

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

Thème :

« Caractérisation des facteurs de risque génétiques et environnementaux du
Diabète de type 1 dans la population de Tlemcen :
Etude d'association des polymorphismes des gènes HLA de classe II
(HLA DR3-DR4) »

Présenté par : MOUHADJER Rachida

Soutenue le : 20/06/2019

Devant le jury de soutenance composé de:

Présidente : Mme DALI SAHI Majda

MCA, Université de Tlemcen

Examinatrice : Mme RAHOUI Asmaa

MCB-HU, Université de Tlemcen

Promoteur : Mr BOULENOUAR Houssam

MCB, Université de Tlemcen

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers le directeur de mémoire Docteur **BOULENOUAR Houssam**, à maitre de conférences l'université Abou Bakr BELKAID de Tlemcen, pour avoir dirigé ce travail en mettant accent sur l'intérêt qu'il a bien daigné porté à mes travaux et prodiguer de nombreux et judicieux conseils. Je le remercie particulièrement pour toutes ses qualités humaines.

Mes vifs remerciements ainsi que ma considération vont également à la responsable de filière **Mme DALI SAHI Majda**, maitre de conférences à l'université Abou Bakr BELKAID de Tlemcen, pour son soutien et ses riches compétences durant tout le cursus.

Je remercie également **Mme RAHOUI Asmaa**; maitre de conférences à l'Université Abou Bakr BELKAID de Tlemcen; d'avoir accepté avec une grande amabilité de faire partie de ce jury pour examiner ce mémoire. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.

Je voudrais aussi exprimer ma vive reconnaissance envers tous les enseignants de l'université Abou Bakr BELKAID de Tlemcen, ainsi que tous ceux qui ont participé à ma formation.

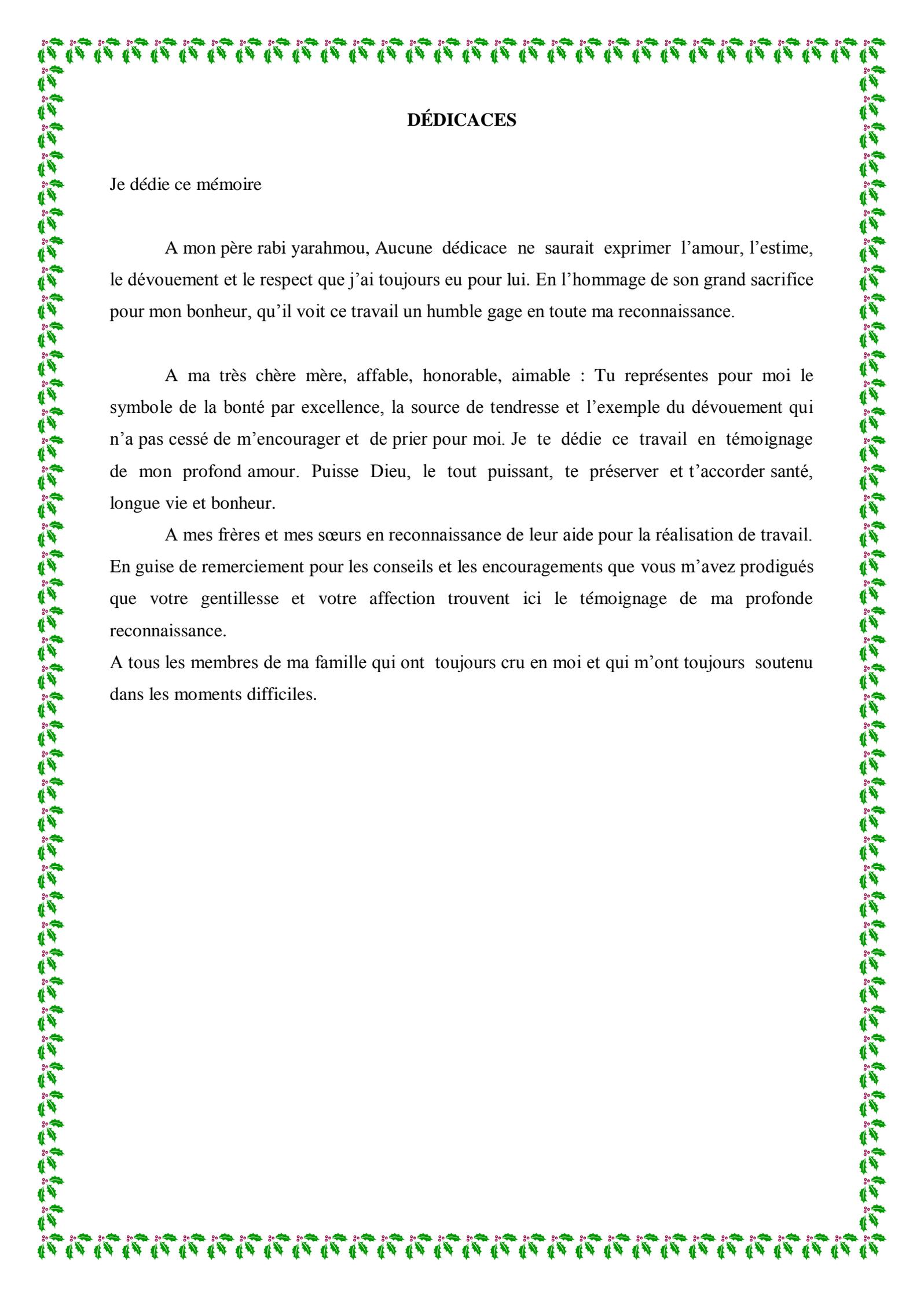
Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble du personnel de l'EPH de Sebdo pour leurs aimable collaboration,.

Je tiens à remercier vivement Monsieur **le professeur MEGUENI Kaoual** pour m'avoir permis de réaliser la majeure partie expérimentale dans le laboratoire Cancer Lab dont il est directeur, . Tous les membres de son Laboratoire pour leur grande disponibilité et l'ambiance conviviale qui m'a facilité le travail.

Je veux également remercier ma famille et mes amis pour leur soutien moral.

Pour finir je tiens à remercier tous mes amis (es) de ma promotion « Biologie moléculaire et génétique » pour cette aventure de cinq ans qu'on a vécue ensemble, et pour tous les bons moments qu'on a passés.

Enfin je remercie tout particulièrement mes parents, pour leur inconditionnel tout au long de ces longues années d'études.



DÉDICACES

Je dédie ce mémoire

A mon père rabi yarahmou, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui. En l'hommage de son grand sacrifice pour mon bonheur, qu'il voit ce travail un humble gage en toute ma reconnaissance.

A ma très chère mère, affable, honorable, aimable : Tu représentes 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. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes frères et mes sœurs en reconnaissance de leur aide pour la réalisation de travail. En guise de remerciement pour les conseils et les encouragements que vous m'avez prodigués que votre gentillesse et votre affection trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A tous les membres de ma famille qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles.

*Ce travail a été réalisé
au laboratoire de recherche Cancer Lab
Université Abou bakr Belkaid de Tlemcen
dirigé par mr le Professeur MEGUENNI Kaoual
sous la direction du Docteur BOULENOUAR Houssam*

*et dans le service de laboratoire central
du EPH Sebdou*

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1.	Epidémiologie.....	2
2.	Classification du diabète de type 1.....	3
3.	Physiopathologie.....	4
3.1.	Marqueurs immunologiques du diabète de type 1.....	4
3.2.	Mécanisme de la réaction auto-immune du diabète de type 1.....	4
3.3.	La réponse des cellules CD4+ des lymphocytes T à la proinsuline.....	5
4.	Affections auto-immunes associées au diabète de type 1.....	5
4.1.	Association diabète de type 1 et maladie cœliaque.....	5
4.2.	Association diabète de type 1 et atteintes de la thyroïde.....	6
5.	Facteurs de risques environnementaux du diabète de type 1.....	6
5.1.	Les infections virales.....	6
5.2.	Modalité d'allaitement.....	7
5.3.	Toxines.....	8
5.4.	Carence en vitamine D.....	8
5.5.	La théorie hygiéniste.....	9
5.6.	L'hypothèse accélératrice.....	9
5.7.	Les variations selon le sexe.....	10
6.	Le terrain génétique de susceptibilité au diabète de type 1.....	10
6.1.	Prédisposition génétique.....	10
6.2.	Loci de susceptibilité héritée pour le diabète de type 1.....	11
6.2.1	Le gène de Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4).....	11
6.2.1.1.	Polymorphisme du gène de CTLA-4 et diabète de type I.....	12
6.2.2.	Gène de l'insuline (INS).....	13

6.2.3. Mutations génétiques et polymorphisme du gène de l'insuline.....	13
6.3.3. Les gènes human leukocyte antigen (HLA).....	14
6.2.3.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité(CMH) et le diabète de type 1.....	16
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	19
1. Le type d'étude.....	20
1.1. La population étudiée.....	20
2. les facteurs d'exclusion et inclusion chez les cas	20
3. les facteurs d'exclusion et inclusion chez les témoins	20
4. Questionnaire et enregistrement.....	20
5. Prélèvement sanguins	21
6. Extraction d'ADN	21
6.1 Extraction de l'ADN par la technique NaCl (salting out).....	21
6.1.1.1. Lyse des globules rouges.....	21
6.1.1.2 Lyse des leucocytes.....	21
6.1.1.3 Précipitations des protéines.....	22
6.1.1.4 Précipitation de L'ADN	22
1.2.5.2. Dissolution de l'ADN.....	22
6.2 Extraction de l'ADN par kit wiraGEN	22
6.2.1 Description de la technique	22
6.3. Dosage de l'ADN.....	24
6.4. Analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) des fragments d'ADN obtenue par PCR (Polymérase Chain Reaction-).....	24
6.4.1. Le principe de la PCR	24
6.4.2. Condition de PCR de HLA DR3 et DR4.....	25
6.4.3. Principe de la RFLP	26
6.4.4. 6.4.4.Protocole de la technique RFLP.....	27
Chapitre III: Résultats	29
1. Les variables propres à la description de l'échantillon.....	31
1.1. Zones d'étude.....	31
1.2. Age et sexe.....	32

1.3. Consanguinité.....	33
1.4. IMC Kg/m ²	34
1.5. Les paramètres du bilan biologique	34
2. Analyse multi variée :	36
2.1. Analyse des composantes principales (ACP)	36
3. Résultats de l'analyse logistique	38
4. Résultats de la spectrophotométrie	41
5. Résultat de la Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	42
Chapitre IV: Discussion	43
1. Résultats de la régression logistique	44
2. Discussion sur le degré de pureté de l'ADN et sur la réalisation de la PCR	45
Conclusion	48
Références bibliographiques	50
Annexes	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAE : Anticorps Anti-Endomysium
AAG : Anticorps Anti-Gliadine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARNm : L'acide ribonucléique messenger
ATG : Antitransglutaminase tissulaire
BMI : Body Mass Index
BSA : Bovine Serum Albumin
BB5 : Binding Buffer
CD : Coaster Differentiated
Chr : chromosome
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CB5 : Clean Buffer
CPA : cellules présentatrices d'antigènes.
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DID : Diabète insulino-dépendant
DNNP : diabète néonatal permanent
DO : Densité Optique
DPT-1 : the Diabetes Prevention Trial-Type 1
DQA/B : haplotypes Alpha/Béta
DR/P/Q : Haplotypes
DT1 : Diabète de Type 1
DT2 : Diabète de Type 2
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ENDIT : European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial
EB : Elution Buffer
FID : Fédération Internationale du Diabète
GAD65 : Glutamic Acid Decarboxylase (Décarboxylase de l'Acide Glutamique)
GIP : Glucagon-Like Peptide-1
HbA1C : hémoglobine glyquée
HLA : humaine leucocyte Antigène
IA-2 : Islet Antigen 2

IAPP : Islet Amyloid Polypeptide
IDDM : Insulin-Dependent Diabetes Mellitus
IFN : Interferon
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL : Interleukin
IMC : Indice de Masse Corporelle
INS : gène de l'insuline
LADA : Latent Autoimmune Diabetes in Adults
LMP : Low Molecular Protein
LT : Lymphocyte T
MC : maladie cœliaque
M-DC : Cellules Dendritiques Myéloïdes
MODY : Maturity-Onset Diabetes of the Young
NK : lymphocyte Natural Killer
Nkx2 : NK2 homeobox 1
NOD : Non-Obese Diabetic
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OR : Odds Ratio
Pb : Paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pdx1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1
pH : Potentiel hydrogène
RE : Réticulum endoplasmique
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS : Sodium dodécyl Sulfate
SLB : Solution de Lyse des globules Blancs
SNP : single-nucleotide polymorphism
TAP : The Transporter associated with Antigen Processing
TCR : T Cell Receptor
Th : Lymphocytes T helper
TH : Tyrosine Hydroxylase
TIGR : Training Interventions and Genetics of Exercise Response.
TNF : Tumor Necrosis Factor

Tr : cellules T régulatrices

Treg : T régulateurs (lymphocytes)

TRIGR : Trial to Reduce IDDM in the Genetically et Risk

UTR : UnTranslated Region

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

WB5 : Wash Buffer.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Amorces utilisées pour la PCR et leurs séquences nucléotidiques.....	25
Tableau 2. Les variables propres à la description de l'échantillon.....	30
Tableau 3. Résultats de l'étude du modèle de régression logistique.	38
Tableau 4. Absorbance et concentration des extraits d'ADN obtenus à partir des échantillons sanguins des sujets témoins	39
Tableau 5. Moyennes des concentrations des extraits d'ADN des témoins et leur pourcentage de pureté.....	40
Tableau 6. Rapport d'absorbance (R) et concentration des extraits d'ADN obtenus pour les cas.....	41
Tableau 7. Moyennes des concentrations des extraits d'ADN des cas et leur pourcentage de pureté.....	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte simplifiée des gènes de la région HLA.....	16
Figure 2 . Le polymorphisme d'un acide aminé du HLA-DQ est associé à la résistance ou la susceptibilité au DT1.....	17
Figure.3 Des diagrammes illustrant les principes de la technique RFLP pour détecter les allèles DR4 et D.....	27
Figure 3. Principes de la technique RFLP pour détecter les allèles DR4 et DR3	31
Figure 4. Carte géographique de la wilaya de Tlemcen region de Sebdou.....	32
Figure 05. Répartition de la population selon le statut âge	32
Figure 06. Répartition de la population selon le statut sexe.....	33
Figure07. Histogramme de consanguinité dans la population.....	34
Figure08. Histogramme d'IMC dans la population.....	34
Figure09. Histogramme de Glycémie dans la population.....	34
Figure10. Histogrammes des paramètres du bilan biologique dans la population.....	35
Figure11. Histogramme de HbA1c dans la population.....	36
Figure12. Plan ACP chez les témoins.....	36
Figure13. Plan ACP chez les cas.....	37

Introduction

Introduction :

D'après la Fédération Internationale du Diabète, toutes les 7 secondes une personne meurt du diabète dans le monde, c'est plus que le sida et la malaria associé (Fédération Internationale du Diabète, 2013) ; Selon l'OMS, le diabète pourrait devenir la 7^e cause de décès dans le monde d'ici 2030 (OMS, 2014).

Le diabète existe sous deux formes, le diabète insulino-dépendant (DID) appelé également diabète de type 1, et le diabète non insulino-dépendant (DNID) appelé aussi diabète de Type 2.

Le DT1 apparaît avant l'âge de 20 ans, dans près de 40 % des cas, la maladie varie en fonction, de l'âge, du sexe, de l'origine ethnique et de la localisation géographique (Woo et al., 2004).

Selon le registre national du diabète (2005), l'incidence du diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents est de 9 pour 100 000 et est étroitement associée à la maladie cœliaque (Bouziane et Touhami, 2006).

Le diabète de type 1 est une maladie autoimmune résultant de la destruction des cellules β pancréatiques par le système immunitaire. C'est une maladie multifactorielle ; où des facteurs génétiques et environnementaux sont associés, c'est pour cela qu'aucun facteur étiologique n'a été clairement défini jusqu'à présent (Craighead et al., 1978).

Les individus diabétiques sont absolument dépendants de l'apport d'insuline exogène à l'aide d'injection sous-cutanée indispensable à leur survie.

Globalement, 20 gènes de prédisposition génétique au diabète de type 1 ont été identifiés (Alddafari, 2011).

Le principal gène de prédisposition se localise au niveau du chromosome 6 du système d'histocompatibilité (HLA) de classe II, en deuxième position on retrouve le VNTR (nombre variable en tandem) à l'extrémité 5' du gène de l'insuline qui régule l'expression de l'insuline au niveau du thymus ; Le gène Cytotoxique T-Lymphocyte Antigen 4 (*CTLA-4*) est associé à la régulation des LT, il occupe la troisième place des gènes de susceptibilité au DT1 (Alddafari, 2011).

