

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

**Département de Biologie**

**MEMOIRE**

Présenté par

**BOUFELDJA Sabrina**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Biologie Moléculaire et Génétique

**Thème**

Elaboration d'amorces pour le promoteur du gène de l'insuline et  
diabète type 1

Soutenu le 19/06/2016, devant le jury composé de :

Présidente	DALI-SAHI Madjda	M.C.A	Université de Tlemcen
Encadreur	BRAHAMI Nabila	M.C.B	Université de Tlemcen
Examinatrice	TRIQUI Chahinez	M.A.A	Université de Tlemcen

## ملخص

**مقدمة:** مرض السكري المعتمد على الأنسولين أو السكري من النوع الأول (DT1) هو مرض مزمن يؤثر على الأطفال والشباب ، و ينتج عن تدمير خلايا بيتا في جزر لانجرهانز ، والنتائج التهاب في الجزر. وهناك أكثر من 20 منطقة تشارك في التسبب في مرض السكري من النوع 1 تم تحديدها من خلال الجينات المرشحة و دراسات ربط اختلال التوازن فيما بينها. جين الأنسولين (INS) على كروموسوم 11 هو على الأرجح ثاني أكبر مساهمة وراثية لمرض السكري من النوع 1؛ فهي تساهم بنسبة 10% في الخطر الوراثي لمرض السكري .

المنطقة ( VNTR ) التي تقع في نهاية 5' من الجين INS تحتوي على مواقع ربط متعددة لعوامل النسخ، مرتبط بحدوث DT1 لدى سكان أوروبا.

**الهدف:** تصميم زوج تمهيد محدد المرافقة ل VNTR في جين الانسولين المرتبط مع DT1 ، لدراسة التنميط الجيني باستخدام PCR.

**الغرض:** زوج التمهيد التي صممت في هذه الدراسة تفيد في دراسة إشراك INS- VNTR في بداية DT1 عند الجزائريين في دراسات لاحقة أو دراسة الحالات والشواهد من الأسر.

**المواد والطريقة:** البحث في تسلسل إشارة جين الانسولين في قاعدة بيانات ensembl و استخدام البرنامج Primer-Blast .

**النتائج:** سمح تفسير النتائج التي قدمها البرنامج Primer-Blast لنا باختيار زوج من التمهيد متكون من 17 و 20 نيوكليوتيدة في الطول الذي اعطانا منتج من 622 نيوكليوتيدة و لديه منتج واحد لانوعي متكون من 3167 pb .

**الكلمات المركزية:** DT1، جين INS ، تمهيد ، INS- VNTR ، منتج لانوعي.

## Résumé

**Introduction:** Le diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1 (DT1) est une maladie chronique touchant l'enfant ou le jeune adulte, il résulte d'une destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, et aboutit à une insulite. Il existe plus de 20 régions qui sont impliquées dans la pathogénèse du diabète de type 1 identifiées grâce aux approches de gènes candidats et aux études de déséquilibre de liaison parmi eux le gène de l'insuline (INS) localisé sur le chromosome 11 est probablement la deuxième plus importante contribution génétique à la variation de la susceptibilité au diabète de type 1; elle contribue pour 10% au risque génétique du diabète. Une région polymorphe (VNTR) localisée à l'extrémité 5' du gène INS contient de multiples sites de liaison pour les facteurs de transcription, a été associée à la survenue du DT1 dans la population européenne. **Objectif:** Nous allons concevoir, avec spécificité le couple d'amorce encadrant le VNTR du gène de l'insuline associé au DT1, pour des études de génotypage par PCR.

**But:** Le couple d'amorces conçue au cours de ce travail servira à étudier l'implication du INS-VNTR dans la survenue du DT1 chez la population Algérienne; lors d'études ultérieures cas-témoins ou des études de familles.

**Matériels et méthodes:** Recherche de la séquence de référence du gène de l'insuline dans la base de données ensembl et utilisation du logiciel primer blast.

**Résultats:** l'interprétation des résultats donnés par l'outil Primer-blast nous a permis de choisir un couple d'amorces de 17 et 20 nucléotides de longueur qui nous donne un produit d'amplification de 622 paires de base et qui présente un seul produit spécifique de 3167pb.

**Mots clés :** DT1, Gène INS, Amorces, VNTR, INS-VNTR, produit spécifique.

## Abstract

**Introduction:** Insulin-dependent diabetes or type 1 diabetes (T1D) is a chronic disease affecting children and young adults, it results from destruction of  $\beta$  cells of the islets of Langerhans, and results in insulinitis.

There are over 20 regions which are involved in the pathogenesis of type 1 diabetes identified through approaches of candidate genes and linkage disequilibrium studies among them the insulin gene (INS) on chromosome 11 is probably the second largest genetic contribution to variation in susceptibility to type 1 diabetes ; it contributes 10 % to the genetic risk of diabetes .

A polymorphic region (VNTR) located at the 5 'end of the INS gene contains multiple binding sites for transcription factors, has been associated with the occurrence of T1D in the European population.

**Objective:** We will design, with specific primer couple flanking the VNTR of insulin gene associated with T1D, for genotyping studies using PCR.

**Purpose:** The pair of primers designed in this study serves to study the involvement of INS-VNTR in the onset of T1D among the Algerian population; in subsequent studies or case-control studies of families.

**Material and Methods:** Search of the reference sequence of the insulin gene in ensembl database and use the primer blast software.

**Results:** the interpretation of the findings given by the Primer -blast tool has allowed us to choose a pair of primers of 17 and 20 nucleotides in length that gives us an amplification product of 622 base pairs and has a single nonspecific product 3167pb.

