du transcrit du gène DR3 et six couples d'amorces hautement spécifiques ont été obtenus. Les résultats sont représentés dans les figures ci-dessous (figure 12 et 13).

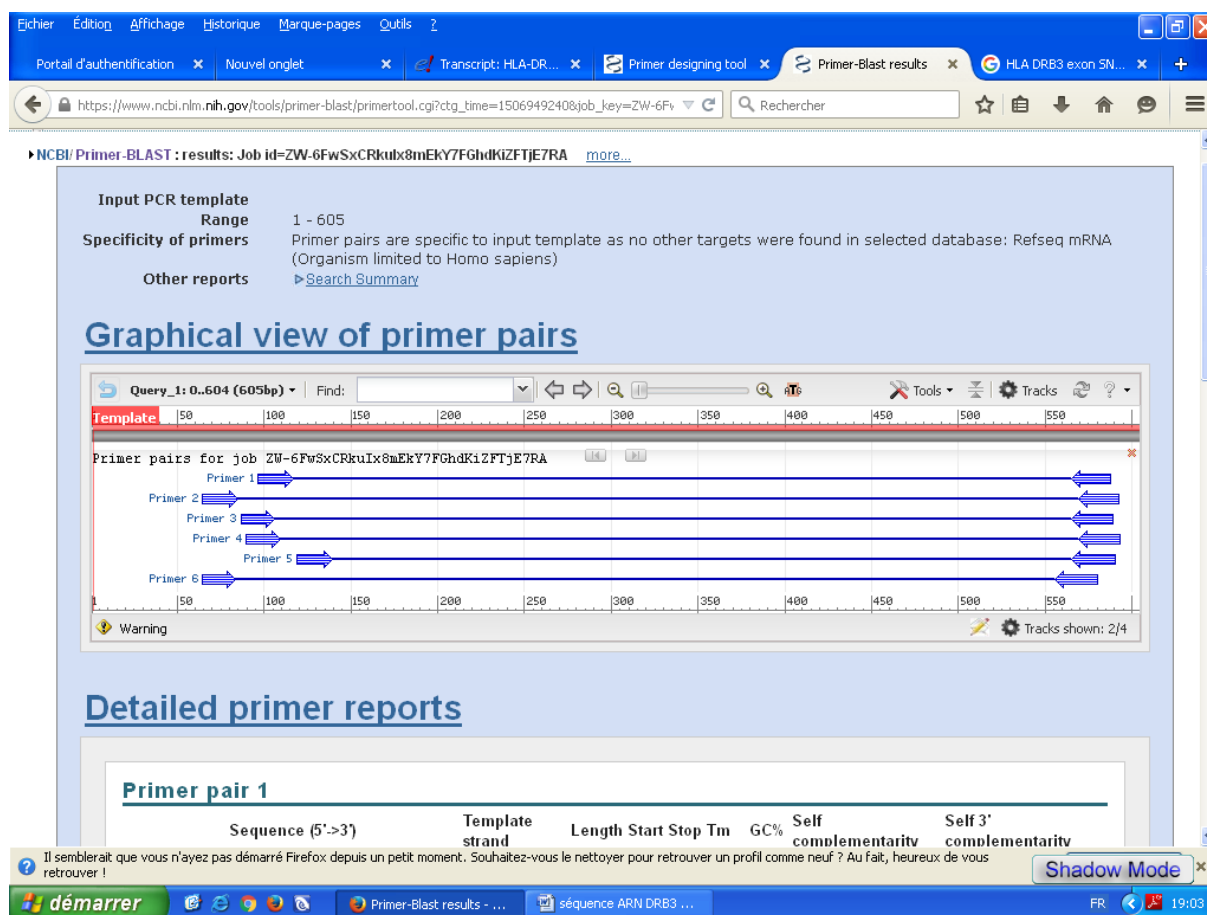


Figure12 : Représentation graphique des 6 paires d’amorces encadrant une partie du transcrit DR3