Ces marqueurs génétiques diffèrent en fonction de l'ethnie et de la population, par exemple l'association de la combinaison HLA DR3/DR4 caractérise les populations caucasiennes tandis que HLA DR7 et DR9 caractérise la population africaine, cependant, HLA DR4 et DR9 est retrouvé chez les peuples d'Asie (**Danze et al., 1997**).

Le rôle exercé par les facteurs environnementaux tel que les infections virales (**Hober et al., 1998**), la modalité d'allaitement (**Knip et Akerblom, 1999**), la carence en vitamine D (**Van Halteren et al., 2004**), les toxines (**Myers et al., 2002**), la théorie hygiéniste (**Bach, 2009**), l'hypothèse accélératrice (**Wilkin, 2001**), les variations selon le sexe (**Barat et Lévy-Marchal, 2013**) ont été abordées dans la littérature comme facteurs qui se superposent à la génétique pour déclencher la maladie.

Synthèse bibliographique

1. Epidémiologie du diabète de type 1 :

Le diabète de type 1 varie selon l'âge, le sexe, la localisation géographique, l'origine ethnique et la période. Dans certaines régions du monde en particulier dans les pays scandinaves, on a constaté une forte augmentation de l'incidence du diabète insulino-dépendant chez l'enfant dans l'ensemble (**Minna, 2004**)

Le diabète de type 1 représente 10% de la population diabétique mondiale et 90% des cas sont des enfants. Chaque année, près de 76 000 enfants de moins de 15 ans développent un DT1 . En 2010, 480 000 enfants seraient atteints de la maladie à l'échelle mondiale (**DIABETES ATLAS, 2006**).

Le risque de développer le diabète de type 1 avant l'âge de 20 ans est de 1 / 300. Chez 40% des cas, la maladie apparaît avant l'âge de 20 ans (**Minna, 2004**).

L'étude internationale dirigée par D.I.A.M.O.N.D (organisation mondiale du diabète) pendant 10 ans sur les enfants de moins de 15 ans a mis en évidence une augmentation de l'incidence annuelle de l'ordre de 3,4%.

En Europe, l'incidence augmente avec une croissance moyenne de 3,2% selon l'étude EURODIAB (étude menée dans 44 centres en Europe entre 1989-1998 sur des enfants de moins de 15 ans). La croissance la plus forte a été enregistrée dans la tranche d'âge des 0 - 4 ans (4,8% par an).

L'incidence du diabète de type 1 dans des pays développés suit un gradient décroissant du nord au sud à l'exception de la Sardaigne où l'incidence est parmi les plus fortes : 38 cas pour 100 000 habitants par an). (**OMS 2014**) En France, la prévalence de DT1 atteint 0,3 % de la population totale, l'incidence est de 10 / 100 000 /an. C'est l'une des maladies chroniques les plus répandues chez les enfants (**Minna, 2004**).

En Afrique, on constate une progression élevée à l'image de ce qui se passe dans de nombreux pays en développement. Les données épidémiologiques des pays africains sont rares et souvent disparates (**Jaffiol, 2011**). Les résultats estimés pour l'année 2010 montrent

que 37 500 enfants d'Afrique subsaharienne de moins de 14 ans souffrent de diabète de type 1 (**Aouiha et Kaushik, 2010**).

L'institut national de santé publique algérien (INSP) a effectué une enquête en 1990 qui montre que le diabète occupe la 4^{ème} place des maladies non transmissibles (**Malek et al., 2001**). Une autre enquête par sondage sur ménage, réalisée à Alger en 1992, donne une prévalence globale de 2,1% (**Bezzaoucha, 1992**).

Une étude menée en 1995 à Alger, portant sur 985 sujets âgés de plus de 25 ans a révélé un taux de 8,7% de DT1 (**Kemali et al., 1995**).dernièrement, cette prévalence a été estimée à 8,2% (selon les critères de l'OMS) et 8,8% (selon les nouveaux critères ADA) dans une région de Sétif (**Malek et al., 2001**).

Dans la commune de Tlemcen, une étude sur un échantillon de 7656 individus a rapporté une prévalence du diabète de type 2 de 10,5 % et de type 1 de 3,7 %, Cette prévalence globale est de 15,3 % en milieu urbain et de 12,9 % en milieu rural. De plus, 50 % des diabétiques ont au moins un membre de leur famille atteint de la maladie (**Zaoui et al., 2007**).

2. Classification du diabète de type 1 :

Selon la classification des diabètes de type 1 par l'Association Américaine du Diabète et l'OMS, on distingue deux sous-types (**Grimaldi, 2000**) :

- Le diabète de type 1 auto-immun, qui est le plus fréquent (il représente plus de 90 % des cas en Europe).
- Le diabète de type 1 idiopathique (caractérisé par l'absence d'auto-anticorps). Il s'agit d'un cadre nosologique mal défini, incluant les diabètes céto-siques du sujet noir originaire d'Afrique subsaharienne et les diabètes suraigus japonais (**Grimaldi, 2000**).

3. Physiopathologie

3.1. Marqueurs immunologiques du diabète de type 1 :

Des auto-anticorps sont dirigés contre les structures cellulaires représentent des marqueurs immunologiques utiles dans le diagnostic et, parfois, le pronostic de certaines maladies auto-immunes (**Le Goff et al., 2008**).

Les principaux marqueurs auto-antigènes prédictifs sont l'insuline, l'isoforme de 65kDa de la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD65), et la tyrosine-phosphatase IA-2 (**Notkins et Lernmark., 2001**). Ce sont des marqueurs de la réaction auto-immune dirigée contre les cellules β . Ces auto-antigènes ont une valeur de diagnostic prédictif de près de 90% (Gottlieb et Eisenbarth., 1998). En plus on a démontré que le polypeptide IAPP (human islet amyloid polypeptide) et ZnT8 (transporteur) sont des cibles des cellules T (**Boitard et al., 1992**).

Si un individu possède les trois types d'auto-anticorps, il présente un risque 80 fois plus élevé de développer un DT1. La combinaison des allèles HLA de susceptibilité et d'auto-anticorps accroît cette valeur prédictive (**Gottlieb et Eisenbarth., 1998**).

3.2. Mécanisme de la réaction auto-immune DT1 :

Les lymphocytes B, lymphocytes T CD4, cellules dendritiques et macrophages sont présents dans l'insulite. Cependant, leur nombre reste faible par rapport aux lymphocytes T CD8. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) et cellules NK (Natural Killer), ne sont que très rarement observés dans l'insulite des patients diabètes (**Shimamura, 2007 ; Huang, 2008**).

La présentation des auto-antigènes des cellules β par les macrophages ou les cellules dendritiques aux cellules LT helper CD4+ en association avec les molécules CMH-II est considérée comme l'étape initiale dans le développement du diabète auto-immune (**Yoon et Jun, 2005**).

Les CPA activés sécrètent l'IL-12 qui stimule les cellules LT CD4+ de type TH1. Les cellules LT CD4+ sécrètent de l'IFN δ et l'IL-2. L'IFN δ active les macrophages, qui à leur tour libèrent l'IL1 β , le TNF α et des radicaux libres toxiques (cytotoxique) pour les cellules β .

L'IL-2 et d'autres cytokines induisent la migration de lymphocytes T CD8+ périphériques vers les foyers inflammatoires au niveau des îlots de Langerhans. Les cellules LT CD8+ spécifiques des auto-antigènes des cellules β se différencient en lymphocytes cytotoxiques par reconnaissance de ces auto-antigènes liés aux molécules CMH-II en présence de cellules LT CD4+ (Yoon et Jun, 2005).

Les cellules cytotoxiques provoquent une destruction cellulaire par libération de perforine et granzyme et une apoptose médiée par Fas CD95 (Yoon et Jun, 2005).

3.3. La réponse des cellules CD4+ des lymphocytes T à la proinsuline :

On a étudié la réponse immunitaire impliquant la molécule de classe DQ8 qui démontre que cette réponse est dirigée contre l'insuline et le peptide-C. Grâce à la découverte de la forte prédisposition génique de cette molécule à développer le DT1. (Dubois-Lafforgue et al., 1999).

Ainsi différents épitopes ont été localisés depuis l'extrémité du peptide-C (C13-29) et la chaîne B (B11-27) chez les sujets à risque de développer le DT1 et l'épitope situé à l'intérieur de la chaîne B (B1-16) chez les sujets atteints de DT1 (Mallone et al., 2011).

La reconnaissance de HLA-DR401 restreint à la chaîne A de l'insuline dépend de la présence d'une modification post traductionnelle, un pont disulfure entre les résidus cystéine oxydés A6 et A7 (Mallone et al., 2011).

4. Affections auto-immunes associées au diabète de type 1.

D'autres affections auto-immunes peuvent être associées au DT1 notamment la maladie cœliaque, la maladie de Basedow, la thyroïdite de Hashimoto et la maladie d'Addison (insuffisance surrénalienne) (Humbe, 2002).

4.1. Association entre diabète de type 1 et maladie cœliaque

De nombreux travaux ont rapportés l'augmentation de la prévalence de la maladie cœliaque MC dans la population diabétique tant chez l'adulte que chez l'enfant (Aloulou et al., 2008).

La MC se caractérise par la présence des anticorps antitransglutaminase tissulaire (ATG), des anticorps anti-endomysium (AAE) et des anticorps antigliadine (AAG) (**Aloulou et al., 2008**).

La prévalence de la MC dans le DT1 est significativement plus élevée. Dans les pays maghrébins, elle est liée à une fréquence élevée de la MC dans ces régions (**Boudraa et al., 1996**).

La MC ainsi que le DT1 sont étroitement liés au système HLA. Il a été démontré que les antigènes HLADR3 et HLAB8 sont présents chez 85 % des patients ayant l'association DT1-MC (**Petronzelli et al., 1993 ; Sollid et Thorsby, 1993**).

Le risque de MC parmi les enfants diabétiques est augmenté par la présence de HLA-DQB1*02-DQA1*05 (**Sumnik et al., 2006**).

4.2. Association entre diabète de type 1 et atteintes de la thyroïde :

L'hyperthyroïdie résulte de la stimulation des cellules thyroïdiennes par les anti-R-TSH et d'hypertrophie cellulaire (**Mayer et Orgiazzi, 2000**), tandis que la maladie de Hashimoto est due à la présence d'anticorps antithyroïdiens et le plus souvent d'une hypothyroïdie (**Dayan et Daniels, 1996**).

Ces maladies auto-immunes sont la conséquence d'une rupture de la tolérance centrale et périphérique du fait de facteurs génétiques tel que certains polymorphismes du gène CTLA4 et celui du CMH qui semblent être associés au risque de développer la maladie de Basedow ou la thyroïdite chronique auto-immune Hashimoto (**Vialettes et al., 1993 ; Vaidya et al., 2002**).

5. Facteurs de risques environnementaux du diabète de type 1

Ces trente dernières années, il a été remarqué une forte augmentation de l'incidence du diabète de type 1 (DT1) (**Green J et al. 2004**). Dans l'étude des jumeaux monozygotes, la concordance ne dépasse pas 40%, ceci démontre que la prédisposition génétique n'est pas seule responsable de l'apparition du DT1. Cela explique une forte implication de facteurs environnementaux dans le DT1 (**Rodier, 2001**).

5.1. Les infections virales :

Plusieurs virus ont été incriminés sans preuve formelle ; comme le virus Coxsackie B (CVB), les entérovirus, les oreillons, la rubéole, le cytomégalovirus, parvovirus et les rotavirus (**Wu et al. 2013**).

De nombreuses études ont révélé une association entre infection par entérovirus, plus particulièrement le virus Coxsackie B avec la survenue ultérieure d'un DT1 (**Hober et al. 1998**).

Chez les individus prédisposés au DT1, la réaction auto-immune contre les cellules bêta pourrait être initiée par un phénomène de mimétisme moléculaire entre les protéines virales et les structures de surface des cellules bêta (**Gorodezky et al., 2006**). Il existe des homologies séquentielles entre les virus Coxsackie B4 et l'enzyme GAD fortement exprimée par les cellules bêta, de sorte que théoriquement les cellules immunitaires dirigées contre les Coxsackie B4 pourraient ainsi attaquer les cellules Bêta. pour le moment, il n'existe aucune preuve expérimentale (**Gorodezky et al., 2006**).

D'autre part, une infection par entérovirus au cours de la grossesse pourrait être un facteur de risque du DT1 chez l'enfant. Des IgM anti-entérovirus et / ou l'ARN virale ont été recherchés au cours du premier trimestre de grossesse dans le sérum de 85 femmes dont l'enfant développé un DT1 avant l'âge de 15 ans, et de 172 femmes dont les enfants n'ont pas développé la maladie. (**Oikarinen et al., 2011 ; Dahlquist et al., 1995**).

5.2. Modalité d'allaitement

La composition protéique du lait de vache diffère de celle du lait humain par sa plus forte concentration protéique (en caséine), par la présence de β -lacglobuline, et par les séquences d'acides aminés de l'albumine et de l'insuline (**Harrison et Honeyman, 1999**).

Une corrélation positive entre la prévalence du diabète de type 1 et la consommation de lait de vache a conduit à émettre deux hypothèses : d'une part, l'introduction précoce de protéines du lait de vache, chez des sujets à risque génétique de diabète de type 1, pourrait constituer un facteur de risque ; d'autre part, un allaitement maternel suffisamment long (3 à 18 mois) pourrait protéger contre la survenue ultérieure d'un diabète de type 1 (**Knip et Akerblom, 1999**).

Des études ont montré que l'exclusion des protéines de lait de vache durant les six premiers mois de vie réduit la probabilité d'apparition d'auto-anticorps anti-cellules β chez

l'enfant à haut risque génétique. La physiopathologie de cette association n'est pas encore élucidée, néanmoins on a décelé la présence d'anticorps anti-albumine (BSA) chez des sujets diabétiques de type 1 et anti- β lactoglobuline qui semblent être liés au génotype HLA de classe II (**Harrison et Honeyman, 1999**).

5.3. Toxines

De nombreuses toxines principalement celles produites par les *Streptomyces* altèrent les cellules β et engendrent la diminution de la biosynthèse de l'insuline. Cette question a été étudiée in vitro en administrant des toxines en faible doses à des souris, il a été constaté des altérations de l'anatomie des îlots pancréatiques et de la sécrétion d'insuline (**Myers et al., 2002**).

5.4. Carence en vitamine D

La vitamine D est un élément essentiel pour le métabolisme des os et des minéraux mais joue aussi un rôle dans le métabolisme du glucose et les fonctions immunitaires (**Mathieu et al., 1994**).

Les cellules β sont altérées chez les animaux déficients en Vit D. la tolérance aux cellules β et à l'insuline sont restaurées quand le taux de la vit D redevient normal (**Mathieu et al., 1994**). Cela explique qu'une carence en vitamine D représente un facteur de risque pour le DT1, puisque la Vit D joue un rôle important dans l'homéostasie du glucose et la protection des cellules β contre les attaques immunitaires néfastes (**Baeke et al., 2009**).

Une étude récente, démontre que les LT CD4+ sont activés par le calcitriol (vitamine D active) indépendamment des M-DC. Lorsqu'il y a une carence en calcitriol, les cellules T régulatrices ou les LT CD4+ ne seront pas activés ni mobilisés lors de la réponse immunitaire (**Jeffery et al., 2009**).

D'autres études ont noté que le traitement des cellules β par la forme 1,25 (OH) 2D3 inhibait la sécrétion des protéines néfastes (les chimiokines) qui contribuent à la destruction des cellules β (**Gysemans et al., 2005**).

L'incidence de DT1 est réduite de manière significative avec des suppléments de vitamine D, soit chez les nourrissons à risque ou leurs mères pendant la grossesse (**The Eurodiab Substudy 1999, Bener et al., 2008**).

5.5. La théorie hygiéniste

La théorie hygiéniste suggère qu'un environnement trop propre et trop protégé grâce aux traitements par antibiotique et l'amélioration de l'hygiène de vie et aux meilleures conditions socio-économiques font diminuer l'exposition des enfants à de nombreux agents pathogènes se traduisant ainsi par un faible taux d'infections infantiles (**Bach, 2009**).

Cela va se traduire par une altération de la maturation du système immunitaire favorisant ainsi l'apparition de maladies auto-immunes, dont le diabète de type 1 (**Dubois-Laforgue, 2010**).

Une étude comparative entre la Lituanie et la Suède a montré qu'un contact précoce aux antigènes pourrait prévenir l'apparition du diabète auto-immun lors de la première année de vie réduisant le risque diabète infantile (**Lévy-Marchal et Daniel, 2007**).

Des études ont démontré que le développement du diabète chez les souris Non-Obese Diabetic (NOD) peut être empêché après une infection avec une variété de pathogène, tel que les mycobactéries et la chorioméningite (**Christen et al, 2004**).