**Keywords:** DT1, INS gene, Primers, VNTR, INS- VNTR, nonspecific produ

## Table des matières :

Résumé.....	iii
Liste des abréviations.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Introduction .....	01
Chapitre I : Synthèse Bibliographique.....	03
1. Le diabète de type1.....	03
1.1. Définition.....	03
1.2 Classification étiologique du DT1.....	03
1.2.1. Le diabète de type 1 auto-immun (type 1A).....	03
1.2.2. Le diabète de type 1 idiopathique (type 1B).....	04
1.3. Loci de susceptibilité héritée pour le DT1.....	04
2. Gène de l'insuline.....	06
2.1. Structure du gène de l'insuline.....	06
2.2. VNTR du promoteur du gène de l'insuline(IDDM2).....	06
2.3. Mutations génétiques et polymorphisme du gène de l'insuline.....	09
3. Elaboration des amorces.....	11
3.1. Lesamorces.....	11
3.1.1 Définition des amorces.....	11
3.1.2. Conception des amorces pour la PCR.....	11
3.1.3. Sélection des amorces.....	11
3.2. PCR (réaction de polymérisation en chaîne).....	13
3.2.1. Principe de la PCR.....	14

3.2.2. Les acteurs de la PCR.....	15
3.2.3. Instrumentation et composants pour la PCR.....	15
3.2.4. RT-PCR.....	16
3.2.5. Nature exponentielle de la réaction PCR.....	17
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	18
1-La séquence du gène de l'insuline (INS).....	18
2- L'outil Primer-Blast.....	20
3. Analyse des Résultats du Primer Blast.....	21
Chapitre III : Résultats et perspectives.....	23
1. Résultats de la conception des amorces.....	23
2. Confirmations des résultats.....	24
3. Perspectives.....	25
3.1. Les classe de VNTR.....	25
3.2. Etude cas-témoins.....	26
Conclusion.....	27
Références bibliographiques.....	28

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique.
<b>DNNP</b>	Diabète Néonatal Permanent.
<b>DT1</b>	Diabète Type 1.
<b>HLA</b>	Humaine Leucocyte Antigène.
<b>IDDM2</b>	Insulino Dependent Diabete Mellitus 2.
<b>IGF2</b>	Insulin-Like Growth Factor 2.
<b>INS</b>	Insuline.
<b>PCR</b>	Réaction de Polymérisation en Chaîne.
<b>SNP</b>	Single-Nucleotide Polymorphism.
<b>Tf</b>	température de fusion.
<b>TH</b>	Tyrosine Hydroxylase.
<b>VNTR</b>	Variable Number of Tandem Repeat.

## Liste des figures

<b>Figure1.</b> VNTR de l'insuline et le groupe des gènes TH -INS- IGF2.....	07
<b>Figure2.</b> Les étapes de l'amplification PCR.....	15
<b>Figure 3.</b> Plateforme de la base de données ensembl.....	18
<b>Figure 4.</b> La séquence du gène de l'insuline(INS) sur la plateforme ensembl.....	19
<b>Figure 5.</b> La séquence du motif du VNTR au niveau du promoteur du gène del'insuline.....	20
<b>Figure6.</b> Plateforme de la base de données NCBI.....	21
<b>Figure7.</b> L'outil primer blast.....	21
<b>Figure8.</b> Amorces spécifiques (en jaune) encadrant l'INS-VNTR.....	23
<b>Figure 9.</b> Résultat du Primer blast montrant les caractéristiques de la paire d'amorces choisis.....	24
<b>Figure 10.</b> Confirmation des Résultats par le site UCSC in silico PCR.....	25

## Liste des tableaux

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

## Dédicace

A l'aide de Dieu le tout Puissant, J'ai pu achever cette humble étude que je dédie avec toute mon affection à:

Mes très chers parents, leur amour, leur tendresse, leur sacrifice, leur compréhension et leur patience envers moi. Je ne saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier assez de m'avoir donné le meilleur d'eux. Même, que Dieu les protège.

Ma chère grand-mère.

Mes chers frères : Mohammed et Bilal.

Ma chère sœur : Fatima-Zohra.

Tous mes oncles et tantes.

Toute ma famille paternelle, et maternelle.

Mes chères amies : Zahira, Imène, Meriem, Fatima et Amina.

Tous ceux qui me sentent chers et que j'ai omis de citer.

Ceux qui m'ont encouragé et m'ont aidé d'une façon ou d'une autre.

Tous les membres de ma promotion de biologie moléculaire et génétique que je souhaite le succès.

Tous mes enseignants depuis mes années d'études.

## Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à remercier chaleureusement mon encadreur «Mme BRAHAMI Nabila», Maître de conférences B à l'université de Tlemcen pour avoir accepté de m'encadrer. Ses conseils et ses remarques constructifs étaient très bénéfiques pour mon travail.

Je vous remercie pour m'avoir dirigé et guidé tout le long de ce travail ainsi que pour son soutien, et son encouragement.

J'exprime toute ma reconnaissance à « Mme DALI-YOUCHEF Madjda », Maître de conférences A à l'université de Tlemcen d'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce travail et qui m'a ouvert la porte pour cette spécialité (Biologie moléculaire et génétique). Je la remercie également pour sa compréhension. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.

J'adresse mes plus sincères remerciements à « Mme TRIQUI Chahinez » maître assistante A à l'université de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail. Recevez madame mon profond respect et ma profonde considération.