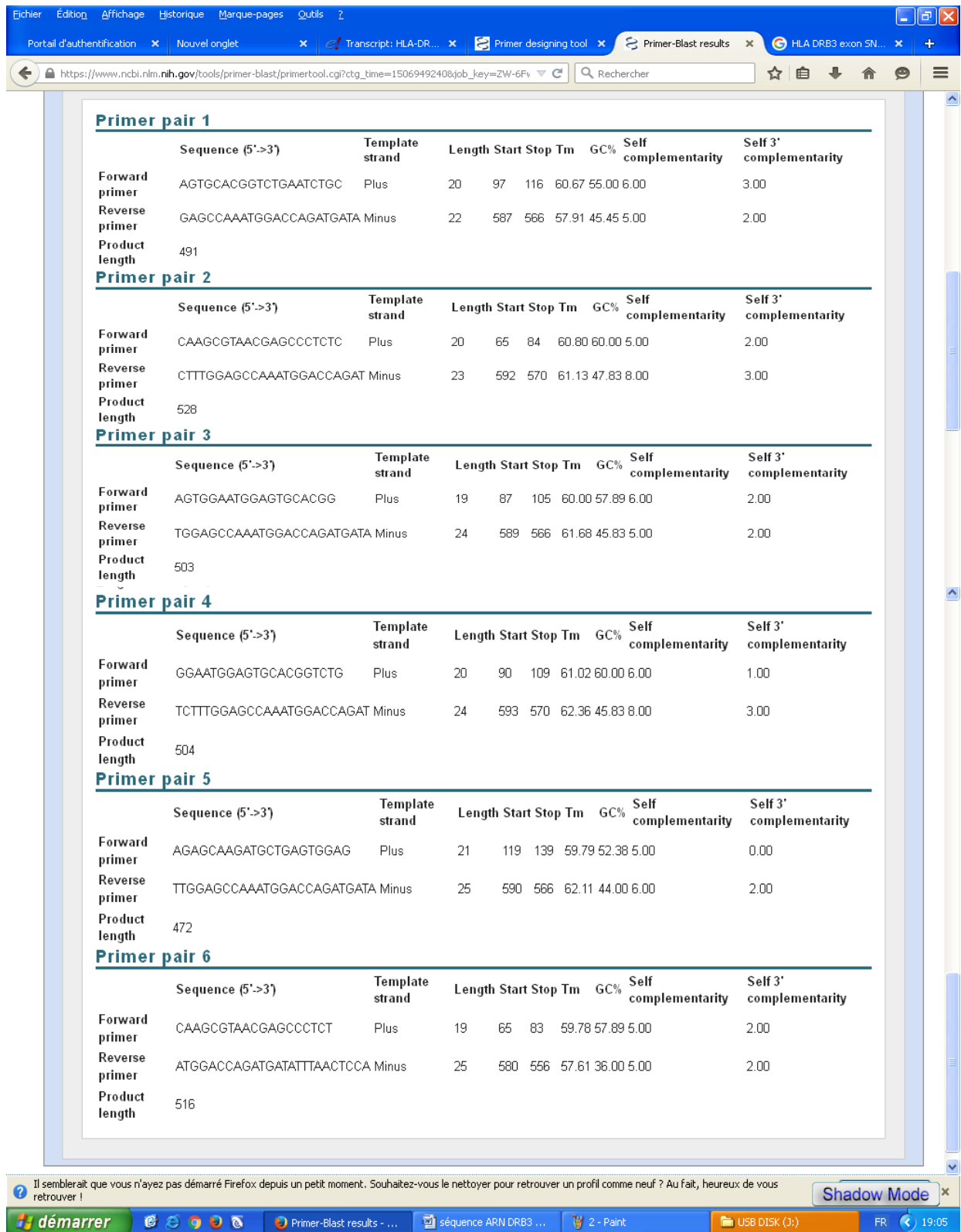


Figure 13 : Les 6 paires d’amorces obtenues avec l’outil primer-blast, encadrant une partie du transcrit du gène DR3

Le logiciel Primer-Blast présente les résultats pour chaque paire d'amorces sous forme d'un tableau incluant les longueurs d'amorces respectives, leur température de fusion (T_m), leur pourcentage en GC et la longueur du produit amplifié (Figure 13).

Toutes les paires d'amorces obtenus sont spécifiques de la séquence du transcrit du gène DR3 et amplifierait des séquences de taille allant de 472pb à 528 Pb (figure 13).

Au cours de ce travail nous avons choisis la deuxième paire d'amorces pour les raisons suivantes ;

Les températures d'hybridation des deux amorces sont proches l'une de l'autre : de 60°C et 61.13°C (figure 14), cela est en faveur d'un choix d'une température intermédiaire à inscrire dans l'étape d'hybridation des amorces dans le thermocycleur.

Les longueurs des amorces sont de 20 et 29 nucléotides (figure 14). Les oligonucléotides entre 18 et 30 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence.

La teneur en GC est de 60.00% et 47.83% pour l'amorce sens et anti sens respectivement (figure 14). La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%. Ce qui renforce notre choix pour cette deuxième paire.