5.6. L'hypothèse accélératrice

L'hypothèse de l'accélération du développement du diabète, développée par T. Wilkin, suggère qu'une prise de poids excessive entraîne une résistance à l'insuline (**Wilkin, 2001**).

Cette hypothèse suppose que les enfants ayant un indice de masse corporelle (IMC) élevé seront plus susceptibles de développer un DT1 car l'excès pondéral et alimentaire nécessite un fonctionnement accru de la cellule bêta qui pourrait déclencher la réponse auto-immune et induire son apoptose (**Wilkin, 2001**).

Le niveau de richesse d'un pays peut donc avoir un effet accéléré sur la croissance de l'enfant, ce qui constitue un facteur de risque invoqué de diabète infantile (**Dahlquist et Mustonen, 2000**).

L'auteur qui a émis cette hypothèse conclut que plus la fréquence de l'obésité des enfants augmente dans un pays, plus la prévalence du DT1 y augmente. Enfin, plus l'IMC d'un enfant est élevé, plus tôt se déclarera son DT1 (**Wilkin, 2001**).

Mais cette hypothèse n'est pas confirmée par les observations dans divers pays (**Betts et al, 2005**).

5.7. Les variations selon le sexe

Dans les populations jeunes, les filles et les garçons ont le même risque de développer le DT1 (le sexe ratio garçons/filles est de 1) (**Barat et Lévy-Marchal, 2013**).

Dans certaines populations, des différences d'incidence selon le sexe ont été décelées, ainsi les régions à forte incidence de DT1 (origine européenne) ont une prédominance masculine, alors que les régions ayant une faible incidence de DT1 (origine non-européenne) ont une prédominance féminine (**Barat et Lévy-Marchal, 2013**).

6. Le terrain génétique de susceptibilité au diabète de type 1

6.1. Predisposition génétique

Les facteurs génétiques sont mis en cause dans environ un tiers de la susceptibilité au diabète de type 1 (**Perlemuter et al, 2003**).

Chez l'homme, au moins 20 régions chromosomiques différentes ont été associées à la susceptibilité au diabète de type 1 (**Pociot et McDermott, 2002**). 6 à 10% des diabétiques de type 1 ont des antécédents familiaux au premier degré diabétique, soit une prévalence environ vingt fois supérieure à celle de la population générale (**Rodier, 2001**).

La principale région génomique contrôlant cette prédisposition familiale qui est de 40% est celle du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui code pour les glycoprotéines HLA (human leukocyte antigène) de classes I et II. Cette partie du génome, localisée sur le bras court du chromosome 6, joue un rôle central dans les réactions immunes (Figure 2) (**Simon D et al, 2009**). Plus de 90% des diabétiques de type 1 sont porteurs des allèles du CMH de classe II à haut risque : DQ2 sur les haplotypes DR3 ou DQ4 sur les haplotypes DR4 (**Dorman, 1997**). Par contre la région promotrice du gène de l'insuline (IDDM2) contribue pour 10% à ce risque (**Deloor-Demay, 2014**).

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 par rapport à la population générale (Deloor-Demay, 2014).

Les molécules DQB portant un acide aspartique à cette position (ASP 57+) ont un effet neutre ou protecteur sur le risque de diabète alors que celles qui portent un acide aminé autre que l'acide aspartique (ASP 57-) prédisposent à la maladie (Simon et al, 2009). La susceptibilité au DT1 serait liée à l'effet conjoint de plusieurs gènes CMH et non – CMH (**Rodier, 2001**).

Le risque pour une mère diabétique de type 1 d'avoir un enfant diabétique est d'environ 2 % alors que le risque est de 4 à 5 % lorsque c'est le père qui est diabétique insulino-dépendant (Grimaldi, 2000). Cette différence est expliquée non pas par un mécanisme génétique mais par une transmission d'anticorps protecteurs vis-à-vis du DT1 par le placenta puis par le lait maternel (**Simon D et al, 2009**).

6.2. Loci de susceptibilité héritée pour le diabète de type 1

Les gènes de prédispositions génétiques sont:

6.2.1. Le gène de Cytotoxique T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4).

Le gène CTLA-4 est considéré comme le troisième gène de susceptibilité du DT1 (Aldafari, 2011). CTLA-4 est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 de la famille des immunoglobulines exprimée à la surface des lymphocytes T CD85 et CD 4 (**Guetz et Blay, 2008**).

Le gène qui la code est composé de 4 exons situés sur le chromosome 2 du bras long bande 33 Chr.2q33 Chez l'homme (**Nistico et al, 1996**).

L'épissage alternatif du transcrit primaire peut produire deux sortes de protéines, soluble codée par les exons 1,2,4, sCTLA-4 au niveau duquel manque l'exon 3 qui code pour le domaine transmembranaire et une autre une protéine transmembranaire codée par exon 1-4, CTLA-4 (**Guetz et Blay, 2008**).

Cette molécule agit comme un régulateur négatif de l'activation lymphocytaire T en se liant au CD86 (B7-2) et CD80 (B7-1) des cellules présentatrices d'antigène et en induisant

l'nergie des lymphocytes T suite à l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la production d'IL-2 . Par conséquent, une anomalie dans l'expression de cette protéine favorise l'augmentation du nombre de lymphocytes T auto-réactifs (**Guetz et Blay, 2008**).

6.2.1.1. Polymorphisme du gène de CTLA-4 et diabète de type 1

En utilisant la PCR-RFLP ou la PCR allèle spécifique, des études d'association et de liaison ont actuellement confirmé la participation du polymorphisme A/G de l'exon 1 en position 49 du gène *CTLA-4* dans la prédisposition au diabète de type 1 (**Kamoun Abid et al., 2001**).

Cette mutation va causer une substitution de la thréonine par l'alanine au niveau du codon 17, mais jusqu'à aujourd'hui on ne sait pas encore si ce polymorphisme représente un marqueur indirect le diabète de type 1 ou bien s'il est la cause directe de ce diabète (**Nistico et al., 1996**).

D'autres études du dimorphisme du gène CTLA-4 chez les sujets diabétiques ainsi que chez les témoins qui ont été entreprises dans des populations géographiques et d'origine ethniques différentes montre que :

L'allèle CTLA-4/G est hautement associé à la prédisposition au diabète type 1 dans les populations Italienne, Espagnole, tunisienne , Française , Polonaise et Belge, par contre aucune association positive n'a été retrouvée en Chine, en Angleterre , et en Sardaigne (**Kamoun Abid et al., 2001**).

La plus part des études de génétique moléculaire sur le gène CTLA-4 ont porté sur les polymorphismes suivants :

- Le A/G+49 dans l'exon 1
- Le SNP CT-318 à partir du codon d'initiation ATG dans le promoteur.
- Et un autre SNP C/T819 dans l'intron 1 qui ont montré une association significative avec le diabète de type 1 plus que le A/G+49 et les microsatellites.
- La répétition de dinucléotides dans le 3'-UTR. Récemment (Alddafari, 2011).

6.2.2. Gène de l'insuline (INS)

L'insuline est sécrétée par la cellule bêta de Langerhans. Le gène INS de l'insuline est localisé sur la bande 11p15,5 entre les gènes IGF2 (insulin-like growth factor 2) et TH (tyrosine hydroxylase) (**Lucassen et al., 1993**). Il est constitué de 3 exons et 2 introns.

L'exon 2 code pour la chaîne B de l'insuline, une partie du peptide C et le peptide signal qui permet l'adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle subit des étapes de clivage et de modification de conformation. L'exon 3 code pour l'autre partie du peptide C et la chaîne A de l'insuline (**Stoy et al., 2010**).

6.2.2.1. Mutations génétiques et polymorphisme du gène de l'insuline

La majorité des altérations de ce gène est à transmission hétérozygote et constitue la 3^{ème} cause du diabète néonatal (**Stoy et al., 2007**) ; les mutations dominantes d'INS provoquent un diabète néonatal permanent DNNP dues à l'altération de la structure tertiaire des précurseurs de l'insuline, il dépend d'un processus protéotoxique suite à la production et à l'accumulation de ces précurseurs de conformation anormale entraînant un stress du RE et qui résulte une apoptose des cellules pancréatiques (**Stoy et al., 2007**).

Les mutations récessives du gène INS retrouvées dans la plupart des cas dans des familles consanguines (**Garin et al., 2010**). Ces mutations provoquent une mal expression de la protéine à l'état homozygote, il y aura une diminution de la synthèse de l'insuline par différents mécanismes: anomalie de la transcription, délétion du gène, mutations du codon initiateur ou altération de la stabilité de l'acide ribonucléique messenger [ARNm] (**Garin et al., 2010**).

La perte mono-allélique d'un allèle INS présente un facteur de risque de diabète jusqu'à l'âge de 50 ans (**Raile et al., 2011**).

L'expression de l'insuline au niveau du thymus est réglée par le nombre des variables à répétitions en tandem du VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) à l'extrémité 5' du gène de l'insuline. En effet, une diminution de l'expression thymique de l'insuline liée aux allèles VNTR de prédisposition peut être la cause de la génération de nombres élevés des LT auto-réactifs qui sont spécifiques à l'insuline (**Vafiadis et al., 1997**).

En 1984, pour la première fois une étude cas-témoin a démontré une association génétique entre le diabète de type 1 et une région du gène de l'insuline localisée à l'extrémité 5' dénommée VNTR (Bell GI et al, 1984). Elle est due à la répétition en tandem d'un nombre variable de 14 pb (ACAGGGGTSYGGG), qui se localise à environ 600 pb du site d'initiation de la transcription de l'insuline (**Lucassen et al., 1993**)

En effet, le VNTR a la capacité d'altérer la structure de la chromatine en 5' du gène, modifiant ainsi l'accessibilité de ces régions aux molécules régulatrices de l'expression génique (**Bennett et al., 1995 ; Kennedy et al., 1995**).

Different polymorphismes ont été étudiés tel que le SNP -23HphI, également dénommé un polymorphisme de minisatellite, situé dans la 365ème pb en dehors des séquences codantes, en amont de gène de l'INS (**Barratt et al., 2004**).

les études de Lucassen et Julier (1993) ont montré l'existence de mutations ponctuelles en amont et dans le gène de l'insuline ; dont certaines sont fréquentes chez les sujets diabétiques de type 1 (**Lucassen et al., 1993**).

L'interaction entre HLA et le facteur de susceptibilité localisé dans la région du gène de l'insuline à cause du risque accru conféré par cette région chez les diabétiques de type 1 porteurs du déterminant HLA-DR4 comparés aux autres mais cette interaction n'a pas été trouvée dans d'autres populations de diabétiques de type 1 (**Lucassen et al., 1993**).

Les résultats d'analyse des transmissions des allèles de l'insuline des parents hétérozygotes dans les familles multiplex ont rapporté ~~découvert~~ un excès de la transmission des allèles à 2 marqueurs, l'insuline VNTR 5' et un RFLP Pst I, spécifiquement aux individus affectés DR4+ (**Lucassen et al., 1993**).

6.2.3. Les gènes HLA.

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

Cette région développe une forte densité de gènes, dont la caractéristique est le déséquilibre de liaison, les allèles de loci voisins étant transmis en haplotype, 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 déterminé 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 (Figure 1) (Al Youssef, 2006).

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

Les gènes de classe II, sont localisés au niveau de centromère 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 (Al Youssef, 2006) (figure 1).

Ces gènes comprennent principalement 3 familles de gènes (Figure 1) : DR, DP, DQ qui code pour trois molécules portées par la membrane cellulaire des lymphocytes T et macrophages (Al Youssef, 2006).

La région de classe II contient 23 à 25 pseudo-gènes ou gènes . Les gènes DRA, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 sont fonctionnels et produisent, selon les haplotypes les 3 ou 4 molécules de classe II. 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 porte de nombreux gènes codant des produits impliqués dans des phénomènes immunitaires tel que « facteurs de nécrose des tumeurs » $TNF\alpha$ et $TNF\beta$, les composants du complément, les transporteurs de peptides TAP1 et TAP2. (Figure 1) (Al Youssef, 2006).

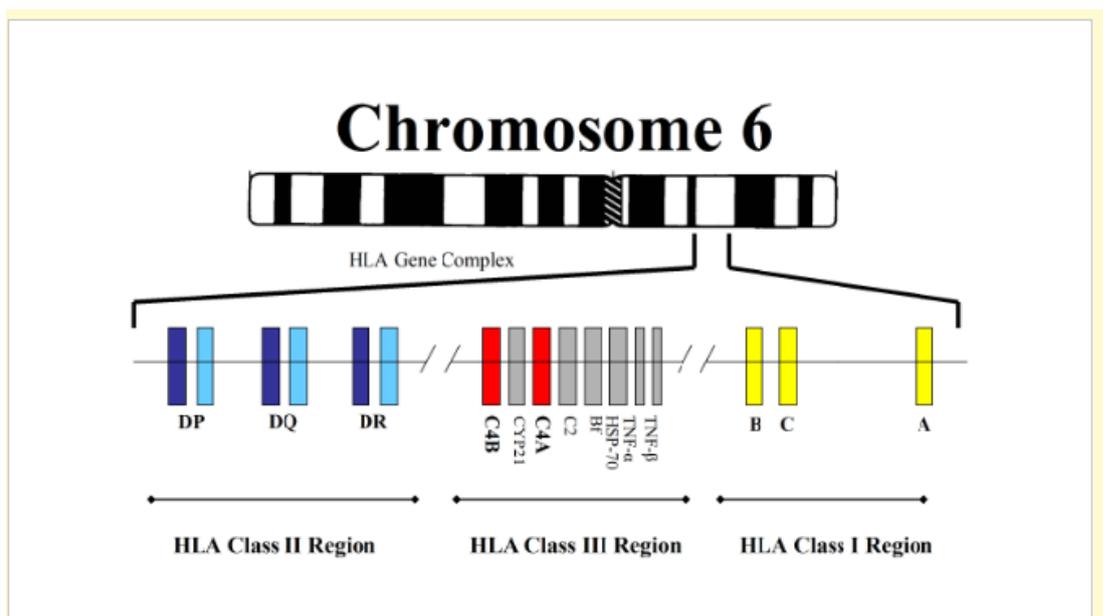


Figure.1. Carte simplifiée des gènes de la région HLA. https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=0ahUKEwjuafKz_PiAhVM8OAKHdIKDCgQMwhHKAMwAw&url=https%3A%2F%2Fwww.intechopen.com

6.2.3.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité et le diabète de type 1

L'Analogie entre le diabète insulino-dépendant et Le complexe majeur d'histocompatibilité HLA a été mise en évidence en 1974, Les premières études ont montré une fréquence accrue de personnes ayant un groupe HLA B8 et A1 parmi les diabétiques (**Degos, 1990**), ainsi dans les années 1970, les études de populations et de familles réalisées par des méthode sérologiques ont permis de montrer une association positive avec les spécificités HLA de classe I (B8 et B18). Par contre, une résistance conférée par la spécificité B15 (**Svejgaard et al., 1982**).

La découverte d'anticorps reconnaissant des spécificités de classe II a permis d'entamer le polymorphisme de classe II. Ainsi, les spécificités DR3 et DR4 ont été retrouvées considérablement augmentées chez les diabétiques de type 1 par rapport aux sujets témoins (90 % sont desDT1, 30 % des témoins) et, plus particulièrement, la combinaison

hétérozygote DR3/DR4 témoignant d'un effet synergique des deux spécificités (**Froguel et Passa, 1991**).

Par contre, la spécificité DR2 était reconnue comme conférant une résistance à la pathologie (**Coutant et Bougnères, 1995**). Mais les associations qui caractérisent

les populations caucasiennes n'ont pas été retrouvées chez les Africains qui sont susceptibles au diabète de type 1 qui est associé à DR7 et DR9, ni chez la population Asiatique (DR4 et DR9) (**Danze et al., 1997**).

Grâce à la cristallographie on a démontré 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**).

Chez les sujets diabétiques, l'acide aminé en position 57 est soit une sérine, valine ou alanine qui n'interagissent pas avec l'arginine de la chaîne α . ce qui rend la molécule du CMH II instable et pourrait entraîner délétion des lymphocytes T auto-réactifs (**Croxford et al., 2006**) (Figure2).