Il existe plus de 20 régions qui sont impliquées dans la pathogénèse du diabète de type 1 (DT1) identifiées grâce aux approches de gènes candidats et aux études de déséquilibre de liaison (Barett *et al.*, 2009 ; Moussavou *et al.*, 2009).

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

Il est constitué de 3 exons et 2 introns. Le premier exon, long de 42 paires de bases, contrôle la synthèse du peptide signal. Le deuxième exon (187 paires de bases) code pour la chaîne B de l'insuline et une partie du peptide connecteur, le troisième exon dont la taille est de 220 paires de bases, code pour la chaîne B et le reste du peptide connecteur (Steiner *et al.*, 1985).

La région génique HLA de classe II localisée dans le chromosome 6 semble la plus dominante dans la prédisposition au DT1 avec plus de 40% de susceptibilité. Le gène IDDM2 localisé sur le chromosome 11 contribue quant à lui à 10% de susceptibilité au DT1.

En 1984, une étude cas-témoin a démontré pour la première fois une association génétique entre le diabète de type 1 et une région polymorphe localisée à l'extrémité 5' du gène de l'insuline qui correspond à un VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) (Bell *et al.*, 1984).

En effet, le VNTR pourrait 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). Le VNTR basé sur la répétition d'un motif de 14-15 paires de base de séquences riche en Guanine. Le VNTR du gène de l'insuline est regroupé en trois classes d'allèles : classe I, classe II, et classe III.

Les travaux 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).

La mise au point de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par K. Mullis et ses collaborateurs en 1985 a révolutionné la biologie moléculaire et la médecine moléculaire (Saiki *et al.*, 1985). La réaction de polymérisation en chaîne est une technique *in vitro* utilisée pour amplifier à l'aide d'enzymes une région déterminée de l'ADN qui se trouve entre deux régions de séquence ADN connue. Alors qu'autrefois seules de très petites quantités d'un gène spécifique pouvaient être obtenues, la PCR permet maintenant d'amplifier même une seule copie de gène à un million d'exemplaires en quelques heures.

La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. Toutes choses égales par ailleurs, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la

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

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

L'intérêt d'élaborer des amorces permet d'amplifier in vitro des régions spécifiques, dans notre étude c'est le promoteur du gène de l'insuline afin d'obtenir une quantité suffisante pour détecter et d'étudier la différence entre les diabétiques et non diabétiques dans la population Algérienne, et la construction d'une banque d'ADN spécifique à notre population pour la détermination du polymorphisme du gène de l'insuline impliqué dans la susceptibilité au diabète de type 1.

### **Objectif du travail**

Déterminer le risque génétique est une condition fondamentale pour la mise en œuvre des essais de prévention primaire du diabète de type 1 et compte tenu des statistiques élevées du diabète de type 1 en Algérie et l'absence d'études d'associations génétiques chez cette même population.

Le but de cette étude est de concevoir des amorces spécifiques encadrant le VNTR du gène de l'insuline afin d'évaluer, par la suite, le risque conféré par INS-VNTR sur l'apparition du DT1 chez la population Algérienne au cours d'études ultérieures de type cas-témoins ou des études de familles.

## 1. Le diabète de type 1

### 1.1. Définition

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

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

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

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

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

En 2011, environ 490 000 enfants de 0 à 14 ans sont atteints de DT1, avec une augmentation annuelle de l'incidence de 3 %, soit environ 78 000 nouveaux cas par an, mais avec de grandes différences selon les régions (IDF, 2011).

### 1.2. Classification étiologique du Diabète de type 1

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

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

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

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

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

### 1.2.2. Le diabète de type 1 idiopathique (type 1B)

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

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

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

### 1.3. Loci de susceptibilité héritée pour le DT1

À l'heure actuelle, il est prouvé que plus de 20 régions du génome peuvent être impliqués dans la susceptibilité génétique au DT1. Plus de 40 gènes et loci ont été associés. Cependant, Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II sont les principaux impliqués dans la prédisposition au diabète (Barett *et al.*, 2009 ; Moussavou *et al.*, 2009).

L'étude de gènes candidats a été longtemps la principale méthode pour l'identification des gènes de susceptibilité au diabète de type 1, ce qui a permis la découverte de HLA, INS, PTPN22, CTLA4 et IL2 (tableau 1) (Kantárová et Buc, 2007).

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

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

Le premier et le principale gène se situe sur le chromosome 6 au niveau des gènes ou du système HLA de classe II qui présentent l'association la plus forte avec le diabète de type 1 (Appleman *et al.*, 2000 ; Rich *et al.*, 1990).

Le deuxième c'est le gène de l'insuline qui est situé sur le chromosome 11 (Chr.11p15.5), certaines autres régions de susceptibilité ont été rapportées (Knip *et al.*, 1999). Ces différents loci de susceptibilité au DT1 ont été nommés de IDDM3 à IDDM17 (Davies *et al.*, 1994 ; Hashimoto *et al.*, 1994).

## 2. Gène de l'insuline

### 2.1. Structure du gène de l'insuline

Le gène de l'insuline humaine (INS) est situé sur le bras court du chromosome 11 (Gerozissis, 2000), à proximité du gène de l'insulin-like growth factor 2 (IGF-2). Ce gène contrôle la synthèse d'un précurseur de haut poids moléculaire, la pré-pro-insuline. Il est long de 1355 paires de bases et sa région codante comporte trois exons séparés par deux introns (régions non transcrites), qui comportent respectivement 179 et 786 paires de bases.