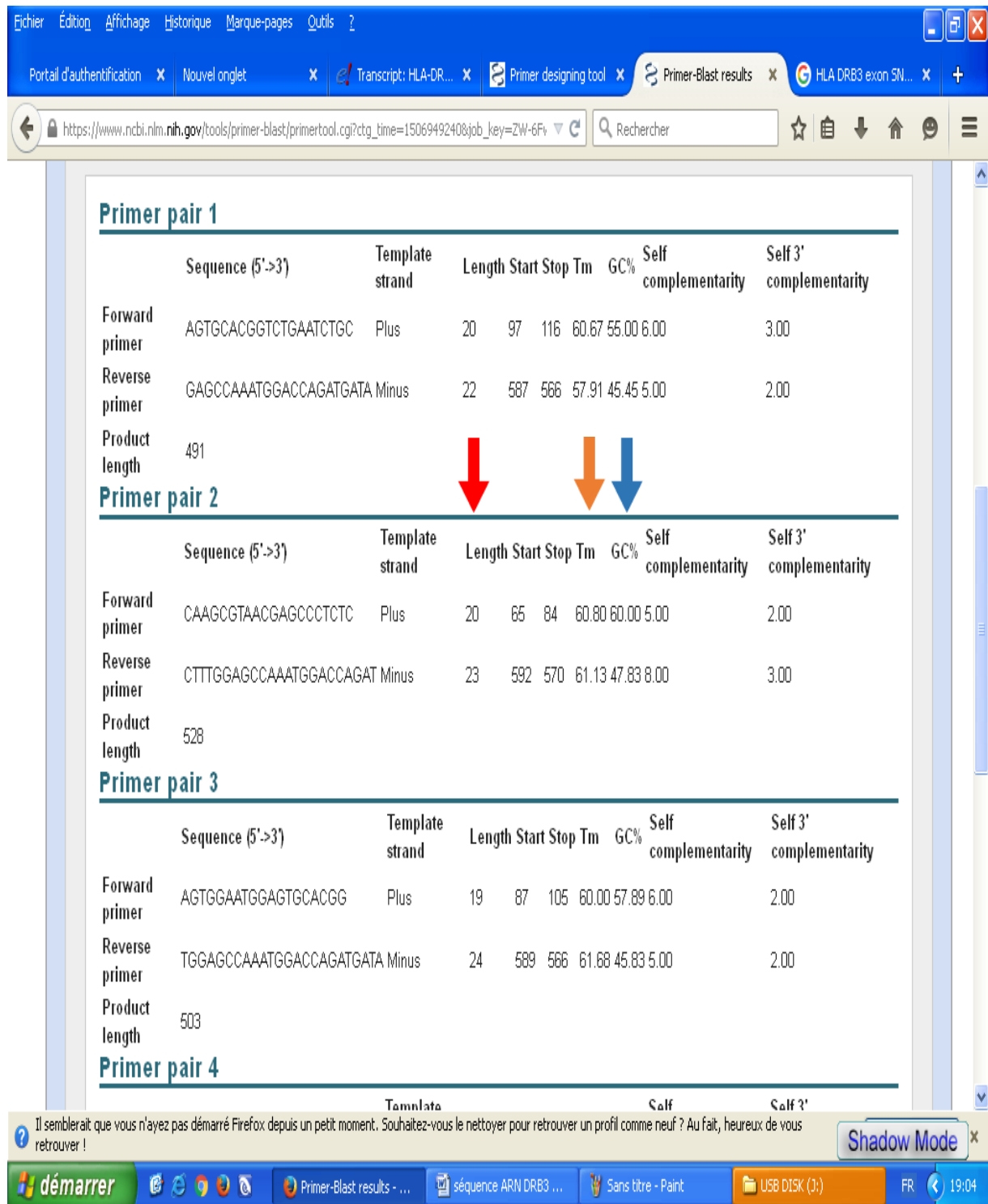


Figure 14 : caractéristiques du couple d’amorces choisi

Nous avons situé, ensuite, notre paire d’amorces dans la séquence du transcrit du gène DRB3 montré dans la figure 16.

CCTCCCTATAATTTGGAATGTGGGTGGAGGGGGTTCATAGTTCTCCCTGAGTGAGACTGCCTGCTCCTCTGGC
 CCCTGGTCCTGCTCCTTCTCCAGCATGGTGTGTCTGAAGCTCCCTGGAGGCTCCAGCTTGGCAGCGTTGACAG
 TGACACTGATGGTGCTGAGCTCCCGACTGGCTTTCGCTGGGGACACCCGACCACGTTTCTGGAGCTGCTTAAG
 TCTGAGTGTCAATTTCTCAATGGGACGGAGCGGGTGCAGTTCCTGGAGAGACACTTCCATAACCAGGAGGAGT
 ACGCGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTGAGGGAGCTGGGGCGGCCTGATGCCGAGTAC
 TGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGAAGCGGGGCCAGGTGGACAATTAAGTGCAGACACAACACTACGG
 GGTTGGTGAGAGCTTCACAGTGCAGCGGCGAGTCCATCCTCAGGTGACTGTGTATCCTGCAAAGACCCAGCCC
 CTGCAGCACCACAACCTCCTGGTCTGCTCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGGTGGTTCCG
 GAACGGCCAGGAAGAGAAGGCTGGGGTGGTGTCCACGGGCCTGATCCAGAATGGAGACTGGACCTTCCAG

ACCTGGTGATGCTAGAAACAGTTCCTCGGAGTGGAGAGGTTTACACCTGCCAAGTGGAGCACCCAAGCGTAA
 CGAGCCCTCTACAGTGAATGGAGTGCACGGTCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGG
 GCTTTGTGCTGGGCCTGCTCTTCTGGGGCCGGGCTGTTTACTTACTTCAGGAATCAGAAAGGACACTCTGAC
 TTCAGCCAACAGGATTCCTGAGCTGAAGTGCAGATGACAATTAAGGAAGAATCTTCTCCAGCTTTGCAGG
 ATGAAAAGCTTTCCCGCTGGCTGTTATTCTTCCACGAGAGAGGGCTTTCTCAGGACCTAGTTGCTACTGGTTC
 AGCAACTGCAGAAAATGTCCTCCCTTGTGGCTTCTCAGTTCCTGCCCTTGGCCTGAAGTCCCAGCATTGATGG
 CAGCGCCTCATCTTCACTTTTGTGCTCCCCTTGCCTAAACCCTATGGCCTCCTGTGCATCTGTACTCACCTGT
 ACCACAAACACATTACATTATTAATGTTTCTCAAAGATGGAGTAAATATCATCTGGTCCATTGGTCCAAAG
 ACAAAAAATGAAA

Figure 15 : Paire d'amorces N° 2 (en bleu) encadrant une partie de la séquence de
 l'ARN du gène DRB3

3.2. Les amorces encadrant le transcrit du gène DRB4

Nous avons travaillé avec la totalité du transcrit du gène DR4 et 10 couples d'amorces hautement spécifiques ont été obtenus. Les résultats sont représentés dans les figures ci-dessous (figure 16 et 17).