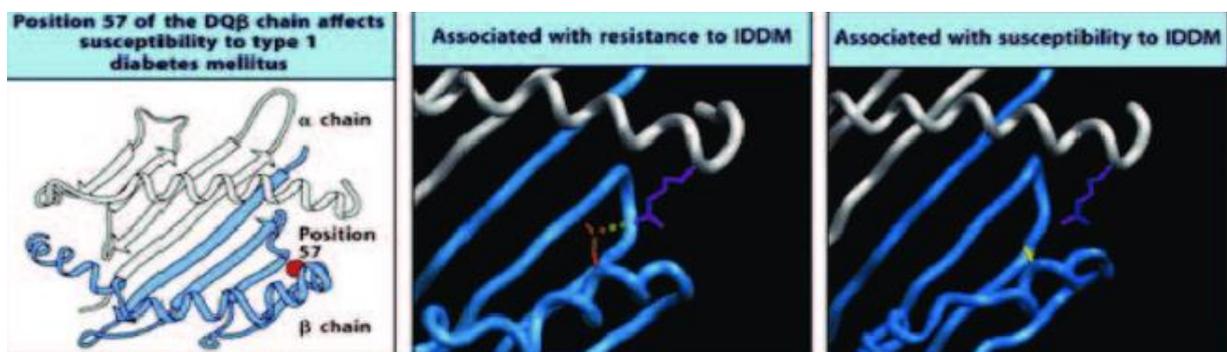


Figure.2. Association entre T1D et HLA chez l'homme. Répartition des différents allèles du HLA-DR (CMH II) chez des patients sains ou T1D. (B) Le polymorphisme d'un acide aminé du HLA-DQ est associé à la résistance ou la susceptibilité au T1D. Rouge : Asparagine en position 57 de la chaîne β , Violet : Arginine en position 76 de la chaîne α , Vert : liaison électrostatique, Jaune : Alanine. Image issue de Janeway's Immunobiology (7^{ème} édition, figure 14.34 et figure 14.36)

Objectif de l'étude

Notre étude (cas –témoins) se fixe un double objectif d'étudier le DT1, en explorant un volet épidémiologique et un volet génétique.

Dans le premier volet nous nous sommes intéressés à recueillir les données nécessaires, afin de décrire notre population d'un point de vue épidémiologique pour identifier les principaux facteurs de risque du DT1 et les agents qui pourraient conférer une protection contre la maladie, ce qui permettra par la suite de développer des recommandations et des stratégies préventives à la fois à l'échelle individuelle et collective, afin d'empêcher le déclenchement ou la progression du processus auto-immun et préserver ainsi les cellules β pancréatiques d'une élimination totale.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes fixés pour objectif, de contribuer à l'étude génétique du DT1, en réalisant des prélèvements qui ont servi à la constitution d'une bio-banque d'ADN, que nous allons utiliser par la suite pour les analyses de biologie moléculaire, afin d'identifier les marqueurs génétique de susceptibilité et de protection associés au DT1 dans la population de Tlemcen, en mettant en évidence les éventuelles associations qui pourraient exister entre les marqueurs génétiques étudiée et le DT1.

Matériel et Méthodes

1. Le type d'étude

La réalisation de ce travail repose sur une étude épidémiologique de type cas-témoins.

1.1 La population étudiée

Notre population d'étude (cas-témoins) est composée d'enfants et d'adolescents recrutés entre le 19 Mars et le 4 Mai 2019 au niveau du laboratoire d'analyse de l'EPH de Sebdo.

Au total, un échantillon de 37 sujets a été constitué, répartis en 10 sujets diabétiques et 26 témoins sains, âgés entre 02 et 19 ans a été constitué. Le ratio H/F est de 0.43.

Le consentement éclairé des parents a été recueilli.

2. Les facteurs d'inclusion et d'exclusion chez les cas :

❖ Facteurs d'inclusion :

Sujets des deux sexes âgés entre 0 à 19 ans qui présentent le diabète de type1.

❖ Facteurs d'exclusion :

Sujets ayant une forme de diabète autre que le diabète de type1.

Les refus de participation.

3. Les facteurs d'inclusion et d'exclusion chez les témoins :

❖ Facteurs d'inclusion :

Sujets des deux sexes âgés entre 0 à 19 ans ne développant pas un diabète de type 1-

❖ Facteurs d'exclusion :

Sujets ayant refusé de participer à l'étude.

4. Questionnaire et collecte des données

Le recueil des données a été réalisé par l'interrogatoire des sujets et de leurs parents via un questionnaire préétabli.

La standardisation du questionnaire a été prise en considération pour tous les patients diabétique et les témoins de telle manière à pouvoir dresser une similitude des données et faire la comparaison entre les deux sous populations, dans le but de connaître les facteurs réels de risque pouvant engendrer le déclenchement de cette affection.

Chaque questionnaire renferme un code spécifique pour le sujet, la date du prélèvement. L'étiquetage des tubes de prélèvement a été soigneusement effectué en mentionnant le nom, prénom et code pour chaque sujet.

5. Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins des sujets ont été réalisés par des professionnels de la santé au niveau de la veine du pli du coude, ou par la veine jugulaire pour les nourrissons. 2 à 5 ml de sang ont été collectés selon l'état de santé du patient et son âge.

Les tubes EDTA ont été utilisés car l'EDTA est un anticoagulant et inhibiteur des nucléases par séquestration des ions magnésium Mg^{2+} bloquant ainsi leurs activités et de ce fait, on obtient de l'ADN intact permettant la récolte d'une banque d'ADN.

6. Extraction de l'ADN

Dans notre étude nous avons utilisé deux techniques d'extraction d'ADN :

6.1. Extraction de l'ADN par la technique NaCl (salting out)

L'absence du risque de toxicité induit par des produits dangereux tels que le phénol a motivé notre choix pour cette technique, qui comporte les étapes suivantes :

6.1.1. Etapes de la technique d'extraction NaCl

6.1.1.1. Lyse des globules rouges

Le sang initialement décongelé puis mélangé à une solution hypotonique TE10/10(Tris/HCl10mM, EDTA 10mM ;pH=80). Les tubes sont mis dans la glace pendant 30 minutes (l'action conjuguée du Tris et du froid provoque un choc hypotonique qui éclatera la membrane des globules rouges ensuite centrifugés à 2500 tours/mn pendant 15 mn deux fois de suite. On élimine avec précaution le surnageant. On répète le lavage en centrifugeant à 3000 tours pendant 15mn jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre correspondant aux globules blancs dépourvu de globules rouges.

6.1.1.2 Lyse des leucocytes

Au culot des globules blancs, on ajoute 5ml de solution de lyse de globules blancs (Tris/HCl 10mM, EDTA 0,1M et SDS 0,5% ;pH=8,0) et 125µl de protéinase K qui digère les protéines associées à l'ADN nucléaire. Après homogénéisation, les tubes sont mis dans un récipient contenant de l'eau pour être incubés dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

Par l'action combinée de l'anticoagulant EDTA (inhibiteur de l'activité des nucléases) et celle de SDS qui est un puissant détergeant lysant les membranes cellulaires et dissociant ainsi les acides nucléiques.

6.1.1.3. Précipitations des protéines

Pour chaque tube, on additionne 2ml de NaCl 5M et on mélange vigoureusement. Après une centrifugation de 3900 tours pendant 12 minutes, on obtient un culot contenant les débris cellulaires, protéiques et le surnageant contenant l'ADN, ce dernier est récupéré dans les tubes à essais.

6.1. 1.3. Précipitation de l'ADN

On ajoute pour chaque tube, deux volumes d'éthanol absolu froid. On laisse l'ADN se précipiter par agitation douce en retournant délicatement le tube jusqu'à ce que le filament d'ADN forme une méduse.

On procède à un lavage de la méduse d'ADN à l'éthanol absolu afin d'éliminer les traces de sels pour la sécher par la suite sous lumière U.V puis on récupère l'ADN dans un tube Eppendorf.

6.1.1.4. Dissolution de l'ADN

On a administré 200 à 500µl de TE10/1(Tris/HCl 10mM et EDTA 1mM ;pH=8,0) selon la taille de la méduse pour dissoudre cette dernière. Pendant 24h, les tubes seront conservés à une température ambiante, ensuite à 4 °C pour quelques jours; à -20°C pour plus de 10 ans.

6.2. Extraction de l'ADN par la technique par des kit WiraGen® :

L'extraction par cette technique semi-automatisée, est réalisée conformément au protocole fourni par le fabricant

6.2.1. Description de la technique :

Le kit d'ADN génomique fournit un moyen simple et pratique pour isoler l'ADN génomique de haute qualité de 5-250 UL de sang frais ou congelé. Le sang entier est incubé avec le tampon de lyse pour libérer l'ADN. L'ADN est lié à la colonne à base de silice. L'ADN isolé est approprié pour faire une PCR, digestion par enzyme de restriction et southern blot.

- Simple et rapide, sans la nécessité du tampon de lyse des globules rouges.
- Elimination complète du contaminant et d'inhibiteur.
- Rendement de 40 ug d'ADN.
- Purification à base de colonne, pas d'extraction organique ni de précipitation à l'éthanol.
- Convient pour EDTA, citrate de sodium, heparine-anticoagulé frais ou congelée dans un

volume de 5 à 250ul

1- Ajouter le volume approprié de sang, 20 U1 de la Protéinase K et 500U1 du BB5 dans un tube de micro centrifugation.

Vortexer pendant 15min puis l'incuber dans une chambre à température ambiante pendant 10 min

2- Centrifuger brièvement, ajouter tous le lysat à la colonne de spin. Centrifuger le tube à 12.000 xg pendant 1 min, puis éliminer le surnageant.

3- Ajouter 500U1 de CB5 (s'assurer que l'éthanol a été ajouté), centrifuger le tube à 12.000xg pendant 30 scd puis éliminer le surnageant.

4- Ajouter 500U1 de WB5 (s'assurer que l'éthanol a été ajouté), centrifuger le tube à 12.000xg pendant 30 scd puis éliminer le surnageant.

5- Répéter la 4ème étape encore une fois.

6- Mettez la colonne de spin dans un tube de recouvrement, centrifuger la colonne vide à 12.000xg pendant 2min pour enlever tout résidu WB5.

7- Sécher à l'air la colonne de spin dans un tube de microcentrifugation Stérile 1,5 ml, ajouter 50-200µl de Elution Buffer(pour un rendement plus élevé, Préchauffer le Buffer à 60°C) ou l'eau distillé (PH sup 7.0) au centre de la colonne.

Incuber dans une chambre à température ambiante pendant 1min. Centrifuger à 12.000xg pendant 1min pour éluer l'ADN génomique (pour récupérer plus d'ADN, ajouter l' EB ou de l'eau distillé).Pour un stockage de longue durée, stocker l'ADN purifié à -20°C

6.3. Dosage de l'ADN

La méthode de spectrophotométrie est utilisée pour quantifier l'ADN en mesurant la densité optique à la longueur d'onde de 260nm pour des solutions diluées au 1/100 (20µl de l'échantillon, 1980 µl d'eau distillée). Sachant que l'ADN a un spectre d'absorption en U.V maximum à 260 nm, ce spectre d'absorption est proportionnel à la concentration de l'ADN.

1 unité DO à 260nm \longrightarrow 50 µl d'ADN double brin.

$[ADN]=DO\ 260*\text{facteur de dilution}*50ng.$

Afin de déterminer une éventuelle contamination par les protéines, la deuxième lecture est effectuée à une longueur d'onde de 280 nm.

Pour identifier la pureté de l'ADN, le rapport de DO 260nm/280nm est calculé. Cette valeur doit être comprise entre 1,5 et 2. Si elle est inférieure à 1,5 cela indique que une contamination par les protéines et si elle est supérieure à 2 d'une contamination par les sels.

6.4. Analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) des fragments d'ADN obtenue par PCR (Polymérase Chain Reaction-)

6.4.1. Le Principe de la PCR

Cette technique conçue par Kary Mullis en 1985 est une réaction qui permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné à partir d'un échantillon peu abondant, pour pouvoir l'étudier et le détecter.

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

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

- a) Il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin.
- b) Borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques.

- c) Réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

6.4.2. Condition de PCR de HLA DR3 et DR4

❖ Dans un volume final de 25µl :

1,5 picomoles d'amorces, 1 unités de taq, MgCl₂ à 1.5mM, 5 picomoles de DNTP ,1X de tampon, 20 ng de l'ADN, et on complète à 25 ul avec de l'eau.

Tableau 1. Amorces utilisées pour la PCR et leurs séquences nucléotidiques.

Amorces utilisées	Séquence nucléotidique
Sens	5' CGGGTGCGGTTCTGGACAGATACTTCGAT 3'
Antisense	5' CGCTGCACTGTGAAGCTCTCCACAACCCCGTAGTTGTGTCTG CACTAG 3'

❖ 35 cycles de :

- Dénaturation à 95° pendant 20 sec

- Hybridation à 55° pendant 20 sec

- Elongation à 72° pendant 30 sec

❖ **Test d'amplification :**

8 µl de l'amplimère est déposé dans un gel d'agarose à 1.5%, le produit d'amplification à une taille de 213 pb.

6.4.3. Principe de la RFLP

Pour la détection de l'allèle DR4 un appariement C/G au niveau du codon 32 est introduit au niveau de l'extrémité 3' de l'amorce afin de créer un site de restriction pour l'enzyme *Sau* 3A1 qui reconnaît la séquence GATC présente uniquement au niveau de l'allèle DR4+ (**Horton et al., 1995**).

Pour la détection de l'allèle DR3+, l'appariement G/C est introduit délibérément au niveau de l'extrémité 3' de l'amorce pour créer un site de restriction ACTAGT reconnu par l'enzyme *Spe* 1. L'utilisation d'une troisième enzyme *Dde* 1 demeure nécessaire pour digérer le pseudogène DRB7 qui renferme le même site de restriction que DR3+ (**Horton et al., 1995**).

Pour les deux allèles, si l'électrophorèse génère deux fragments, cela indique la présence de l'allèle DR+, alors qu'un seul fragment indique l'absence de cet allèle (**Horton et al., 1995**).

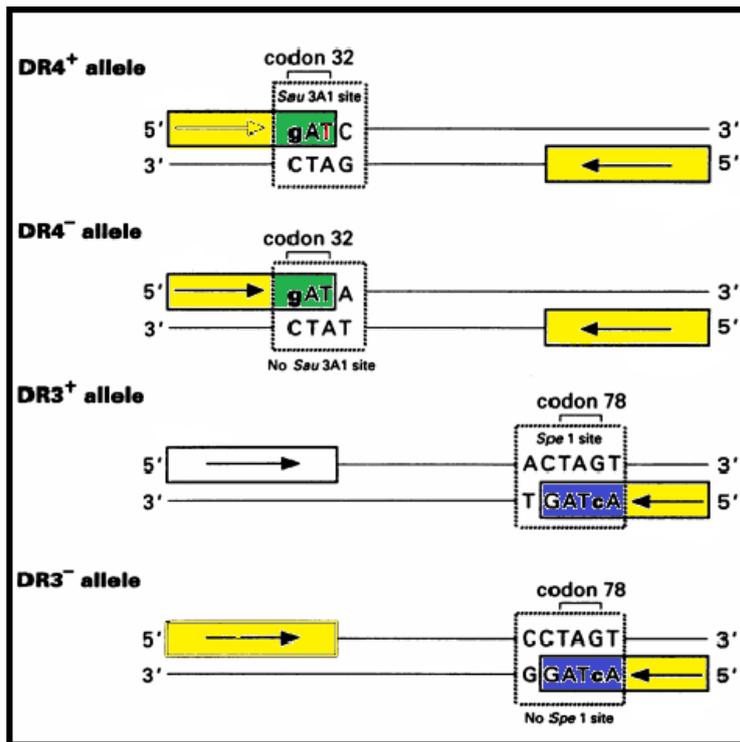


Figure.3. principes de la technique RFLP pour détecter les allèles DR4 et DR3 (Horton et al., 1995)

6.4.4. Protocole de la RFLP

12 ul du produit PCR est digéré dans un premier temps par 20 unités de *Spe* 1 (Boehringer Mannheim) et *Dde* 1 (New England Biolabs, Beverley, Massachusetts, USA) dans un volume de 15ul pendant 2 heures à 37°C; 12 ul du produit de cette réaction est ensuite digéré avec 20 unités de *Sau* 3A1 (New England Biolabs) dans un volume de 15ul 2 heures à 37°C.

Révélation dans un gel d'agarose à 3.5% à 90V pendant 1h (un marqueur de taille 200 base pair)

DR3=164 pb

DR4= 186 pb

7. L'analyse statistique

La première démarche statistique consiste à caractériser les populations cas et témoins en décrivant leur composition selon l'âge et le sexe. L'âge est une variable quantitative qui a été exprimée en moyenne (M) \pm déviation standard (DS).

Toutes les données ont été décrites par la moyenne et l'écart type pour les variables quantitatives et par le nombre d'observation ainsi que le pourcentage pour les variables qualitatives. La comparaison de la distribution des variables entre les deux populations a été effectuée à l'aide du test d'homogénéité du Khi2 (X²) de Pearson.