Le premier exon, long de 42 paires de bases, contrôle la synthèse du peptide signal. Le deuxième exon (187 paires de bases) code pour la chaîne B de l'insuline et une partie du peptide connecteur, le troisième exon dont la taille est de 220 paires de bases, code pour la chaîne B et le reste du peptide connecteur (Steiner *et al.*, 1985).

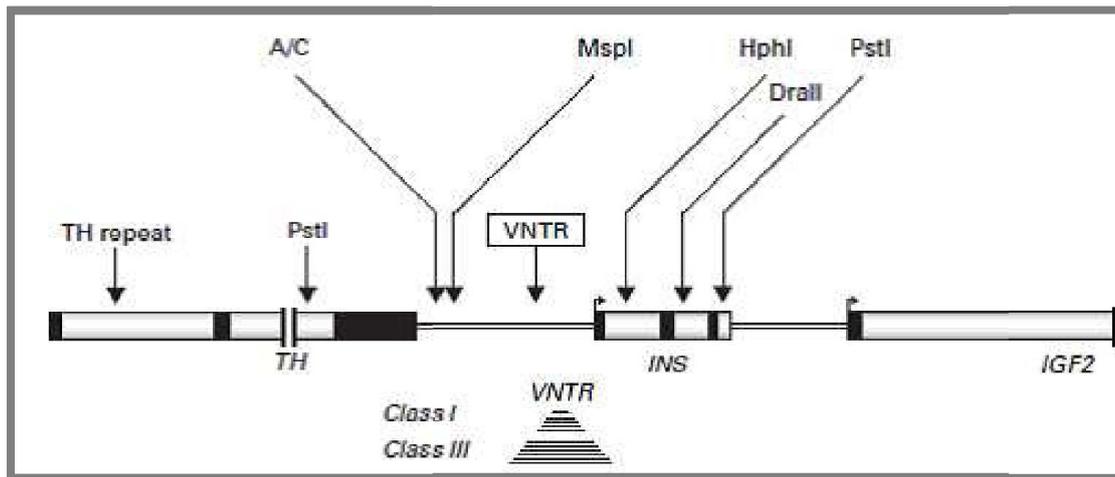
La région du gène de l'insuline localisé au niveau du chromosome 11 sur le bras court est probablement la deuxième plus importante contribution génétique à la variation de la susceptibilité au diabète de type 1; elle contribue pour 10% au risque génétique du diabète (Bain *et al.*, 1992) ; le gène de l'insuline fut admis comme deuxième gène candidat avant même l'avènement des approches par l'étude systématique du génome (Lucassen *et al.*, 1993).

Ce locus est très complexe et des études sur des populations et des familles ont permis de définir trois haplotypes principaux VNTR(Variable Number of Tandem Repeat) associant sept polymorphismes de restriction (Magnan et Ktorza, 2005).

### 2.2. VNTR du promoteur du gène de l'insuline (le locus IDDM2)

Un deuxième variant de susceptibilité se situe dans la région du gène de l'insuline, appelé IDDM2, qui est connu sous le nom du polymorphisme 5' du gène de l'insuline (VNTR-INS) (Hermann *et al.*, 2005). Le variable number tandem repeat (VNTR, ou nombre variable de répétitions en tandem) du gène de l'insuline contribue pour 10 % à la susceptibilité génétique au diabète de type 1, situé dans la région promotrice du gène, il est composé d'un nombre variable de répétitions de bases nucléotidiques en tandem, (Cai *et al.*, 2011).

En 1984, une étude cas-témoin a démontré pour la première fois une association génétique entre le DT1 et une région polymorphe (VNTR) localisée à l'extrémité 5' du gène de l'insuline (Bell *et al.*, 1984).



**Figure1.** VNTR de l'insuline et le groupe des gènes TH -INS- IGF2.

PstI, MspI, HphI et DraII : des sites des enzymes de restriction (Alddafari, 2011).

Ce VNTR du gène de l'insuline (INS-VNTR) est situé à 596 pb en amont du départ de la transcription du gène de l'insuline. Ce dernier est formé de plusieurs répétitions d'un motif oligonucléotidique constitué de 14 unités répétées selon l'ordre : ACAGGGGT (G/C) (T/C) GGGG (Bell *et al.*, 1984 ; Lucassen *et al.*, 1993 ; Coletta *et al.*, 2013 ).

Le polymorphisme (INS-VNTR) a été découvert par l'étude de gènes candidats. Ce dernier a une fréquence relativement élevée dans les populations d'origine européenne (Spielman *et al.*, 1993 ; Bell *et al.*, 1984).

La région (INS-VNTR) appelée également "Insulin-Linked Polymorphic Region"(ILPR) ou encore "Hyper Variable Region"(HVR), est extrêmement polymorphe.

Il en existe au moins une douzaine de formes différentes que l'on peut classer en trois catégories distinctes de VNTR selon leurs longueurs :

- les allèles de classe I constitués de 28 à 44 unités de répétition (courts),
- les allèles de classe II répartis de 45 à 137 unités de répétition (intermédiaires)
- les allèles de classe III composés de 138 à 159 unités de répétitions (longs) (Magnan et Ktorza, 2005 ; Kahn, 1995 ; Dubois-Laforgue, 2007 ; Brookes, 2013).

Les allèles de classe II sont pratiquement absents dans la population caucasienne ; tandis que les fréquences des allèles de classe I et de classe III sont de 0.71 et 0.29 respectivement.

De plus, le génotype homozygote de classe I confère deux à cinq fois plus de risque de développer un diabète de type 1 ; alors que les allèles de classe III semblent fournir une protection contre ce dernier (Bennett *et al.*, 1995 ; Bennett *et al.*, 1997).