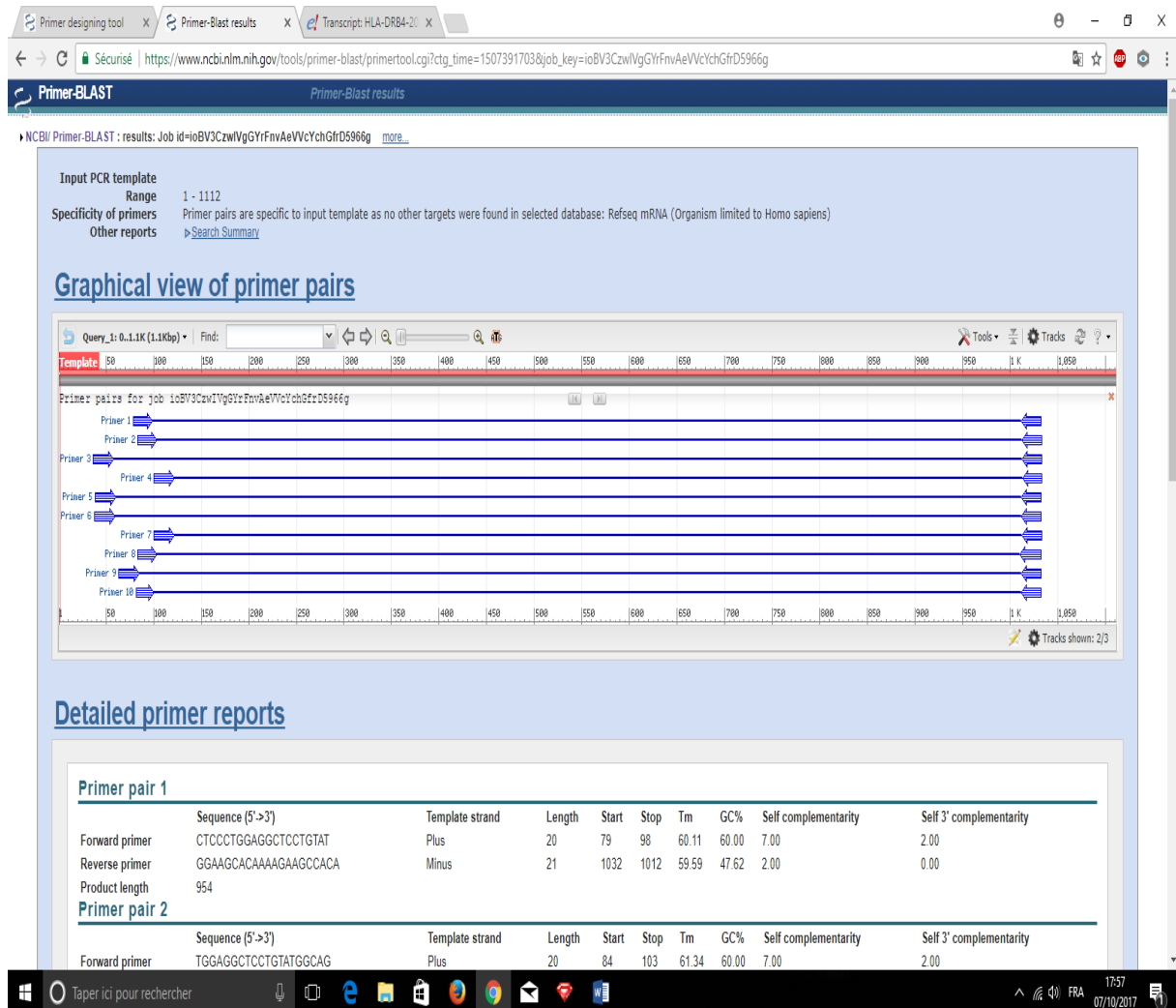


Figure 16 : Représentation graphique des 10 paires d'amorces encadrant une partie du transcrit DR4

Detailed primer reports

Primer pair	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Primer pair 1									
Forward primer	CTCCCTGGAGGCTCCTGTAT	Plus	20	79	98	60.11	60.00	7.00	2.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCACA	Minus	21	1032	1012	59.59	47.62	2.00	0.00
Product length	954								
Primer pair 2									
Forward primer	TGGAGGCTCCTGTATGGCAG	Plus	20	84	103	61.34	60.00	7.00	0.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCAC	Minus	21	1033	1013	60.27	52.38	2.00	0.00
Product length	950								
Primer pair 3									
Forward primer	ACCACTGGTCTGTCTCTCTC	Plus	21	37	57	59.31	52.38	7.00	0.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCAC	Minus	21	1033	1013	60.27	52.38	2.00	0.00
Product length	997								
Primer pair 4									
Forward primer	CAGCGCTGACAGTGACATTGA	Plus	21	101	121	61.20	52.38	8.00	3.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCACA	Minus	20	1033	1014	58.96	50.00	2.00	0.00
Product length	933								
Primer pair 5									
Forward primer	CACCTGGTCTGTCTCTCTCTC	Plus	22	39	60	60.03	54.55	3.00	0.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCACA	Minus	21	1032	1012	59.59	47.62	2.00	0.00
Product length	994								
Primer pair 6									
Forward primer	CCACTGGTCTGTCTCTCTCTC	Plus	22	38	59	60.03	54.55	5.00	0.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCACA	Minus	21	1032	1012	59.59	47.62	2.00	0.00
Product length	995								
Primer pair 7									
Forward primer	CAGCGCTGACAGTGACATTGA	Plus	21	101	121	61.20	52.38	8.00	3.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCAC	Minus	21	1033	1013	60.27	52.38	2.00	0.00
Product length	933								
Primer pair 8									
Forward primer	TGGAGGCTCCTGTATGGCAG	Plus	20	84	103	61.34	60.00	7.00	2.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCACA	Minus	22	1032	1011	60.16	45.45	2.00	0.00
Product length	949								
Primer pair 9									
Forward primer	ATGGTGTCTGAAGCTCCCT	Plus	21	64	84	61.11	52.38	4.00	3.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCACA	Minus	21	1032	1012	59.59	47.62	2.00	0.00
Product length	969								
Primer pair 10									
Forward primer	CCTGGAGGCTCCTGTATGG	Plus	19	82	100	58.86	63.16	7.00	2.00
Reverse primer	GGAAGCACAAAAGAACCCACA	Minus	21	1032	1012	59.59	47.62	2.00	0.00
Product length	951								

Figure 17 : Les 10 paires d'amorces obtenues avec l'outil primer-blast, encadrant le transcrit du gène DR4

Le logiciel Primer-Blast présente les résultats pour chaque paire d'amorces sous forme d'un tableau incluant les longueurs d'amorces respectives, leur température de fusion (Tm), leur pourcentage en GC et la longueur du produit amplifié (Figure 19).