L'évaluation de l'association des facteurs de risque et des paramètres étudiés avec le risque de développer le DT1 a été réalisée par l'utilisation du modèle de régression logistique simple. Dans la régression logistique, l'évaluation de l'influence de ces facteurs est déterminée en calculant l'odds ratio (OR) de chaque facteur avec un intervalle de confiance (IC) fixé à 95%. L'OR est une mesure statistique qui permet d'estimer l'association en comparant la distribution des facteurs de risque du groupe « patient » et du groupe « témoin ». Un effet protecteur se traduit par un OR compris entre 0 et 1 ; si l'OR est supérieur à 1, le facteur étudié est prédisposant. L'association est jugée statistiquement significative lorsque l'intervalle de confiance à 95 % de l'OR ne comporte pas la valeur 1. Les résultats sont considérés significatifs lorsque la valeur de la probabilité p (valeur p) est égale ou inférieure à 0,05 ($p \leq 0,05$).

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Excel/2007 et MINITAB/version 16.

Résultats

Tableau 2 : Les variables propres à la description de la population (Cas/ Témoins)

Variables descriptives		Cas	Témoins	P-value
Age		12,40 ± 5,04	8,54 ± 5,14	0,100
Sexe	Femme	7(70%)	14(58%)	0.103
	Homme	3(30%)	10(42%)	
Csg	Oui	7 (70%)	10(42%)	0.003
	Non	3(30%)	14(58%)	
IMC Kg/m ²		20,89 ± 6,22	20,18 ± 7,03	0,773
Glycémie g/L		2,83 ± 1,35	0,871 ± 0,100	0,001
Urée g/L		0,380 ± 0,328	0,2796 ± 0,0589	0,362
Créatinine mg/L		10,32 ± 7,99	7,49 ± 1,31	0,295

Cholestérol g/L		1,662± 0,323	1,563± 0,222	0,392
HbA1c (%)		8,03 ± 1,12	5,197 ± 0,721	0,000
Allaiteme	Oui	06 (60%)	17(65%)	0.106
	Non	04 (40%)	09(35%)	

Notre étude s'est basée sur l'analyse des paramètres rapportés par les questionnaires renseignés auprès des 36 sujets participants à l'étude, 10 questionnaires ont été recueillis auprès de sujets diabétiques et 26 concernaient des sujets sains.

1. Les variables propres à la description de l'échantillon

Les résultats de l'analyse descriptive sont résumés dans le tableau 2.

1.1. Zones d'étude

Les témoins et les cas participant à l'étude ont été recrutés dans la région de Sebdu .

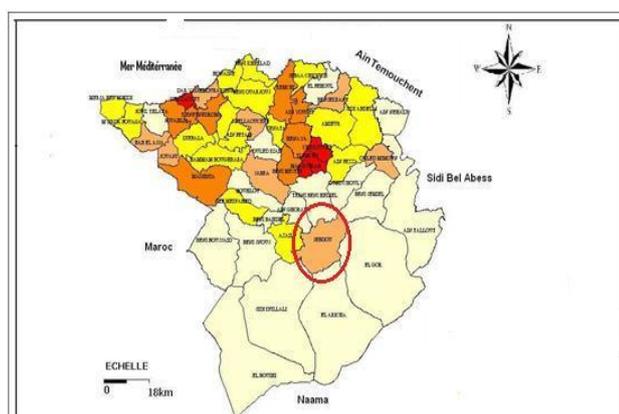


Figure 4 : carte géographique de la wilaya de Tlemcen region de Sebdu.

<https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=0ahUKEwj3o6C3fHiAhWLYoUKHVdAC->

1.2. Age et sexe

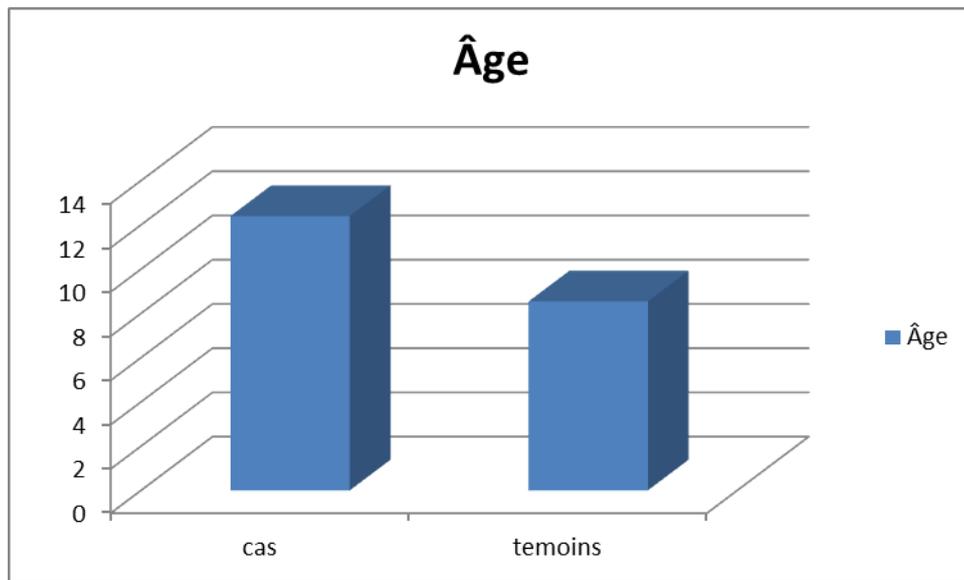


Figure 05 : Répartition de la population selon le statut âge .

Dans notre enquête, l'âge moyen des diabétiques est de 12 ans avec des extrêmes allant de 7 ans à 17 ans ; celui des témoins est de 8 ans et demi avec des extrêmes allant de 3 ans à 13 ans **Figure 05**. La différence d'âge comparée entre les cas et les témoins n'est pas significative ($P= 0,100$) **Tableau 2**.

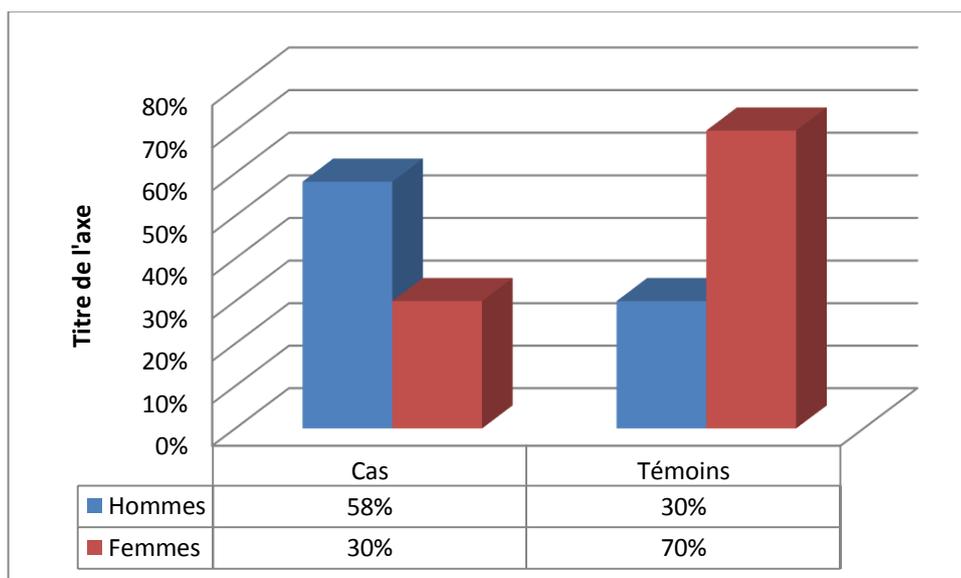


Figure 06: Répartition de la population selon le statut sexe.

Dans la population générale, la répartition des sexes, est de 53% de sujets de sexe masculin et 47 % de sujets de sexe féminin.

On a 14 sujets témoins de sexe masculin soit 58% contre 9 sujets de sexe féminin soit 37%.

Le nombre de sujets diabétiques de sexe masculin s'élève à 3 soit 30% contre 7 sujets de sexe féminin soit 70%.

En comparant entre les cas et les témoins on constate qu'il y a 14 sujets non diabétiques de sexe masculin soit 58% contre 03 sujets diabétiques soit (30%) et 9 sujets non diabétiques de sexe féminin soit 37% contre 07 sujets diabétiques (70%)

Figure 06.

La différence de sexe entre les cas et les témoins n'est pas significative statistiquement puisque le P-value est de l'ordre de 0.103 **Tableau 2.**

1.3. Consanguinité

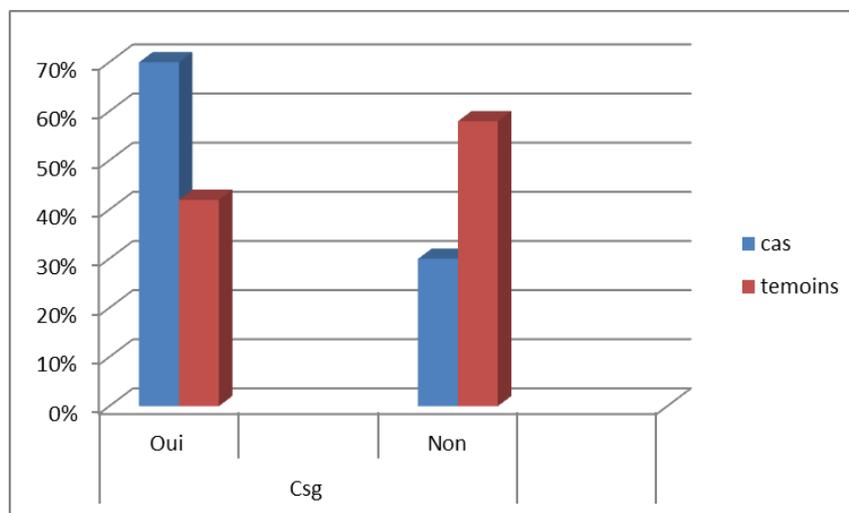


Figure07: histogramme de consanguinité dans la population.

Notre population d'étude présente un taux de consanguinité de 50%.

La fréquence des sujets diabétiques issus d'une famille consanguine est nettement supérieure à celle des sujets témoins (70% contre 41%) **Figure07.**

.Mais cette différence est significative car le p-value est de l'ordre de 0.003 bien inférieur à $p=0,05$ **Tableau 2**.

1.4. IMC Kg/m²

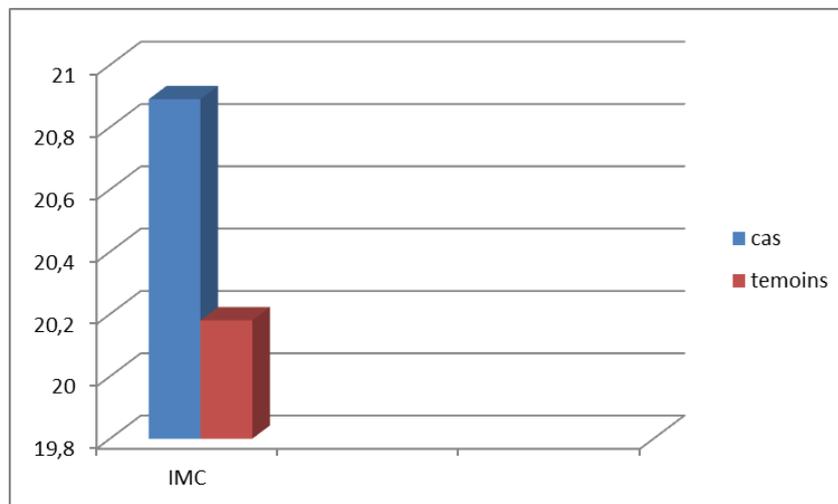


Figure08: histogramme d'IMC dans la population.

En matière d'IMC, on constate une légère différence entre les cas (20.89) et les témoins (20.18) dans notre population d'étude **Figure08**. Mais cette différence n'est pas significative car le p-value est de 0,77 bien supérieur à $p=0,05$ **Tableau 2**.

1.5. Les paramètres du Bilan biologique

Dans cette population d'étude, nous avons réalisé des dosages pour des paramètres biologiques (glycémie, urée, créatinine, cholestérol, hémoglobine glyquée) au niveau du laboratoire de l'EPH de Sebdo.

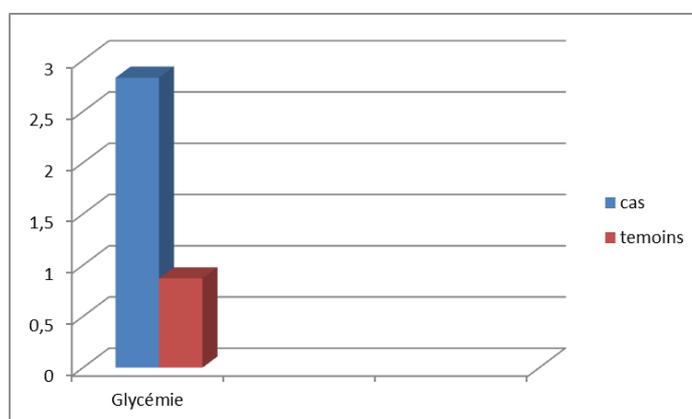


Figure09: histogramme de Glycémie dans la population.

La moyenne de la glycémie est supérieure dans la population diabétique $2,83 \pm 1,35$ par rapport à celle des témoins $0,871 \pm 0,100$ **Figure09**. Avec une P-value significative d'ordre 0.001 inférieur à $p=0.05$ **Tableau 2**.

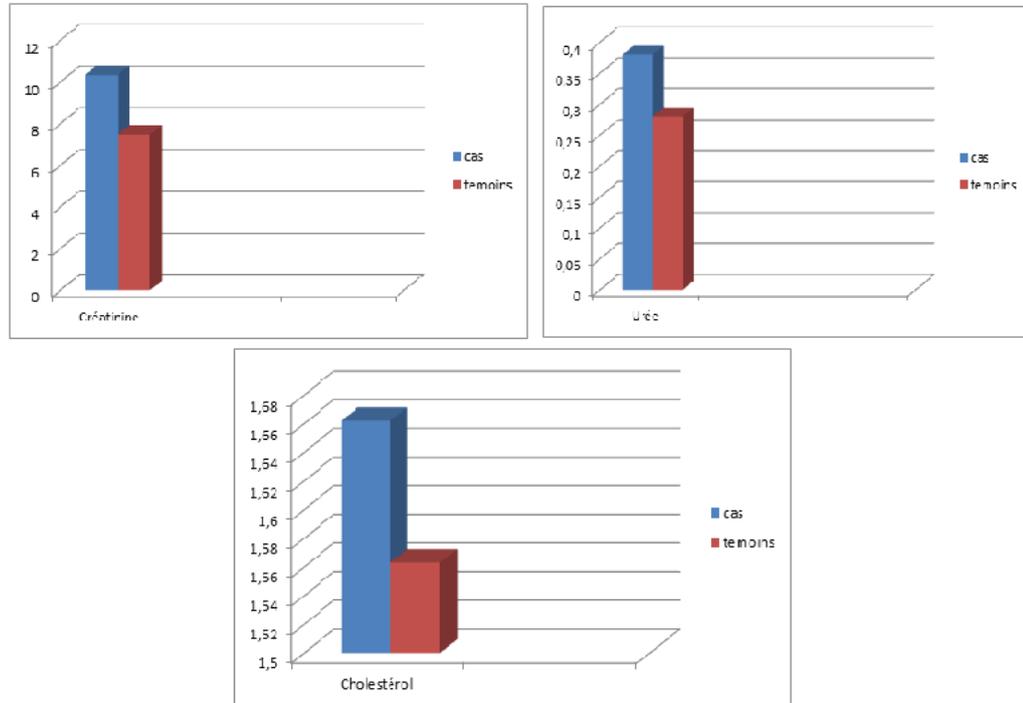


Figure10: histogrammes des paramètres du bilan biologique dans la population.

En comparant entre les moyennes des paramètres biologiques (urée, créatinine, cholestérol) on constate qu'il existe une différence **Figure10** mais cette différence reste statistiquement non significative puisque les P-value sont bien supérieur à $p=0,05$ **Tableau 2**.

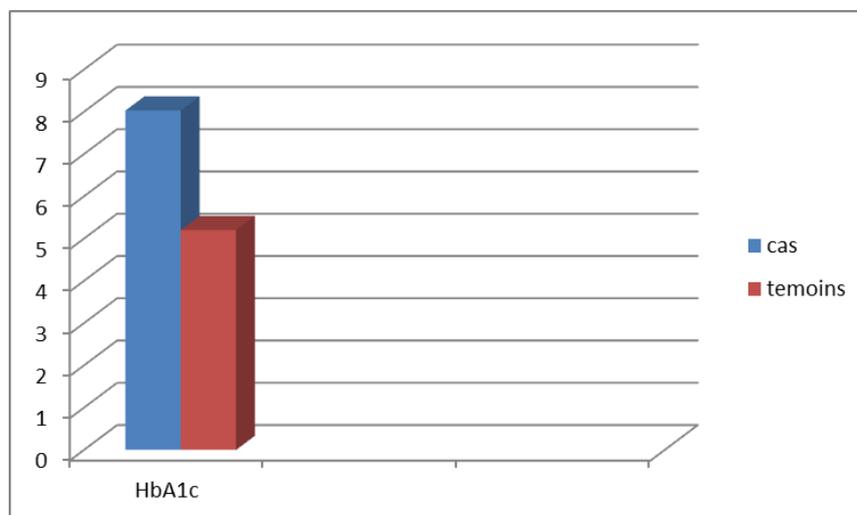


Figure11 : histogramme de HbA1c dans la population.