Ces allèles (classe I et classe III) ne diffèrent pas seulement par le nombre de répétitions des VNTR, mais aussi par d'autres sites polymorphes situés en amont, à l'intérieur et en aval du gène (Kahn, 1995).

Les différentes études épidémiologiques ont montré que les allèles de la classe I au INS-VNTR confèrent une susceptibilité au diabète de type 1, par la présence plus fréquente de cette classe chez les diabétiques caucasiens (Bain *et al.*, 1992).

Des études sur les polymorphismes des régions flanquantes rapportaient que cette association était limitée aux marqueurs compris dans un intervalle de 19 kb (Owerbach et Gabbay, 1994).

La découverte d'une association entre les allèles de la classe I du VNTR de l'insuline et le DT1 a suggéré qu'un gène (ou plusieurs gènes) dans la région ait contribué à la susceptibilité de la maladie. Mais puisque le VNTR n'a pas affecté la région codante d'un gène connu, des polymorphismes additionnels dans et autour du gène de l'insuline et des gènes flanquant, à savoir le facteur de croissance insuline-like (IGF2) et la tyrosine hydroxylase (TH), ont été identifiés (Lucassen *et al.*, 1993).

Il existe des variations d'expression in vitro du gène de l'insuline en fonction de la classe du VNTR (Bennett *et al.*, 1995).

Concernant les allèles de VNTR de classe I, ces dernières sont associées à de faibles niveaux d'expression d'insuline et de pro-insuline dans le thymus pendant la vie fœtale et lors de l'enfance : ce qui peut conduire à la présence des cellules T auto-réactives anti-insuline (Pugliese *et al.*, 1994 ; Bennett *et al.*, 1995).

A l'inverse, les allèles de classe III sont associés à une faible transcription de l'insuline dans le pancréas, mais à une plus forte expression dans le thymus (Pugliese *et al.*, 1997).

Des études ont montrées la capacité du VNTR en 5' du gène de l'insuline d'adopter des structures particulières (structures quadruplex) in vitro, et prendre des conformations différentes chez les cellules sécrétrices et non sécrétrices d'insuline (Hammond *et al.*, 1993).

En effet, le VNTR pourrait 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).

Aucune étude d'association entre les allèles du VNTR du promoteur du gène de l'insuline et le DT1 n'a été entreprise jusqu'à présent dans la population diabétique Algérienne.

### 2.3. Mutations génétiques et polymorphisme du gène de l'insuline

Les travaux de Lucassen et Julier ont montré l'existence de mutations ponctuelles en amont et dans le gène de l'insuline. Certaines de ces mutations sont retrouvées plus fréquemment chez les sujets diabétiques de type 1 (Danze *et al.*, 1997).

La plupart des mutations de ce gène sont à transmission hétérozygote et constitue la troisième 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 en découle un processus protéotoxique suite à la production et à l'accumulation de ces précurseurs de conformation anormale entraînant un stress du RE et donc une apoptose des cellules pancréatiques (Stoy *et al.*, 2007).

Les mutations récessives du gène INS sont retrouvées dans la plupart des cas dans des familles consanguines. Ces mutations altèrent l'expression de la protéine, à l'état homozygote, une diminution de la synthèse de l'insuline par différents mécanismes : délétion du gène, anomalie de la transcription, mutation 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 constitue un facteur de risque de développer un diabète jusqu'à l'âge de 50 ans (Raile *et al.*, 2011).

D'autres polymorphismes ont été considérés tel que le SNP-23HphI également dénommé un polymorphisme de mini satellite, situé dans la 365<sup>ème</sup> pb en amont de l'INS, en dehors des séquences codantes (Barratt *et al.*, 2004).

Il existe 10 marqueurs SNP non codants qui couvrent le segment de 4.1 kb du gène entier de l'insuline et de ses régions inter-géniques adjacentes. Il a été démontré que dans les populations caucasiennes ces SNP sont en déséquilibre de liaison étanche avec le VNTR. Les associations les plus fortes étaient avec le VNTR et les SNP-23HphI (T/A) et +1140 A/C (Cox *et al.*, 1988 ; Julier *et al.*, 1991 ; Lucassen *et al.*, 1993).

Un certain nombre d'études additionnelles ont exclu les SNPs de la région de 4,1 kb et ont laissé au VNTR la proposition de variante étiologique (Bennett et Todd, 1996). Cette proposition a été principalement basée sur l'association différentielle des haplotypes influencé par VNTR classe III, l'haplotype protecteur (PH) et l'haplotype très protecteur (VPH) (Bennett *et al.*, 1995), un phénomène plus facilement expliqué par la variation de séquences dans le VNTR plutôt que les effets cis des allèles SNP sur ces haplotypes.

En outre, les études d'expression (Paquette *et al.*, 1998) suggéraient que le VNTR pourrait directement changer la transcription de l'INS et de l'IGF2. Cependant, la cartographie fine de la susceptibilité IDDM2 au VNTR était très dépendante à l'idée de base que l'association était limitée à l'intervalle de 4,1 kb. On pouvait conclure qu'un polymorphisme majeur, correspondant au locus IDDM2, a été identifié au sein du VNTR localisé dans le promoteur du gène de l'insuline.

Dans chacune des classes, il a été possible d'isoler un certain nombre d'allèles en fonction du nombre précis d'unités répétitives. Alors que l'allèle nommé 307 de la classe III est le plus fréquent dans la population caucasienne prise en tant que témoin, l'allèle le plus représenté chez les enfants insulinodépendants est l'allèle nommé 814 de la classe I. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Bennett qui montraient des variations d'expression *in vitro* du gène de l'insuline en fonction de la classe du VNTR (Bennett *et al.*, 1995).