Toutes les paires d'amorces obtenus sont spécifiques de la séquence du transcrit du gène DR4 et amplifierait des séquences de taille allant de 933pb à 995 Pb (figure 20).

Au cours de ce travail nous avons choisis la huitième paire d'amorces pour les raisons suivantes ;

Les températures d'hybridation des deux amorces sont proches l'une de l'autre : de 61.34°C et 60.15°C (figure 19), cela est en faveur d'un choix d'une température intermédiaire à inscrire dans l'étape d'hybridation des amorces dans le thermocycleur.

Les longueurs des amorces sont de 20 et 22 nucléotides (figure 19). Les oligonucléotides entre 18 et 30 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence.

La teneur en GC est de 60.00% et 45.45% pour l'amorce sens et anti sens respectivement (figure 19). La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%. Ce qui renforce notre choix pour cette deuxième paire.

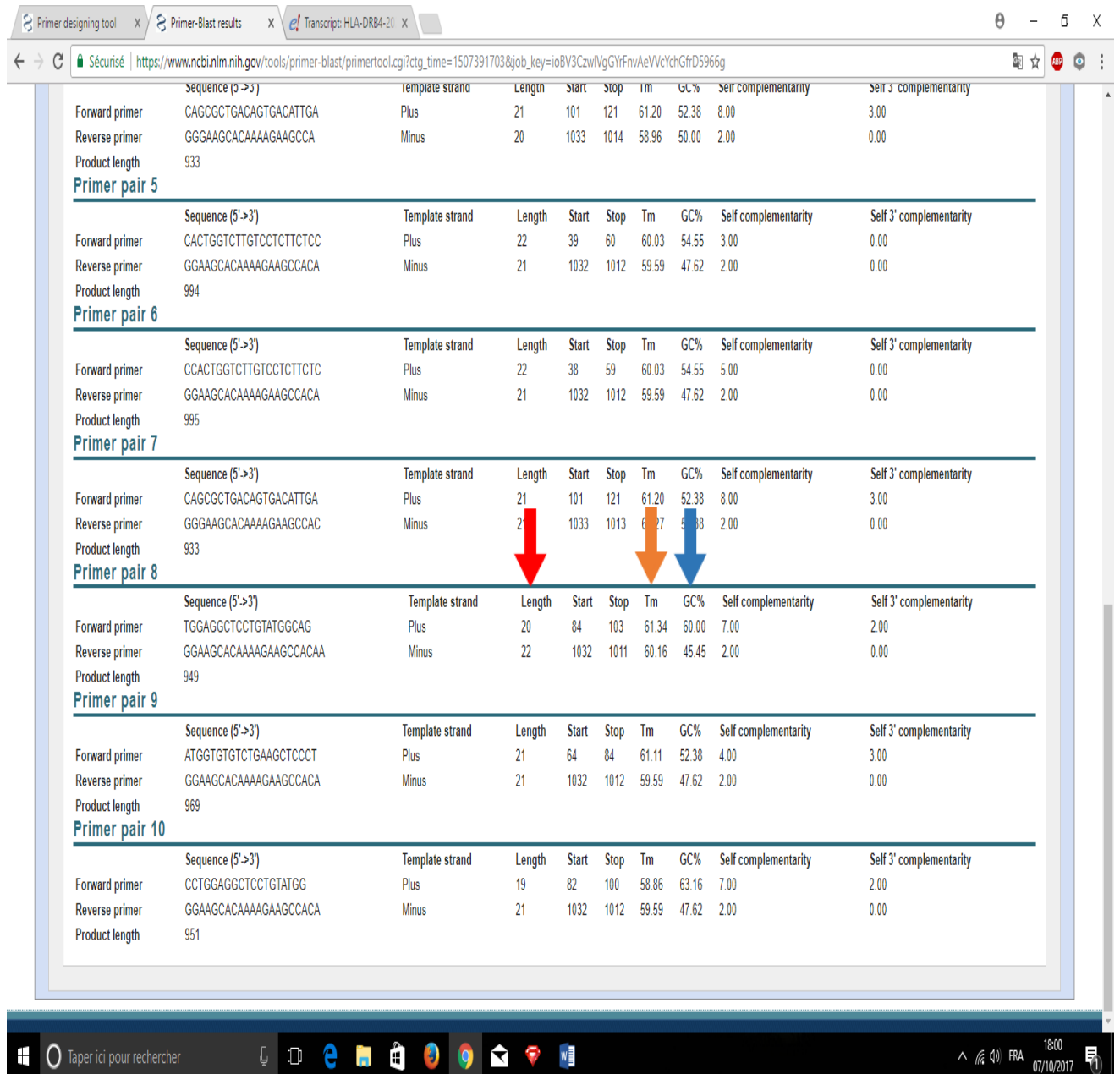


Figure 18 : caractéristiques du couple d'amorces choisi

Nous avons situé, ensuite, notre paire d'amorces dans la séquence du transcrit du gène DRB4 montré dans la figure 20.

```

ATAGTTCTCCCTGAGTGAGACTTGCCTGCTGCTCTGACCACTGGTCTTGCCTCTTCTCCA
GCATGGTGTGTCTGAAGCTCCCTGGAGGCTCCTGTATGGCAGCGCTGACAGTGACATTGA
CGGTGCTGAGCTCCCCACTGGCTTTGGCTGGGGACACCCAACCACGTTTCTTGGAGCAGG
CTAAGTGTGAGTGTCAATTCCTCAATGGGACGGAGCGAGTGTGGAACCTGATCAGATACA
TCTATAACCAAGAGGAGTACGCGCGCTACAACAGTGACCTGGGGGAGTACCAGGCGGTG
ACGGAGCTGGGGCGGCCTGACGCTGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCG
GAGGCGGGCCGAGGTGGACACCTACTGCAGATACTACGGGGTTGTGGAGAGCTTCA
CAGTGCAGCGGCGAGTCCAACCTAAGGTGACTGTGTATCCTTCAAAGACCCAGCCCCTGC
AGCACCACAACCTCCTGGTCTGCTCTGTGAATGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAGTCA
GGTGGTTCCGGAACAGCCAGGAAGAGAAGGCTGGGGTGGTGTCCACAGGCCTGATCCAG
AATGGAGACTGGACCTTCCAGACCCTGGTGTGCTGGAAACAGTTCCCTCGGAGTGGAGAG
GTTTACACCTGCCAAGTGGAGCATCCAAGCATGATGAGCCCTCTCACGGTGAATGGAGT
GCACGGTCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGGGCTTTGTGCTGGGC
CTGCTCTTCTTGGGACAGGGCTGTTTACTTTCAGGAATCAGAAAGGACACTCTGGA
CTTCAGCCAACAGGACTCTTGAGCTGAAGTGCAGATGACCACATTCAAGGAAGAACCTTC
TGCCCCAGCTTTGCAAGATGAAAAGCTTTCCACTTGGCTCTTATTCTTCCACAAGAGCTT
TGTCAGGACCAGGTTGTTACTGGTTCAGCAACTCTGCAGAAAATGTCCTCCCTTGTGGCTT
CTTTTGTGCTTCCCTTACCTAAACTGTCCTGCCTCCCATGCATCTGTACCCCTTGTGCC
ACACATTGCATTATTAATGTTTCTCAAACA

```

Figure 19 : Paire d'amorces N° 8 (en bleu) encadrant la séquence de l'ARN du gène DRB4

4. Perspectives

L'étape de la conception des amorces est une étape cruciale pour l'initiation de toute recherche en biologie moléculaire.

Au cours de cette étude, pour la première fois dans notre université, des amorces encadrant spécifiquement des transcrits de gènes ont été conçues. Les amorces, sens et anti-sens : Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

Les amorces, conçues dans cette étude, sont indispensables pour tout travail de recherche concernant les transcrits des gènes HLA-DRB3 et HLA-DRB4. En effet, ces amorces seront utilisées pour l'amplification des transcrits cités afin de détecter leur présence ou absence, d'une part, et rechercher des mutations ou des variations de séquences d'autre part.