La moyenne de l'hémoglobine glyquée est inférieure chez les sujets non diabétiques $5,197 \pm 0,721$ par contre chez les cas on a noté une moyenne de $8,03 \pm 1,12$ **Figure11**. La différence observée entre les cas et témoins est significative car le P-value est de 0.000 **Tableau 2**.

2. Analyse multi variée :

2.1. Analyse des composantes principales (ACP) :

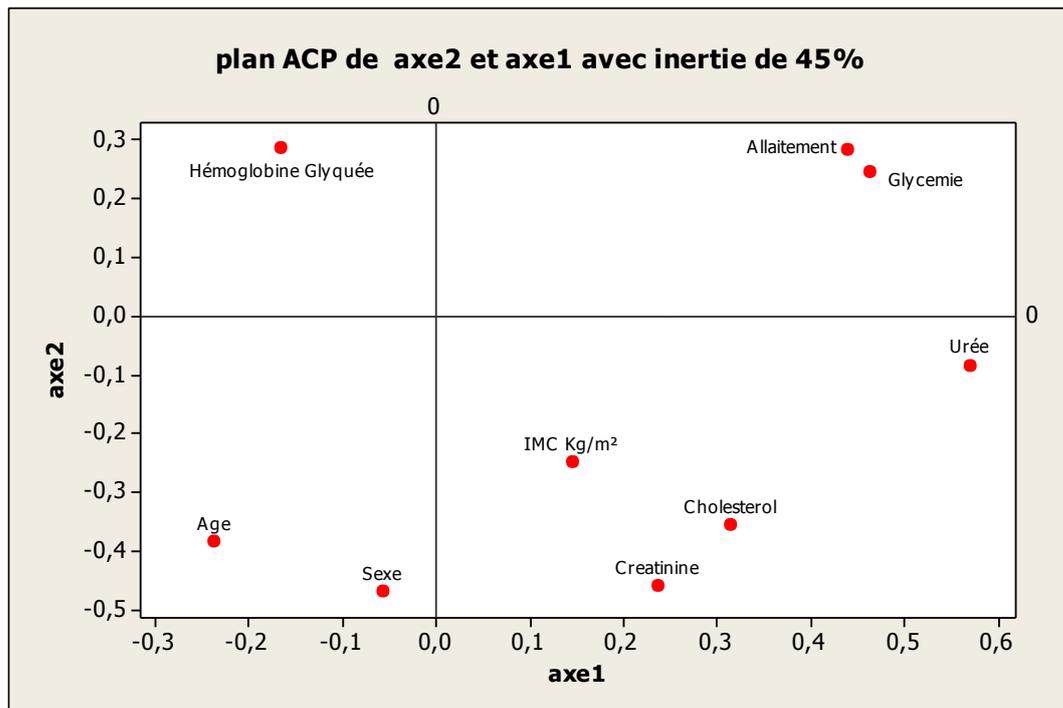


Figure12 : Plan ACP chez les témoins

Le plan ACP axe 1- axe 2 avec inertie 45% **Figure12** montre une très forte liaison entre la glycémie et le type d'allaitement chez les témoins, ce groupe s'oppose fortement avec l'âge et le sexe, il s'oppose aussi avec l'hémoglobine glyquée, l'IMC, l'urée, le cholestérol total et la créatinine.

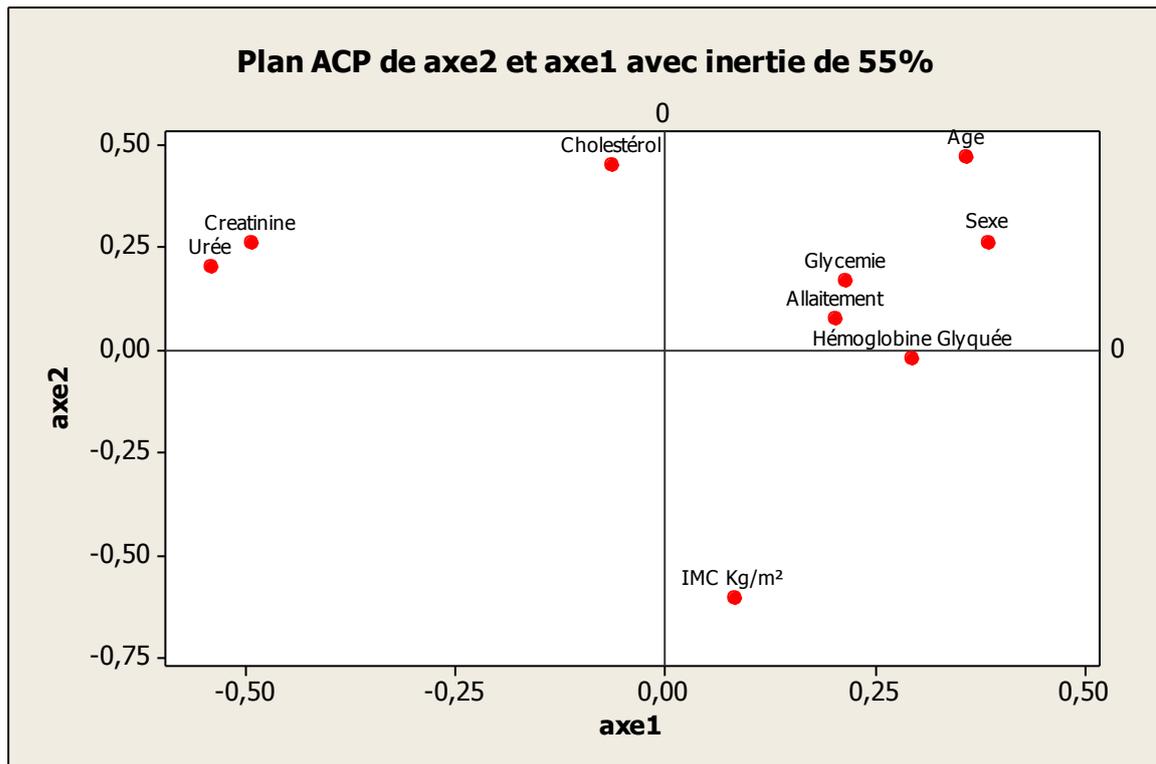


Figure13 : Plan ACP chez les cas

Chez les patients diabétiques de type 1, le plan ACP axe 1-axe2 inertie 55% **Figure13** montre que la glycémie est très fortement liée au type d'allaitement, ces derniers sont liés au sexe et à l'âge, s'opposent légèrement avec l'hémoglobine glyquée, alors il s'oppose avec l'IMC, le cholestérol total, l'urée et la créatinine.

3. Résultats de l'analyse logistique

Tableau3. Résultats de l'étude du modèle de régression logistique.

Prédicteurs		Z	Odds de Ratio	Seuil de signification (P-value)
Consanguinité		1.59	3.63 IC (0,66 ; 15,30)	0.022
Degré de consanguinité		1.59	4.63 IC (0,74 ; 17,81)	0.112
Antécédents familiaux de DT1		2 .84	14.40 IC (2,29 ; 90,60)	0.004
Allaitement		-1.70	0.46 IC (0,02 ; 1,24)	0.008
IMC	<18.5	-0.83	0.14 IC (0,09 ; 2,64)	0.088
	> 24.99	0.39	1.80 IC (1,80 ; 35, 12)	0.699
	> 29.99	-0.08	0.90 IC (0,90 ; 12,58)	0.938
Sexe		1.29	3.00 IC (0,57 ; 15,90)	0.19

La régression logistique retient le facteur consanguinité ($p=0,02$, $OR=3.63$) et les antécédents familiaux de diabète de type I ($p=0,02$ $OR=14.40$). En revanche, l'allaitement ($p=0.008$, $OR=0.46$) semble conférer une protection contre le DT1

L'étude de la régression logistique pour le paramètre IMC a été réalisée après différentes stratifications (<18.5, > 24.99 et > 29.99), ce pendant les valeurs des p

values obtenues reste non significatives, elles varient de 0.08 à 0.94, cependant pour le groupe IMC<18.5, la valeur de l'odds ratio obtenu est de 0.14 avec une p value de 0.08, suggérant l'existence d'une tendance vers la significativité.

De la même manière, les résultats obtenus pour le paramètre sexe, donnent un odds ratio 3 mais la p value reste cependant non significative ($p=0.19$).

4. Résultats de la spectrophotométrie :

L'estimation de la quantité et de la pureté d'ADN a été réalisée grâce à la spectrophotométrie. Ainsi la mesure de la densité optique (DO) à la longueur d'onde de 260nm permet le calcul de la concentration de l'ADN.

En sachant qu'une unité de DO correspond à 50ng/μl, et que le facteur de dilution est égal à 50 pour les échantillons extraits par le kit WiraGen et a 100 pour celles qui sont extraits par la méthode NaCl, l'estimation de la concentration d'ADN est déterminée par la formule suivante.

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260} * \text{facteur de dilution} * 50\text{ng.}$$

Le rapport R entre longueur d'ondes 260 et 280 permet de détecter d'éventuelles contaminations d'ADN. Lorsque le rapport R est inférieur à 1,5 ça indique une contamination par les protéines et s'il est supérieur à 2 cela indique une contamination par les sels.

Tableau 4. Absorbance et concentration des extraits d'ADN obtenus à partir des échantillons sanguins des sujets témoins.

Échantillons	Absorbance à 260 nm	Absorbance à 280 nm	R= 260/280	Concentration (ng/μl)
01	0.013	0.013	1.000	65
02	0.014	0.012	1.166	70
03	0.023	0.020	1.15	115
04	0.012	0.011	1.090	60
05	0.023	0.014	1.642	70

06	0.007	0.005	1.4	35
07	0.099	0.049	2.020	495
08	0.013	0.008	1.625	65
09	0.011	0.005	2.2	55
10	0.205	0.195	1.051	512.5
11	0.200	0.195	1.0255555	500
12	0.152	0.148	1.0270	380
13	0.172	0.163	0.273	430
14	0.187	0.187	1.000	467.5
15	0.151	0.148	1.0202	377.5
16	0.155	0.167	0.9281	387.5
17	0.163	0.172	0.947	407.5
18	0.415	0.409	1.01466	1037.5
19	0.127	0.123	1.03255	317.5
20	0.148	0.145	1.02068	370

Le tableau présente le pourcentage d'ADN extrait pur, contaminé par le NaCl ou par les protéines ainsi que la moyenne de la concentration de l'ADN obtenue.

Tableau 5. Moyennes des concentrations des extraits d'ADN des témoins et leur pourcentage de pureté.

%d'échantillons d'ADN extrait pur.	N=15 (70%)
%d'échantillons d'ADN extrait contaminé par le NaCl.	N=2 (20%)
%d'échantillons d'ADN extrait contaminé par les protéines.	N=3 (30%)
Moyenne de la concentration d'ADN extrait pur (ng/ul)	244.9
Moyenne de la concentration d'ADN contaminé par les protéines. (ng/ul)	408.3

N : nombre d'échantillons

Tableau 6. Rapport d'absorbance (R) et concentration des extraits d'ADN obtenus pour les cas.

Échantillons	R= 260/280	Concentration (ng/μl)
01	1.5	30
02	1.000	2.5
03	0.9476	225
04	1.3529	57.5
05	1.1428	120
06	1.0563	370
07	1.032	317.5
08	1.038	325
09	1.037	397.5
10	1.0100	497.5

Tableau 7. Moyennes des concentrations des extraits d'ADN des cas et leur pourcentage de pureté.

%d'échantillons d'ADN extrait pur obtenu.	N=9 (90%)
%d'échantillons d'ADN extrait contaminé par le NaCl.	N=0 (0%)
%d'échantillons d'ADN extrait contaminé par les protéines.	N=1(10%)
Moyenne de la concentration d'ADN extrait pur (ng/ul)	233.1
Moyenne de la concentration d'ADN contaminé par les protéines. (ng/ul)	255
Moyenne de la concentration d'ADN contaminé par le NaCl. (ng/ul)	0

N : nombre d'échantillons

4. Résultats de la Réaction de Polymérisation en Chaîne PCR

La détermination des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme du gène du diabète n'a pas pu se faire malgré la réalisation de deux PCR avec deux protocoles différents dont on n'a pas obtenu de résultats. Compte tenu des délais de soutenances, nous avons décidé d'arrêter la mise au point des paramètres de la PCR.

Discussion

1. Discussion sur Résultats de la régression logistique

Notre étude a été réalisée sur 10 diabétiques de type 1 dans la région de Tlemcen (extrême ouest Algérien) et 24 témoins recensés au sein de l'EPH pédiatrique de Sebdo. Dans notre étude l'âge moyen des diabétiques est de $12,40 \pm 5,04$ cela concorde avec les études de (**Levy-Marchal et al., 1990**) et de (**Charkaluk et al., 2002**) qui rapportent que les diabétiques de type 1 sont fréquents dans la tranche d'âge entre 2ans et 14ans.

Les résultats de l'analyse logistique montre que la consanguinité présente un facteur de prédisposition au diabète de type 1, nos résultats sont en conformité avec les résultats rapportés par des études antérieures dans notre région. En effet, des résultats similaires ont été obtenus lors d'une étude épidémiologique menée sur la population de Tlemcen (**Dali-Sahi et Benmansour, 2014**).

De la même manière, **Zaoui et al** rapportent lors d'une précédente étude que le taux de consanguinité dans notre région est élevée, il a été estimé à 30,6% en milieu urbain et 40,5% en milieu rural (**Zaoui et al., 2007**).

Des études Finlandaises, ont également montré que les apparentés au premier degré avaient 15 à 20% plus de risque de développer un DT1 par rapport à la population générale (**Karvonen et al., 1999**).

Comme la présence d'antécédents familiaux du DT1 est retenu par le modèle, on suppose que la transmission du DT1 d'une génération à une autre est due soit à un gène de prédisposition génétique qui est démasqué par un ou plusieurs facteurs environnementaux ou bien est due à un diabète mono génique (**Murphy et al., 2008**).

La transmission du diabète est multigénique, ceci interviendrait pour 30 % dans la survenue de la maladie. Il a été prouvé que les haplotypes de susceptibilité représentaient 50% de la part génétique (**Gorodezky et al., 2006**).

Dans notre population, l'allaitement se présente comme un facteur de protection contre DT1 ($p=0.008$), l'odds ratio obtenu est de 2.14 ; ce résultat, est en accord avec l'étude cas-témoins menée en France qui a étudié les facteurs associés à développer un DT1 chez l'enfant qui a obtenu un OR de 0.19 (**Benabid Ghanem, 2013**).

L'allaitement au lait de vache n'est pas retenu par le modèle logistique comme facteur de risque. La littérature rapporte que l'introduction du lait de vache à un âge précoce chez les sujets à risque génétique pourrait constituer un facteur de risque par la production d'anticorps anti-albumine bovine. Cette protéine présente des analogies de structure avec certaines protéines de la cellule bêta (**Harrison et Honeyman, 1999**).

Cependant, des études ont montré une absence d'association entre l'apparition d'anticorps anti-cellule β et la modalité d'allaitement chez les enfants à haut risque génétique (**Couper et al., 1999 ; Hummel et al., 2000**).

L'hypothèse accélératrice due à un IMC supérieur à 24.99 n'a pas été retenue par le modèle prédictif $p=0,699$. Ce même résultat a été constaté par (**Jorde et al., 2004**).

2. Discussion du degré de pureté de l'ADN et sur la réalisation de la PCR

Au-delà des facteurs environnementaux, l'exploration des facteurs génétiques peut aujourd'hui nous fournir de nouvelles perspectives en identifiant les sujets à risque génétique dans le but de développer des thérapies ciblées.

Dans cet élan nous avons constitué une banque d'ADN en utilisant la méthode d'extraction au NaCl (salting out) et le kit WiraGen, qui sont des méthodes simples et sans danger de toxicité afin de pouvoir mener une analyse spécifique de détection de ces polymorphismes en réalisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

L'extraction d'ADN à partir du sang des diabétiques nous a permis d'obtenir des extraits d'ADN purs (90%) qui permettent la réalisation d'une PCR. Sur les 10 échantillons de cas, nous avons obtenu 09 extraits d'ADN purs, 1 extrait contaminé par les protéines et aucun ADN contaminé par NaCl.

L'extraction d'ADN à partir du sang des témoins nous a permis d'obtenir des extraits d'ADN purs (70%) qui permettront par la suite la réalisation de la PCR. Sur les 24 échantillons, nous avons obtenu 15 extraits d'ADN purs sans aucune

contamination, 03 extraits contaminés par les protéines et 02 ADN contaminé par NaCl.