En 2004, Barratt et collaborateurs ont indiqué que, tandis que la susceptibilité à la maladie est localisé dans la région de 4,1 kb, il y avait, en plus du VNTR, 2 SNP candidats probables, -23HphI et +1140A/C. Après une analyse génétique plus détaillée de la région IDDM2 pour confirmer les incertitudes entourant la localisation de la variante causale, ils ont trouvé que la susceptibilité au diabète de type 1 dans cette région est localisée dans une région d'environ 2kb au niveau INS, dans l'un des 3 polymorphismes, ceci constitue une révision de la cartographie de l'INS-VNTR (Faas et Trucco, 1994). Mais le VNTR reste le meilleur candidat, puisque fonctionnellement, il contient les multiples sites de liaison pour les facteurs de transcription comme Pur-1 (Lew *et al.*, 2000), et la susceptibilité au diabète de type 1 au niveau de l'INS a été proposé pour apparaître à différents niveaux de l'expression thymique (Vafiadi *et al.*, 1997) considérant qu'il n'y a aucun rôle fonctionnel évident pour les SNP candidats.

### 3. Elaboration des amorces

#### 3.1. Les amorces

##### 3.1.1 Définition des amorces

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

##### 3.1.2. Conception des amorces pour la PCR

La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. En effet, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR. La séquence d'amorce détermine plusieurs choses, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Innis et Gelfand, 1994).

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

##### 3.1.3. Sélection des amorces

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

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

##### Longueur de l'amorce

Comme la spécificité, la température et le temps d'hybridation dépendent en partie de la longueur de l'amorce, ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR. En général, les oligonucléotides

entre 18 et 24 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence, à condition que la température d'hybridation soit optimale. La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation.

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

### **Température de fusion (Tf)**

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

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

### **Spécificité**

La spécificité de l'amorce dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce. Il est évident qu'il y a beaucoup plus d'oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases. Ceci dit, les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié. Une amorce conçue avec une séquence hautement répétitive conduira à une traînée lors de l'amplification d'ADN génomique.

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

### **Séquences d'amorce non complémentaires**

Les amorces doivent être conçues absolument sans aucune homologie intra-amorce au-delà de 3 paires de bases. Si une amorce possède une telle région d'autohomologie, des structures partiellement doubles brin en «épingles à cheveux» peuvent se former, qui perturberont

l'hybridation avec la matrice. Un autre risque connexe est l'homologie inter-amorce. L'homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces peut interférer avec l'hybridation. Si l'homologie se situe à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre amorce, la formation de dimères d'amorce se produira, ce qui, par compétition, empêchera le plus souvent la formation du produit désiré.

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

Les amorces devraient être composées à 45-55 % de GC. La séquence d'amorce doit être choisie de telle sorte qu'il n'y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique. Les suites poly-A et poly-T doivent également être évitées, car elles «respireront» et ouvriront des parties du complexe amorce-matrice. Cela peut réduire l'efficacité de l'amplification. Les suites polypyrimidine (T, C) et polypurine (A, G) devraient également être évitées. Idéalement, l'amorce présentera un mélange presque aléatoire de nucléotides, une teneur de 50 % en GC et une longueur d'environ 20 bases. La  $T_f$  se situera alors entre 56 et 62 °C (Dieffenbach *et al.*, 1995).

### **Séquence à l'extrémité 3'**

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

## **3.2. PCR (réaction de polymérisation en chaîne)**

Le concept technologique de la réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction ou PCR), découvert par Kary Mullis en 1983 (Mullis *et al.*, 1987) et qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993, est aujourd'hui devenu un outil quasiment universel dans le domaine de la biologie. La PCR est une méthodologie hautement sensible et spécifique pour la détection des acides nucléiques. Son usage s'est considérablement étendu à de nombreuses applications, dont l'analyse quantitative d'acides nucléiques spécifiques (ADN et ADNc) dans un échantillon donné.

Les techniques PCR sont devenues essentielles pour beaucoup de procédures communes, telles que le clonage de fragments d'ADN spécifiques, la détection et l'identification de gènes à des fins de diagnostic et en médecine légale ainsi que dans la recherche sur les modes d'expression génique. Plus récemment, la PCR a permis l'exploration de nouveaux domaines, tels que le contrôle de