Ces amorces seront utilisées aussi lors d'une RT-qPCR qui sert à quantifier le niveau de transcription des gènes HLA-DRB3 et HLA-DRB4 et analyser ainsi leur niveau de régulation et faire des comparaisons entre les sujets diabétiques et les sujets sains dans la population algérienne.

Déterminer le risque génétique est une condition fondamentale pour la mise en œuvre des essais de prévention primaire du diabète de type 1. En effet il a été trouvé dans des études précédentes que des sujets caucasiens hétérozygotes DR3/DR4 ont 50 fois plus de risques de développer un diabète par rapport à la population générale (Deloor-Demay, 2014).

Compte tenu des statistiques élevées du diabète de type 1 en Algérie et l'absence d'études d'associations génétiques chez cette même population le but de cette étude est de concevoir des amorces spécifiques encadrant les transcrits des gènes HLA DR3 et DR4 afin d'évaluer, par la suite, le risque conféré par ces allèles sur l'apparition du DT1 dans la population Algérienne au cours d'études ultérieures de type cas-témoins ou des études de familles.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons pu accéder aux séquences génomiques des gènes codant HLA-DRB3 et HLA-DRB4 ainsi qu'aux séquences de leur transcrits respectifs.

Ainsi nous avons pu concevoir des amorces spécifiques encadrant une partie du transcrit du gène HLA-DRB3 grâce au logiciel en ligne Primer-Blast. La séquence de l'amorce Forward (sens) : 5'CAAGCGTAACGAGCCCTCTC3' et la séquence de l'amorce Reverse (antisens) : 5'CTTTGGAGCCAAATGGACCAGAT3'.

Nous avons aussi pu concevoir les amorces nécessaires à l'amplification du transcrit du gène HLA-DRB4. La séquence de l'amorce Forward (sens) : 5'TGGAGGCTCCTGTATGGCAG3' Et la séquence de l'amorce Reverse (antisens) : 5'GGAAGCACAAAAGAAGCCACAA3'

Ces deux couples d'amorces ont une température d'hybridation optimale pour le bon déroulement d'une PCR, ont un pourcentage en GC supérieure à 40% et les deux séquences de chaque couple d'amorce sont compatibles entre elles, réunissant ainsi de bonnes conditions pour leur utilisation ultérieure.

Ces amorces sont indispensables pour tout travail de recherche concernant les transcrits des gènes HLA-DRB3 et HLA-DRB4. En effet, ces amorces seront utilisées pour l'amplification des transcrits cités afin de détecter leur présence ou absence, d'une part, et rechercher des mutations ou de variations de séquences d'autre part.

Ces amorces seront utilisées aussi lors d'une RT-qPCR qui sert à quantifier les ARNm des gènes HLA-DRB3 et HLA-DRB4 et analyser ainsi leur niveau de régulation et faire des comparaisons entre les sujets diabétiques et les sujets sains dans la population algérienne.

Ce travail m'a permis de me familiariser avec les outils de la bioinformatique tel que la recherche des séquences dans les bases de données, et de connaître toutes les caractéristiques essentielles au bon choix d'amorces spécifiques et compatibles entre elle pour un bon déroulement d'une amplification en PCR classique ou en RT-qPCR (Reverse Transcription quantification PCR).