La concentration moyenne d'ADN pur est de 244.9 ng/ul pour les témoins et 233.1 ng/ul pour les diabétiques donc ces concentrations sont suffisantes pour la réalisation d'une PCR puisque la quantité d'ADN généralement utilisée pour la PCR est comprise entre 50 et 100 ng.

L'étude d'association entre le polymorphisme étudié et le DT1 n'a malheureusement pas pu être réalisée, car la mise au point de la technique PCR a été interrompu après deux essais infructueux, et ce compte tenu de la contrainte des délais de soutenances des mémoires de master.

Conclusion

Le diabète est devenu un problème majeur de santé publique mondiale au cours de ces dernières décennies.

Dans notre étude nous avons pu contribuer à la description épidémiologique de notre population, afin d'identifier les principaux facteurs de risque du DT1 et les agents qui pourraient conférer une protection contre la maladie, ce qui permettra par la suite de développer des recommandations et des stratégies préventives à la fois à l'échelle individuelle et collective.

Les facteurs de risque retenus pour le DT1, dans notre population sont la consanguinité au premier degré et les antécédents familiaux.

L'IMC>24.99 et le degré de consanguinité ne constituent pas des facteurs de risque pour le DT1. Par contre L'allaitement maternel semble protéger la population témoin contre le DT1.

L'absence de valeurs significatives des p values pour les autres paramètres, pourrait être dû au faible échantillon sur lequel nous avons travaillé, qui de par sa faible puissance statistique, ne nous permettra de mettre en évidence que les très fortes associations ; les faibles associations seront masquées et ne pourront pas être mise en évidence avec un tel échantillon, de ce fait, l'élargissement de l'échantillon s'avère plus que ne Césaire.

Dans notre étude nous avons réussi à constituer une bio-banque d'ADN, que nous allons utiliser par la suite pour les analyses de biologie moléculaire, afin d'identifier les marqueurs génétique de susceptibilité et de protection associés au DT1 dans la population de Tlemcen ; l'expérimentation par PCR a dû être interrompu compte tenu des délais alloués au soutenances du stage de master, il s'avère donc nécessaire de continuer les manipulations pour la mise au point de la PCR sur un échantillon plus grand pour identifier le taux d'intervention des allèles HLA DR3/DR4 par rapport à l'ensemble des risques génétiques . Ce qui suggère comme perspectives pour notre travail, de poursuivre la recherche en augmentant l'enchantion d'étude et de poursuivre l'étude génétique que nous avons initié pour pouvoir avoir des réponses sur la prédisposition génétique chez les diabétiques, sans minimiser pour autant les facteurs sociaux et familiaux qui jouent un rôle important dans la genèse de cette maladie et aussi proposer d'autre marqueurs moléculaires dans le but de développer des thérapies ciblées.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

Al youcef A (2006) Anticorps anti BP 180 et système HLA dans les pemphigoïdes auto-immunes .Thèse de Doctorat, Science de la vie et de la Santé; Université de Limoges.

Al youcef A (2006) Anticorps anti BP 180 et système HLA dans les pemphigoïdes auto-immunes .Thèse de Doctorat, Science de la vie et de la Santé; Université de Limoges.

Alddafari M S (2011) Etude du Polymorphismes Génétique du Diabète de Type 1 dans La Population de l'Ouest Algérien (INS-VNTR & CTLA-4). Thèse de Magister, Génétique Moléculaire Humaine et Santé; Université de Tlemcen.

Aloulou H, Kammoun T, Ben Ayed M, Masmoudi H, Hachicha M (2008) Association diabète de type 1 et maladie cœliaque chez l'enfant. Journal de pédiatrie et de puériculture 21:37-43

Aouiha.M et Kaushik.R (2010) Diabète : la pandémie silencieuse et son impact en Afrique subsaharienne, AfricanChangingDiabetes Leadership forum.

Bach JF (2009) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med 347: 911-920.

Baeke F, Korf H, Overbergh L, Verstuyf A, Thorrez L, Van Lommel L, et al. The vitamin D analog, TX527, promotes a human CD4 + CD25 high CD127 low regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammatory
Immunol 2011;186:132–42.

Barat P, Lévy-Marchal C (2013) Épidémiologie des diabètes sucrés chez l'enfant. Elsevier Masson 20: 110-116.

Barratt BJ , Payne F, Lowe CE, Hermann R, Healy BC et *al.*, (2004) Remapping the Insulin Gene/IDDM2 Locus in Type 1 Diabetes. Diabetes 53(7):1884-1889.

Bell GI, Horita S, Karam JH (1984) A Polymorphic Locus near the Human Insulin Gene is Associated with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Diabetes 33: 176-183.

Références bibliographiques

Benabid Ghanem O (2013) Les facteurs associés à l'apparition du diabète de type 1 chez l'enfant. Selon une étude cas-témoins. Thèse de Doctorat, Médecine Générale, Université de Pierre et Marie Curie.

Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE et al., (1995) Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat. Genet* 9(3): 284-292.

Betts P, Mulligan J, Ward P, Smith B, Wilkin T (2005) Increasing body weight predicts the earlier onset of insulin-dependant diabetes in childhood: Testing the "accelerator hypothesis". *Diabet Med* 22: 144-151.

Bezzaoucha A. Le diabète sucré connu à Alger : fréquence et conséquences. *DiabetesMetab.* 1992;18 : 229-35.

Boudraa G, Hachelaf W, Benbouabdellah M, Belkadi M, Ben-mansour FZ, Touhami M (1996) Prevalence of coeliac disease in diabetic children and their first-degree relatives in west Algeria: screening with serological markers. *Acta Paediatr* 412: 58-60.

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.

Charkaluk ML, Czernichow P, Levy-Marchal C (2002) Incidence data of childhood-onset type 1 diabetes in France during 1988-1997: The case for a shift toward younger age at onset. *Pediatr Res* 52(6):859-862.

Christen U, Benke D, Wolfe T, Rodrigo E, Rhode A et al., (2004) Cure of prediabetic mice by viral infections involves lymphocyte recruitment along an IP-10 gradient. *Journal of Clinical Investigation* 113: 74-84.

Références bibliographiques

- Couper JJ, Steele C, Beresford S, Powell T, McCaul K et *al.*, (1999) Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow 's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes* 48: 2145-2149.
- Coutant R , Bougnères PF (1995) Génétique du diabète de l'enfant. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 8: 258–263.
- Craighead JE (1978) Current views on the etiology of insulin dependent diabetes mellitus. *New Eng J Med* 299: 1439-1445.
- Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T (2006) Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 7: 987-994.
- Dali-Sahi M et Benmansour D (2014) evaluation du risque de survenue du diabète de type 1 dans une population consanguine de l'ouest Algerien *15: 25-37.*
- Dayan CM, Daniels GH (1996) Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 335 :99–107.
- Degos L (1990) Le complexe HLA dans la susceptibilité au diabète insulino-dépendant. *Presse médical* 19 : 1305-1306.
- Deloor-Demay A (2014) Bases pharmacodynamiques et efficacité de la vitamine D en prévention primaire et secondaire de pathologies rencontrées en médecine générale. Thèse de Doctorat, Médecine Générale; Université de Nantes.
- Des Guetz G, Blay J-Y (2008) Les thérapies ciblées. Springer, Verlag, Paris.
- Dorman J. Molecular epidemiology of insulin-dependent diabetes. *Epidemiol Rev.* 1997;19:91-98.
- Dubois-Lafforgue D, Timsit J, Carel JC, Bougnères PF, Guillet JG, Boitard CT (1999) cell response to proinsulin and insulin in prediabetic and type 1 insulin-dependent diabetic patients. *J Clin Immunol* 19:127–134.

Références bibliographiques

Dubois-Laforgue D (2010) Progrès Physiopathologiques dans le diabète de type 1. La revue du praticien 60: 165-169.

Fédération Internationale du Diabète, ATLAS du DIABÈTE de la FID. (2013).

Froguel P, Passa P (1991) Diabète et hérédité. Rev Med Interne 12: 123-127.

Garin I, Edghill EL, Akerman I, Rubio-Cabezas O, Rica I et al., (2010) Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 107: 3105-3110.

Geenen V (2004) Nouvelles approches du diagnostic et de la pathogénie du diabète de type 1. Louvain médical, Bruxelles 123: 260-266

Gorodezky C, Alaez C, Murguia A, Rodriguez A, Balladares S, Vazquez M, Flores H, Robles C (2006) HLA and autoimmune diseases : Type 1 diabetes (T1D) as a example. Autoimmunity Reviews 5 187194.

Gottlieb PA, Eisenbarth GS : Diagnosis and treatment of preinsulin dependent diabetes. *Annu Rev Med.* 1998 ; **49** : 391- 405

Grimaldi A (2000) Diabétologie. Questions d'internat, Médecine Générale; Université Pierre et Marie Curie.

Gysemans CA, Cardozo AK, Callewaert H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* 2005; 146: 1956-64

Harrison LC, Honeyman MC (1999) Cow's milk and type 1 diabetes. The real debate is about mucosal immune function. *Diabetes* 48: 1501-1507.

Références bibliographiques

Hober D, Andréolotti L, Hober C, Belaïch S, Vantigham M-C et *al.*, (1998) Entérovirus et diabète de type 1. *Med Sci* 14: 398-403.

Humbel R-L (2002) Maladies auto-immunes des glandes endocrines. *GEAI info* n°5

Jaffiol C (2011) Le diabète sucré en Afrique : un enjeu de santé publique .*Bull. Acad. Nationale Méd* 195 (6): 1239-1254

Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009;183:5458-67.

Jorde LB, Carey JC, Bamshad M, White RL (2004) Génétique médicale. ELSEVIER MASSON.

Kamoun Abid H, Hmida S, Smaoui N, Kaabi H , Abid A et *al.*, (2001) Étude de l'association entre diabète type 1 et polymorphisme du gène CTLA-4 dans une population tunisienne. *Pathol Biol* 49: 794-798.

Karvonen M, Pitkaniemi J, Tuomilehto J (1999) The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger. The Finnish childhood diabetes registry group. *Diabetes Care* 22: 1066-1070.

Kemali Z, Hanaizi H, Kara B, Kanoun N, Kemali N, Ferrah T. Le diabète sucré et ses facteurs de risque dans une population adulte.*Rev.Alg Santé Mil.* 1995 ; XXIV : 7-14.

Kennedy GC, German MS, Rutter WJ (1995) The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat. Genet* 9(3): 293-298.

Knip M, Akerblom HK (1999) Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107 (suppl. 3) : S93-100.

Le Goff C, Kaux J F, Chapelle J P, Lutteri L (2008) Comment j'explore... *Revue des principaux auto-anticorps. Revue Médicale de Liège* 63: 43-49.

Références bibliographiques

Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI (1993) susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *nat genet* 4(3): 305-310.

Levy-Marchal, C., Papoz, L., deBeaufort, C., Doutreix, J., Froment, V., Voirin, J., Collignon, A., Garros, B., Schleret, Y., Czernichow, P. 1990. Incidence of insulin-dependent *diabetes mellitus* in France in 1988. *Diabetologia*, 33: 465-469.

Malek R, Belateche F, Laouamri S, et al. Prévalence du diabète de type 2 et de l'intolérance au glucose dans la région de Sétif (Algérie). *DiabètesMetab* 2001 ; 27 : 164-71.

Mallone R, Brezar V, Boitard C (2011) T cell recognition of autoantigens 154 in human type 1 diabetes: clinical perspectives. *Clin Dev Immunol* 155: 513-210.

Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia* 1994;37:552-8.

Myers M, Mackay I, Zimmet P (2002) Des toxines dans l'alimentation : Qui veut la peau des légumes ?. *DiabetesVoice* 47 : 35-37.

Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C et al., (1996) The CTLA-4 gene region of chromosom 2q33 is linked to and associated with type 1 diabetes. *Hum Mol Genet* 5: 1075-1080.

Notkins AL, Lernmark A (2001) Autoimmune type 1 diabetes resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 108:1247-1252.

Oikarinen S, Martiskainen M, Tauriainen S, Huhtala H, Ilonen J, Veijola R, et al. Enterovirus RNA in Blood Is Linked to the Development of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2011;60(1):276-9.

OMS Organisation Mondiale de la Santé 2014. Journée mondiale du diabète.

Références bibliographiques

Perlemuter L, Sélam JL, Collin de l'Hortet G (2003) Diabète et maladies métaboliques. Elsevier / Masson pages 408:www.books.google.fr.

Petronzelli F, Multari G, Ferrante P, Bonamico M, Rabuffo G, Campea L et al., (1993) Different dose effect of HLA-DQ alpha beta heterodimers in insulin-dependent diabetes mellitus and celiac disease susceptibility. *Human Immunol* 36: 156-162.

Pociot F, McDermott MF. — Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun*, 2002, **3**, 235-249.

Raile K, O'Connell M, Galler A, Werther G, Kühnen P et al., (2011) Diabetes caused by insulin gene (INS) deletion: clinical characteristics of homozygous and heterozygous individuals. *Eur J Endocrinol* 165: 255-260.

Rodier M, 2001 Définition et classification du diabète. *Médecine nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25 (2) : 91-223.

Shimamura M, Huang YY, Okamoto N Suzuki N, Yasuoka J et al., (2007) Modulation of Val-pha19 NKT cell immune responses by alpha-mannosyl ceramide derivatives consisting of a series of modified sphingosines. *EurJ Immunol* 37:1836–1844.

Simon D , Fagot-Campaga A , Eschwege E , Blkau B. Diabète : définition, dépistage et épidémiologie. *In* : Grimaldi A, dir. *Traité de diabétologie*. Paris: Flammarion ; 2009. P. 10.

Stoy J, Edghill EL, Flanagan SE, Honggang Ye H, Paz VP et al., (2007) Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15040-4.

Stoy J, Steiner DF, Park SY, Ye H, Philipson LH, Bell GI (2010) Clinical and molecular genetics of neonatal diabetes due to mutations in the insulin gene. *Rev Endocr Metab Disord* 11: 205–215.

Références bibliographiques

Sumnik Z, Cinek O, Bratanic N, Kordonouri O, Kulich M et *al.*, (2006) Risk of celiac disease in children with type 1 diabetes is modified by positivity for HLA-DQB1*02-DQA1*05 and TNF -308A. *Diabetes Care* 29: 858-863.

Svejgaard AP, Platz P, Ryder LP (1982) HLA and disease : a survey. *Immunol Rev* 70 : 193-218.

The EURODIAB ACE STUDY GROUP (1998) Familial risk of type 1 diabetes in European Children. *Diabetologia* 41: 1151-1156

Références bibliographiques

Al youcef A (2006) Anticorps anti BP 180 et système HLA dans les pemphigoïdes auto-immunes .Thèse de Doctorat, Science de la vie et de la Santé; Université de Limoges.

Al youcef A (2006) Anticorps anti BP 180 et système HLA dans les pemphigoïdes auto-immunes .Thèse de Doctorat, Science de la vie et de la Santé; Université de Limoges.

Alddafari M S (2011) Etude du Polymorphismes Génétique du Diabète de Type 1 dans La Population de l'Ouest Algérien (INS-VNTR & CTLA-4). Thèse de Magister, Génétique Moléculaire Humaine et Santé; Université de Tlemcen.

Aloulou H, Kammoun T, Ben Ayed M, Masmoudi H, Hachicha M (2008) Association diabète de type 1 et maladie cœliaque chez l'enfant. Journal de pédiatrie et de puériculture 21:37-43

Aouiha.M et Kaushik.R (2010) Diabète : la pandémie silencieuse et son impact en Afrique subsaharienne, AfricanChangingDiabetes Leadership forum.

Bach JF (2009) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med 347: 911-920.

Baeke F, Korf H, Overbergh L, Verstuyf A, Thorrez L, Van Lommel L, et al. The vitamin D analog, TX527, promotes a human CD4 + CD25 high CD127 low regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammatory
Immunol 2011;186:132–42.

Barat P, Lévy-Marchal C (2013) Épidémiologie des diabètes sucrés chez l'enfant. Elsevier Masson 20: 110-116.

Barratt BJ , Payne F, Lowe CE, Hermann R, Healy BC et *al.*, (2004) Remapping the Insulin Gene/IDDM2 Locus in Type 1 Diabetes. Diabetes 53(7):1884-1889.

Bell GI, Horita S, Karam JH (1984) A Polymorphic Locus near the Human Insulin Gene is Associated with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Diabetes 33: 176-183.

Références bibliographiques

Benabid Ghanem O (2013) Les facteurs associés à l'apparition du diabète de type 1 chez l'enfant. Selon une étude cas-témoins. Thèse de Doctorat, Médecine Générale, Université de Pierre et Marie Curie.

Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE et al., (1995) Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat. Genet* 9(3): 284-292.