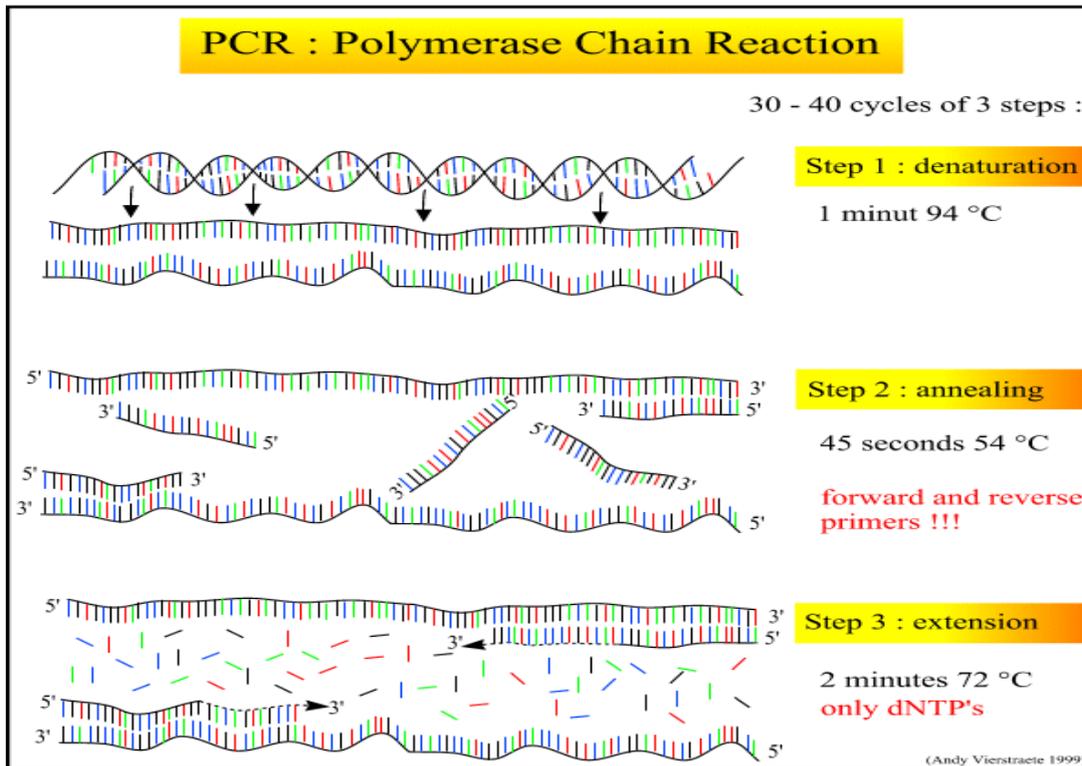
l'authenticité de denrées alimentaires, la présence d'ADN génétiquement modifié et la contamination microbiologique.

### 3.2.1. Principe de la PCR

La PCR est basée sur le mécanisme de la réplication de l'ADN in vivo: l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et «réenroulé». Cette technique comprend les cycles répétitifs suivants:

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

Les oligonucléotides consistent généralement en séquences relativement courtes qui sont différentes les unes des autres et complémentaires des sites de reconnaissance flanquant le segment d'ADN cible à amplifier. Les étapes de dénaturation de la matrice, d'hybridation des amorces et d'extension des amorces constituent un «cycle» dans la méthode de réaction de polymérisation en chaîne. La figure 2 illustre les trois étapes principales du processus d'amplification PCR.



**Figure 2.** Les étapes de l'amplification PCR (image: Andy Vierstraete, 1999)

### 3.2.2. Les acteurs de la PCR

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

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

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

**Les Nucléotides:** dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

### 3.2.3. Instrumentation et composants pour la PCR

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

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

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

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

#### 3.2.4. RT-PCR

Les premières approches de quantification de gènes par PCR ou de transcrits géniques par rétrotranscription PCR (RT-PCR) ont reposé sur une analyse de titration faisant appel à l'utilisation d'une solution titrée d'acide nucléique (ou standard externe) servant à l'élaboration d'une gamme d'étalonnage obtenue par dilutions en série du standard externe (Noonan *et al.*, 1990). Le résultat de l'analyse donne une évaluation de la quantité relative de matrice cible par rapport au standard. Cependant, la précision des résultats obtenus est très souvent limitée, du fait de la grande variabilité d'efficacité d'une PCR à l'autre. L'introduction d'un standard interne coamplifié au cours de la même réaction PCR a permis de corriger en partie la variabilité tube à tube et a conduit au développement de deux méthodologies différentes de quantification : celles par PCR différentielle et celles par PCR compétitive.

Dans les approches de quantification par PCR (ou RT-PCR) différentielle (Frye *et al.*, 1989), une séquence endogène, c'est-à-dire appartenant à un gène dit de référence présent dans l'échantillon testé (séquence endogène d'un gène présent à l'état d'une seule copie par génome haploïde ou transcrit d'un gène domestique dont la transcription est constante et indépendante de l'environnement extracellulaire), sert de standard interne. La séquence endogène standard est coamplifiée avec la séquence cible au cours d'une même réaction PCR utilisant deux couples d'amorces spécifiques. La méthode permet d'évaluer la quantité relative de gène cible par rapport au gène de référence, ce dernier permettant de normaliser la quantité et la qualité d'acide nucléique extrait. Néanmoins, la quantification à l'aide d'un gène endogène comme standard interne nécessite des conditions d'application extrêmement normalisées afin de s'assurer que l'amplification des deux séquences différentes (gène cible et gène de référence) s'effectue avec des efficacités identiques.

Les approches de quantification par PCR (ou par RT-PCR) compétitive utilisent une séquence exogène comme standard interne (Siebert *et al.*, 1992). Ce type d'approche repose sur une coamplification compétitive de la séquence cible avec des quantités connues de standard interne et en présence du même couple d'amorces. Le standard interne (ou compétiteur) est une séquence exogène d'ADN ou d'ARN synthétique que l'on construit de façon à être la plus proche possible de la séquence cible à quantifier, qui doit partager les mêmes sites d'amorçage que la séquence cible, qui doit être amplifié avec une efficacité d'amplification équivalente à celle de la séquence cible et dont le produit d'amplification doit cependant pouvoir en être différencié (Zimmermann *et al.*, 1996). La quantification s'effectue par comparaison du signal PCR correspondant au gène cible avec ceux qui sont obtenus pour chaque concentration du gène compétiteur. Cependant, le choix du compétiteur et la validation des efficacités d'amplification sont difficiles à établir et relativement laborieux. L'autre limite des techniques de PCR compétitive est la nécessité de coamplifier par échantillon, au moins 4 ou 5 dilutions du standard interne pour couvrir le domaine des concentrations attendues en gène cible.