Références bibliographiques

1. Alddafari MS. Etude du Polymorphismes Génétique du Diabète de Type 1 dans La Population de l'Ouest Algérien (INS-VNTR & CTLA-4). Diplôme de Magister, Génétique moléculaire humaine et santé, 2011; université de Tlemcen.net, 1995; 9(3): 293-298.
2. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan
3. Bell GI, Horita S, Karam JH. A Polymorphic Locus near the Human Insulin Gene is Associated with Insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 1984; 33(2): 176-179.
4. *Biotechniques*, 1996; 25: 272-79
5. *Biotechniques*, 1996; 25: 272-79.
6. Bouziane K, Touhami M (2006) Aspects cliniques et génétiques du diabète de type 1 chez l'enfant de l'ouest algérien. 3ème Congrès Maghrébin d'Endocrinologie Diabétologie. Alger.
7. C. Tse, J. Capeau 2003 Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel volume 63 numero 3 : 279-93
8. *Care*, 2000; 23: 1516-26.
9. Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbitt GS, Rajotte RV et al., (2000)
10. Chiez RM, Lane WS, Robinson RA, Trucco M, Strominger JL, Gorga JC (1994) Self peptides bound to the type 1 diabetes associated class II MHC molecules HLA-DQ1 and HLA-DQ8. *Int J Immunol* 11: 1639-1649.
11. Childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes*
12. Degos L (1990) Le complexe HLA dans la susceptibilité au diabète insulino-dépendant. *Presse médicale* 19: 1305-1306.
13. Diabetes prevention trial-type 1 Diabetes Study Group (2002) Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346: 1685-1691.
14. Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J. and Dveksler, G.S. General Concepts for PCR Primer Design. In: Dieffenbach, C.W, and Dveksler, G.S. (Eds.) *PCR Primer: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1995; pp. 133-148.
15. Drouin P, Blickle JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ. Diagnostic et classification du diabète sucré, les nouveaux critères. *Diabetes and metabolism*, 1999; 25(1): 72-80.

Références bibliographiques

16. Dubois-Laforgue D. Etiologie et physiopathologie du diabète de type 1. *Endocrinologie-*
17. Faas et Trucco. The Genes Influencing the Susceptibility to IDDM in Humans. *J Endocrinol*
18. Fédération Internationale du Diabète, ATLAS du DIABÈTE de la FID. (2013).
19. Frye RR, Benz CC, Liu E. Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. *Oncogene*, 1989; 4: 1153-7.
20. G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA,
21. Geenen V, Lefèbre PJ (1998) The intrathymic expression of insulin-related genes : implications for pathophysiology and prevention of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev* 14:90-115.
22. Glucose- dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 290: 1959-1962
23. Gorodezky C, Alaez C, Murguía A, Rodríguez A, Balladares S, Vazquez M, Flores H, Robles C (2006) HLA and autoimmune diseases: Type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmunity Reviews* 5:187-194.
24. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 1993; 11: 1002-30.
25. *Invest*, 1994; 17: 470-492.
26. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qurshi OS *et al.*, (2009) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combination inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 183:5458-5467.
27. Kantárová D, Buc M. Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus in Humans. *Physiol*, 2007; Res. 56: 255-266.
28. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of
29. Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility Locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat. Genet*
30. Knip M, Virtanen SM, Becker D, Dupre J, Krischer JP *et al.*, (2011) Early feeding and risk of type 1 diabetes: experiences from the Trial to Reduce Insulin-dependent

Références bibliographiques

- diabetes mellitus in the Genetically at Risk (TRIGR). *American Journal of Clinical Nutrition* 94(6): 1814-1820.
31. Kukko M, Kimpimaki T, Kupila A, Korhonen S, Kulmala P, Savola K, Simell T, Keskinen P, Ilonen J, Simell O, Knip M. . Signs of beta-cell autoimmunity and hla-defined diabetes susceptibility in the finnish population: The sib cohort from the type 1 diabetes prediction and prevention study. *Diabetologia*, 2003 ; 52:63-70.
 32. Lorenz, T. C. *Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and*
 33. Mallone R, Brezar V, Boitard C (2011) T cell recognition of autoantigens 154 m human type 1 diabetes: clinical perspectives. *Clin Dev Immunol* 155: 513-210.
 34. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *MethodsEnzymol*, 1987; 155: 335-50.
 35. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT (2008) Clinical implications of a molecular genetic classifica-tion of monogenic (3-cell diabetes. *Nat ClinPractEndocrinolMetab* 4: 200-213
 36. Nishikawa M, Huang L (2001) Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum. Gene Ther* 12: 861-870.
 37. *Nutrition*, 2007 ; Elsevier Masson: 1-15.
 38. OMS Organisation Mondiale de la Santé 2012. Prévention du diabète.
 39. OMS Organisation Mondiale de la Santé 2014. Journée mondiale du diabète.
 40. OMS Organisation Mondiale de la Santé 2015. Diabète. *Optimization Strategies. J.Vis. Exp.* (63), e3998, 2012.
 41. Permutt MA, Wasson J, Cox N (2005) *Genetiepidemiologyofdiabetes. JlinInvest* 115(6):1428-1439.
 42. Philips J-C, Radermecker RP (2012) *Lediabètedetypel: de la prédisposition génétique à uncontexteenvironnementalhypoéthique. RevMedLiège* 67:319-325
 43. Sharrocks, A.D. The design of primers for PCR. In: Griffin, H.G. and Griffin, A.M (Eds.) *PCR Technology: Current Innovations*. London: CRC Press, 1994; pp. 5–11.
 44. Sharrocks, A.D. The design of primers for PCR. In: Griffin, H.G. and Griffin, A.M (Eds.) *PCR Technology: Current Innovations*. London: CRC Press, 1994; pp. 5–11.
 45. Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature*, 1992; 359: 557-8.
 46. Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature*, 1992; 359: 557-8.