Betts P, Mulligan J, Ward P, Smith B, Wilkin T (2005) Increasing body weight predicts the earlier onset of insulin-dependant diabetes in childhood: Testing the "accelerator hypothesis". *Diabet Med* 22: 144-151.

Bezzaoucha A. Le diabète sucré connu à Alger : fréquence et conséquences. *DiabetesMetab.* 1992;18 : 229-35.

Boudraa G, Hachelaf W, Benbouabdellah M, Belkadi M, Ben-mansour FZ, Touhami M (1996) Prevalence of coeliac disease in diabetic children and their first-degree relatives in west Algeria: screening with serological markers. *Acta Paediatr* 412: 58-60.

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.

Charkaluk ML, Czernichow P, Levy-Marchal C (2002) Incidence data of childhood-onset type 1 diabetes in France during 1988-1997: The case for a shift toward younger age at onset. *Pediatr Res* 52(6):859-862.

Christen U, Benke D, Wolfe T, Rodrigo E, Rhode A et al., (2004) Cure of prediabetic mice by viral infections involves lymphocyte recruitment along an IP-10 gradient. *Journal of Clinical Investigation* 113: 74-84.

Références bibliographiques

- Couper JJ, Steele C, Beresford S, Powell T, McCaul K et *al.*, (1999) Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow 's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes* 48: 2145-2149.
- Coutant R , Bougnères PF (1995) Génétique du diabète de l'enfant. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 8: 258–263.
- Craighead JE (1978) Current views on the etiology of insulin dependent diabetes mellitus. *New Eng J Med* 299: 1439-1445.
- Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T (2006) Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 7: 987-994.
- Dali-Sahi M et Benmansour D (2014) evaluation du risque de survenue du diabète de type 1 dans une population consanguine de l'ouest Algerien 15: 25-37.
- Dayan CM, Daniels GH (1996) Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 335 :99–107.
- Degos L (1990) Le complexe HLA dans la susceptibilité au diabète insulino-dépendant. *Presse médical* 19 : 1305-1306.
- Deloor-Demay A (2014) Bases pharmacodynamiques et efficacité de la vitamine D en prévention primaire et secondaire de pathologies rencontrées en médecine générale. Thèse de Doctorat, Médecine Générale; Université de Nantes.
- Des Guetz G, Blay J-Y (2008) Les thérapies ciblées. Springer, Verlag, Paris.
- Dorman J. Molecular epidemiology of insulin-dependent diabetes. *Epidemiol Rev.* 1997;19:91-98.
- Dubois-Lafforgue D, Timsit J, Carel JC, Bougnères PF, Guillet JG, Boitard CT (1999) cell response to proinsulin and insulin in prediabetic and type 1 insulin-dependent diabetic patients. *J Clin Immunol* 19:127–134.

Références bibliographiques

Dubois-Laforgue D (2010) Progrès Physiopathologiques dans le diabète de type 1. La revue du praticien 60: 165-169.

Fédération Internationale du Diabète, ATLAS du DIABÈTE de la FID. (2013).

Froguel P, Passa P (1991) Diabète et hérédité. Rev Med Interne 12: 123-127.

Garin I, Edghill EL, Akerman I, Rubio-Cabezas O, Rica I et al., (2010) Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 107: 3105-3110.

Geenen V (2004) Nouvelles approches du diagnostic et de la pathogénie du diabète de type 1. Louvain médical, Bruxelles 123: 260-266

Gorodezky C, Alaez C, Murguia A, Rodriguez A, Balladares S, Vazquez M, Flores H, Robles C (2006) HLA and autoimmune diseases : Type 1 diabetes (T1D) as a example. Autoimmunity Reviews 5 187194.

Gottlieb PA, Eisenbarth GS : Diagnosis and treatment of preinsulin dependent diabetes. *Annu Rev Med.* 1998 ; **49** : 391- 405

Grimaldi A (2000) Diabétologie. Questions d'internat, Médecine Générale; Université Pierre et Marie Curie.

Gysemans CA, Cardozo AK, Callewaert H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* 2005; 146: 1956-64

Harrison LC, Honeyman MC (1999) Cow's milk and type 1 diabetes. The real debate is about mucosal immune function. *Diabetes* 48: 1501-1507.

Références bibliographiques

Hober D, Andréolotti L, Hober C, Belaïch S, Vantigham M-C et *al.*, (1998) Entérovirus et diabète de type 1. *Med Sci* 14: 398-403.

Humbel R-L (2002) Maladies auto-immunes des glandes endocrines. *GEAI info* n°5

Jaffiol C (2011) Le diabète sucré en Afrique : un enjeu de santé publique .*Bull. Acad. Nationale Méd* 195 (6): 1239-1254

Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009;183:5458-67.

Jorde LB, Carey JC, Bamshad M, White RL (2004) Génétique médicale. ELSEVIER MASSON.

Kamoun Abid H, Hmida S, Smaoui N, Kaabi H , Abid A et *al.*, (2001) Étude de l'association entre diabète type 1 et polymorphisme du gène CTLA-4 dans une population tunisienne. *Pathol Biol* 49: 794-798.

Karvonen M, Pitkaniemi J, Tuomilehto J (1999) The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger. The Finnish childhood diabetes registry group. *Diabetes Care* 22: 1066-1070.

Kemali Z, Hanaizi H, Kara B, Kanoun N, Kemali N, Ferrah T. Le diabète sucré et ses facteurs de risque dans une population adulte.*Rev.Alg Santé Mil.* 1995 ; XXIV : 7-14.

Kennedy GC, German MS, Rutter WJ (1995) The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat. Genet* 9(3): 293-298.

Knip M, Akerblom HK (1999) Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107 (suppl. 3) : S93-100.

Le Goff C, Kaux J F, Chapelle J P, Lutteri L (2008) Comment j'explore... Revue des principaux auto-anticorps. *Revue Médicale de Liège* 63: 43-49.

Références bibliographiques

Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI (1993) susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *nat genet* 4(3): 305-310.

Levy-Marchal, C., Papoz, L., deBeaufort, C., Doutreix, J., Froment, V., Voirin, J., Collignon, A., Garros, B., Schleret, Y., Czernichow, P. 1990. Incidence of insulin-dependent *diabetes mellitus* in France in 1988. *Diabetologia*, 33: 465-469.

Malek R, Belateche F, Laouamri S, et al. Prévalence du diabète de type 2 et de l'intolérance au glucose dans la région de Sétif (Algérie). *DiabètesMetab* 2001 ; 27 : 164-71.

Mallone R, Brezar V, Boitard C (2011) T cell recognition of autoantigens 154 in human type 1 diabetes: clinical perspectives. *Clin Dev Immunol* 155: 513-210.

Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia* 1994;37:552-8.

Myers M, Mackay I, Zimmet P (2002) Des toxines dans l'alimentation : Qui veut la peau des légumes ?. *DiabetesVoice* 47 : 35-37.

Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C et al., (1996) The CTLA-4 gene region of chromosom 2q33 is linked to and associated with type 1 diabetes. *Hum Mol Genet* 5: 1075-1080.

Notkins AL, Lernmark A (2001) Autoimmune type 1 diabetes resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 108:1247-1252.

Oikarinen S, Martiskainen M, Tauriainen S, Huhtala H, Ilonen J, Veijola R, et al. Enterovirus RNA in Blood Is Linked to the Development of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2011;60(1):276-9.

OMS Organisation Mondiale de la Santé 2014. Journée mondiale du diabète.

Références bibliographiques

Perlemuter L, Sélam JL, Collin de l'Hortet G (2003) Diabète et maladies métaboliques. Elsevier / Masson pages 408:www.books.google.fr.

Petronzelli F, Multari G, Ferrante P, Bonamico M, Rabuffo G, Campea L et al., (1993) Different dose effect of HLA-DQ alpha beta heterodimers in insulin-dependent diabetes mellitus and celiac disease susceptibility. *Human Immunol* 36: 156-162.

Pociot F, McDermott MF. — Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun*, 2002, **3**, 235-249.

Raile K, O'Connell M, Galler A, Werther G, Kühnen P et al., (2011) Diabetes caused by insulin gene (INS) deletion: clinical characteristics of homozygous and heterozygous individuals. *Eur J Endocrinol* 165: 255-260.

Rodier M, 2001 Définition et classification du diabète. *Médecine nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25 (2) : 91-223.

Shimamura M, Huang YY, Okamoto N Suzuki N, Yasuoka J et al., (2007) Modulation of Val-pha19 NKT cell immune responses by alpha-mannosyl ceramide derivatives consisting of a series of modified sphingosines. *EurJ Immunol* 37:1836–1844.

Simon D , Fagot-Campaga A , Eschwege E , Blkau B. Diabète : définition, dépistage et épidémiologie. *In* : Grimaldi A, dir. *Traité de diabétologie*. Paris: Flammarion ; 2009. P. 10.

Stoy J, Edghill EL, Flanagan SE, Honggang Ye H, Paz VP et al., (2007) Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15040-4.

Stoy J, Steiner DF, Park SY, Ye H, Philipson LH, Bell GI (2010) Clinical and molecular genetics of neonatal diabetes due to mutations in the insulin gene. *Rev Endocr Metab Disord* 11: 205–215.

Références bibliographiques

Sumnik Z, Cinek O, Bratanic N, Kordonouri O, Kulich M et *al.*, (2006) Risk of celiac disease in children with type 1 diabetes is modified by positivity for HLA-DQB1*02-DQA1*05 and TNF -308A. *Diabetes Care* 29: 858-863.

Svejgaard AP, Platz P, Ryder LP (1982) HLA and disease : a survey. *Immunol Rev* 70 : 193-218.

The EURODIAB ACE STUDY GROUP (1998) Familial risk of type 1 diabetes in European Children. *Diabetologia* 41: 1151-1156

Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R et *al.*, (1997) insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR Alleles at the IDDM2 Locus. *Nat Genet* 15: 289-292.

VialettesB, Guillerand MA, ViensP, StoppaAM, BaumeD et *al.*, (1993) Incidence rate and risk factors for thyroid dysfunction during recombinant interleukine-2 therapy in advanced malignancies. *Acta Endocrinol* 129 : 31–38.

Wilkin TJ (2001) The accelerator hypothesis: Weight gain as the missing link between type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia* 44: 914-922.

Woo M, M.D., FRCPC, Ph.D. Endocrinologie conférences scientifiques. Nouveauxavancements dans le diabète de type 1 : Espoirs pour l'avenir. ECS. 2004 Mar;4,3.

Yoon JW, Jun HS (2005) Autoimmune Destruction of Pancreatic Beta Cells. *Am J Ther* 12(6):580-59

Zaoui S, Biémont C, Meguenni K (2007) Approche épidémiologique du diabète en milieux urbain et rural dans la région de Tlemcen (Ouest algérien) 17 :15-21.

<https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=0ahUKEWjk3o6C3fHiAhWLYoUKHVdAC->

Annexes

Questionnaire :

Code :

Date

:.....

Nom et Prénom :

Localité :

Les données sociodémographiques :

Age :ans

Sexe : 1. Masculin 2. Féminin

Niveau d'instruction :

Les données anthropométriques :Consanguinité : 1. Oui 2. Non Degré de consanguinité : 1. Csg 1 2. Csg 2 Antécédent familiaux de diabète : 1. Oui 2. Non

Antécédent personnel :

Age de révélation du

diabète :

Paramètres de la santé :

Poids (kg) :

Taille (cm) :

IMC :

Allaitement : 1. Maternel 2. Artificiel 3. Mixte Pathologies associées : 1. Oui Type :2. Non

Virose :

Paramètres biologiques : Glycémie :Hémoglobine

glyquée :

Préparation des solutions d'extraction

- Préparation de 500ml EDTA (0,5 M ; pH = 8) :
 - Faire dissoudre 93,06g d'EDTA dans 400 ml d'eau distillée puis ajuster jusqu'au 500ml, et avec du NaOH (5M) règle le PH à 8.

- Préparation de 500ml Tris HCl (1M ; pH=8) :
 - Faire dissoudre 60,57g d'EDTA dans 400 ml d'eau distillée puis ajuster jusqu'au 500ml, et avec du HCl règle le pH à 8.

- Préparation de 100ml de SDS 10% :
 - Pour 10% : 10 g -----> 100ml eau distillée.

- Préparation de NaCl (5M) :
 - Pour 5M: 292,25 g -----> 1000ml eau distillée.

- Préparation de 2L de TE10/10 :
 - 20ml tris-Hcl (1M, pH=8)
 - 40ml EDTA (0.5M, pH=8)
 - qsp 2L eau distillée.

- Préparation de 1L de TE10/1 :
 - 10ml tris-Hcl (1M, pH=8)
 - 2 ml EDTA (0.5M, pH=8)
 - qsp 1L eau distillée.

- Préparation de 200ml de solution de lyse des globules blancs (SLB) :
 - 2ml tris-Hcl (1M, pH=8)
 - 40ml EDTA (0.5M, pH=8)
 - 10ml SDS (10%)
 - qsp 200ml eau distillée.

Résumé

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules β pancréatiques par les cellules T auto réactives.

Le but de ce travail est d'étudier le rôle du polymorphisme des gènes HLA DR3-DR4 dans la susceptibilité du diabète.

La réalisation de ce travail repose sur une étude de type cas/témoins réalisée sur un échantillon de 36 individus, dont 10 diabétiques constituant les cas, et 26 normaux (témoins) qui résident dans la wilaya de Tlemcen.

Les résultats de la régression logistique montrent que la consanguinité et les antécédents familiaux représentent un facteur d'exposition au DT1, alors que $L'IMC > 24.99$ et le degré de consanguinité ne constituent pas des facteurs de risque pour le DT1. Par contre L'allaitement maternel semble protéger la population témoin contre le DT1.

Dans notre étude nous avons réussi à constituer une bio-banque d'ADN, que nous allons utiliser par la suite pour les analyses de biologie moléculaire, afin d'identifier les marqueurs génétiques de susceptibilité et de protection associés au DT1 dans la population de Tlemcen, puis d'évaluer le taux d'intervention des allèles HLA DR3/DR4 par rapport à l'ensemble des facteurs de susceptibilité génétique.

Mots clés : Diabète de type 1, gène HLA DR3 et DR4. Etude d'association génétique, polymorphisme génétique, Facteurs de risque.

داء السكري من النوع الأول هو مرض مناعي ذاتي يتميز بتدمير خلايا البنكرياس بواسطة خلايا T الذاتية التفاعل. الهدف من هذا العمل هو إجراء دراسة لدور تعدد الأشكال في جينات HLA DR3-DR4 في قابلية الإصابة بمرض السكري.

ويستند تحقيق هذا العمل على دراسة الحالات والشواهد التي أجريت على عينة من 36 شخصًا ، من بينهم 10 حالات لمرض السكري ، و 26 شخصًا عاديًا (ضوابط) يقيمون في ولاية تلمسان.

تظهر نتائج الانحدار اللوجستي أن التقارب والتاريخ العائلي لهما عامل التعرض لمرض السكري من النوع الأول. مؤشر كتلة الجسم < 24.99 ودرجة التقارب ليست عوامل خطر لـ T1D. يبدو أن الرضاعة الطبيعية تحمي مجموعة التحكم ضد T1D.

في دراستنا ، تمكنا من بناء بنك الحمض النووي الحيوي ، والذي سوف نستخدمه لاحقًا لتحليلات البيولوجيا الجزيئية ، لتحديد العلامات الوراثية الخاصة بقابلية الحماية والحماية المرتبطة بـ T1D في سكان تلمسان. ، لذلك فمن الضروري مواصلة التلاعب لتطوير PCR على عينة أكبر لتحديد معدل تدخل أليل HLA DR3 / DR4 في جميع المخاطر الجينية. **الكلمات المفتاحية :** داء السكري من النوع الأول ، جين HLA DR3 ودراسة الارتباط الوراثي ، تعدد الأشكال الوراثية ، عوامل الخطر DR.

Type 1 diabetes is an autoimmune disease characterized by the destruction of pancreatic β -cells by self-reactive T cells.

The aim of this work is to perform a study of the role of polymorphism polymorphisms of HLA DR3-DR4 genes in the susceptibility of diabetes.

The realization of this work is based on a case-control study carried out on a sample of 36 individuals, including 10 diabetic cases, and 26 normal (controls) who reside in the Tlemcen wilaya.

The logistic regression results show that consanguinity and family history have a factor of exposure to type I diabetes.

BMI > 24.99 and degree of consanguinity are not risk factors for T1D. Breastfeeding appears to protect the control population against T1D.

In our study, we have been able to build a bio-DNA bank, which we will use later for molecular biology analyzes, to identify the genetic markers of susceptibility and protection associated with T1D in the population of Tlemcen., so it is necessary to continue manipulations for the development of PCR on a larger sample to identify the HLA DR3 / DR4 allele intervention rate across all genetic risks.

Key words: type 1 diabetes, HLA DR3 gene and DR4, Study of genetic association, genetic polymorphism, risk factors.