Références bibliographiques

47. SumnikZ, CinekO, BratanicN, KordonouriO, KulichMet *al.*,(2006)Riskofceliacdisease inchildrenwithtypel diabetesismodifiedbypositivityforHLA-DQB1*02-DQA1*05and TNF-308A.DiabetesCare29:858-863.
48. SumnikZ, CinekO, BratanicN, KordonouriO, KulichMet *al.*,(2006)Riskofceliacdisease inchildrenwithtypel diabetesismodifiedbypositivityforHLA-DQB1*02-DQA1*05and TNF-308A.DiabetesCare29:858-863.
49. Van HalterenAG, TysmaOM, van EttenE,MathieuC, RoepBO (2004)alpha, 25- dihydroxy-vitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cellsvia the selective induction of apoptosis.JAutoimmun23:228-245.
50. Van HalterenAG, TysmaOM, van EttenE,MathieuC, RoepBO (2004)alpha, 25- dihydroxy-vitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cellsvia the selective induction of apoptosis.JAutoimmun23:228-245.
51. Walker NM, Rich SS. Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Genome-wide association study and metaanalysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes, 2009; 4: 703-20.
52. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-Blast: A tool to design target-specefic for polymerase chain reaction, 2012.
53. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-Blast: A tool to design target-specefic for polymerase chain reaction, 2012.
54. Zimmermann K, Mannhalter JW. Technical aspects of quantitative competitive PCR.
55. Zimmermann K, Mannhalter JW. Technical aspects of quantitative competitive PCR.

Résumé :

Introduction. L'incidence du diabète de type 1 (DT1) dans différents groupes ethniques est extrêmement variable, suggérant l'implication aussi bien de déterminants génétique que d'éléments de l'environnement. Des études précédentes ont montré que des sujets caucasiens hétérozygotes DR3/DR4 ont 50 fois plus de risques de développer un diabète par rapport à la population générale.

Compte tenu des statistiques élevées du DT1 en Algérie et l'absence d'études d'associations génétiques chez cette même population le but de cette étude est de concevoir des amorces spécifiques encadrant les transcrits des gènes HLA DR3 et DR4 afin d'évaluer, par la suite, le risque conféré par ces allèles sur l'apparition du DT1 dans la population Algérienne au cours d'études ultérieures de type cas-témoins ou des études de familles.

Matériel et méthodes. Les séquences génomiques et des transcrits des gènes HLA-DR3 et HLA-DR4 ont été obtenus grâce à la base de données Ensembl. Le logiciel Primer-Blast a été utilisé pour concevoir des amorces spécifiques encadrant une partie de chaque transcrite.

Résultats. Dans un premier temps, des amorces spécifiques ont été obtenues, ce qui nous a obligé à changer la séquence à amplifier. Les amorces obtenues sont spécifiques des transcrits des gènes HLA DR3 et DR4 et présentent des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR classique ou une RT-qPCR.

Summary :

Introduction The incidence of type 1 diabetes (T1D) in different ethnic groups is highly variable, suggesting the involvement of both genetic determinants and environmental elements. Previous studies have shown that DR3 / DR4 heterozygous Caucasian subjects are 50 times more likely to develop diabetes than the general population.

Taking into account the high statistics of DT1 in Algeria and the absence of studies of genetic associations in this same population, the aim of this study is to conceive specific primers framing the transcripts of the HLA DR3 and DR4 gene in order to evaluate the risk conferred by these alleles on the occurrence of T1D in the Algerian population in subsequent case-control studies or family studies.

Material and methods. The genomic sequences and transcripts of the HLA-DR3 and HLA-DR4 genes were obtained using the Ensembl database. The Primer-Blast software was used to design specific primers framing a portion of each transcript.

Results. Initially, aspecific primers were obtained, which forced us to change the sequence to be amplified. The primers obtained are specific to the transcripts of the HLA DR3 and DR4 genes and exhibit optimal characteristics for the smooth operation of a conventional PCR or a RT-qPCR.

خلاصة:

مقدمة: انتشار مرض السكري من النوع 1 (T1D) في مجموعات عرقية مختلفة هو متغير للغاية، مما يشير إلى مشاركة كل من العوامل الوراثية والعناصر البيئية. وقد أظهرت الدراسات السابقة أن DR3 / DR4 المواضيع فوقازي متخالف هي أكثر عرضة 50 مرة لتطوير مرض السكري من عامة السكان.

مع الأخذ بعين الاعتبار إحصاءات عالية من DT1 في الجزائر وغياب الدراسات للرابطات الوراثية في نفس السكان، والهدف من هذه الدراسة هو تصور الإشعال محددة تأطير النصوص من هلا DR3 و DR4 الجينات من أجل تقييم المخاطر التي تمنحها هذه الأليلات على حدوث T1D في السكان الجزائريين في دراسات لاحقة للتحكم في الحالات أو دراسات الأسرة.

المواد والأساليب : تم الحصول على تسلسل الجينومية والنصوص من الجينات هلا-DR3 و هلا-DR4 باستخدام قاعدة بيانات إنزيمبل. تم استخدام البرنامج التمهيدي الانفجار لتصميم الإشعال محددة تأطير جزء من كل نص.

النتائج : في البداية، تم الحصول على الإشعال محددة، الأمر الذي أجبرنا على تغيير تسلسل ليتم تضخيمها. الإشعال التي تم الحصول عليها هي محددة لنصوص جينات هلا DR3 و DR4 وعرض الخصائص المثلى للعمل السلس لير التقليدية أو رت-قر.