Le nombre élevé de stratégies de quantification proposées dans la littérature reflète bien la difficulté à obtenir des résultats fiables et reproductibles. L'introduction d'une molécule reportée fluorescente dans le milieu réactionnel de PCR et la détection des produits de PCR par une méthode fluorimétrique a conduit au développement récent des techniques de PCR quantitative en temps réel (Higuchi *et al.*, 1993). Ces dernières reposent, non plus sur une détection en point final des produits de PCR formés, mais sur une analyse de la cinétique de la réaction PCR au moyen d'un système capable de détecter « en tube fermé » les produits de PCR formés après chaque cycle d'amplification.

### 3.2.5. Nature exponentielle de la réaction PCR

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

### 1-La séquence du gène de l'insuline (INS)

Le gène de l'insuline humaine (INS) est situé sur le bras court du chromosome 11. Il est long de 1355 paires de bases et sa région codante comporte trois exons séparés par deux introns (régions non transcrites), qui comportent respectivement 179 et 786 paires de bases.

Le premier exon, long de 42 paires de bases, contrôle la synthèse du peptide signal. Le deuxième exon (187 paires de bases) code pour la chaîne B de l'insuline et une partie du peptide connecteur, le troisième exon dont la taille est de 220 paires de bases, code pour la chaîne B et le reste du peptide connecteur.

La séquence du gène INS a été importée de la base de données ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) en introduisant le nom du gène et après avoir spécifié l'espèce humaine (figure 3). La plateforme de la base de données montre clairement où la séquence complète du gène peut être trouvée sous le code ENSG00000254647.

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface. At the top, there is a search bar with 'Human' selected in the dropdown and 'INS' entered in the text field. Below the search bar, there are several navigation and analysis tools. On the left, there is a 'Browse a Genome' section with 'Popular genomes' including Human (GRCh38.p5), Human (GRCh37), Mouse (GRCm38.p4), and Zebrafish (GRCz10). In the center, there are several tool buttons: 'Still using Human GRCh37?', 'Variant Effect Predictor', 'Gene expression in different tissues', 'Find SNPs and other variants for my gene', 'Retrieve gene sequence', 'Compare genes across species', 'Use my own data in Ensembl', and 'ENCODE data in Ensembl'. On the right, there is a sidebar with 'What's New in Ensembl Release 84 (March 2016)' and 'Tweets by @ensembl'.

**Figure 3** : Plateforme de la base de données ensembl.

La séquence du gène est subdivisée en séquences codantes (caractères en rouge) et séquences non codantes (caractères en noir). Celles-ci sont montrées dans la Figure 4.



```

CAGGGGTCTGGGGACAGGGGTCTGGGGACAGGGGTCTGGGGACAGGGGTGTGGGGACA
GGGGTGTGGGGACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTCTGGGGACAGGGGTCTGGGGACAGGG
GTCTGAGGACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTGT
GGGGACAGGGGTCTGGGGACAGGGGTCCGGGGACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTGTGGGG
GACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTCTGGGGACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTCTGGGGAC
AGGGGTGTGGGGATAGGGGTGTGGGGACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTGTGGGGACAGGG
GTCTGGGGACAGCAGCGCAAAGAGCCCCGCCCTGCAGCCTCCAGCTCTCCTGGTCTAATG
TGGAAAGTGGCCAGGTGAGGGCTTTGCTCTCCTGGAGACATTGCCCCAGCTGTGAGC
AGGGACAGGTCTGGCCACCGGGCCCTGGTAAAGACTCTAATGACCCGCTGGTCTGAGG
AAGAGGTGCTGACGACCAAGGAGATCTTCCACAGACCCAGCACCAGGGAAATGGTCCGG
AAATTGCAGCCTCAGCCCCAGCCATCTGCCGACCCCCACCCAGGCCCTAATGGGCC
AGCGGGCAGGGGTTGAGAGGTAGGGGAGATGGGCTCTGAGACTATAAAGCCAGCGGGGGC
CCAGCAGCCCTCAGCCCTCCAGGACAGGCTGCATCAGAAGAGGCCATCAAGCAGGTCTGT
TCCAAGGGCCTTTGCCGTCAGGTGGGCTCAGGATTCAGGGTGGCTGGACCCAGGCCCA
GCTCTGCAGCAGGGAGGACGTGGCTGGGCTCGTGAAGCATGTGGGGGTGAGCCAGGGGC
CCCAAGGCAGGGCACCTGGCCTTCAGCCTGCCTCAGCCCTGCCTGTCTCCAGATCACTG
TCCTTCTGCCATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTG
GGGACCTGACCCAGCCGAGCCTTTGTGAACCAACACCTGTGGGCTCACACCTGGTGA
AGCTCTTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCCGCCGGGA

```

**Figure 5 :** La séquence du motif du VNTR au niveau du promoteur du gène de l'insuline.

L'outil GenBank de la base de données NCBI nous a permis d'avoir une séquence plus complète des séquences 3' et 5' flanquant le gène INS. C'est avec cette dernière séquence que les amorces, encadrant le VNTR du promoteur du gène INS, ont pu être conçues.

## 2- L'outil Primer-Blast

L'outil Primer-Blast est l'outil qui nous permet une conception d'amorces les plus spécifiques de la séquence que l'on veut amplifier. Cet outil (Primer3) (Ye *et al.*, 2012) est retrouvé dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (ncbi) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Figure 6 et Figure 7).

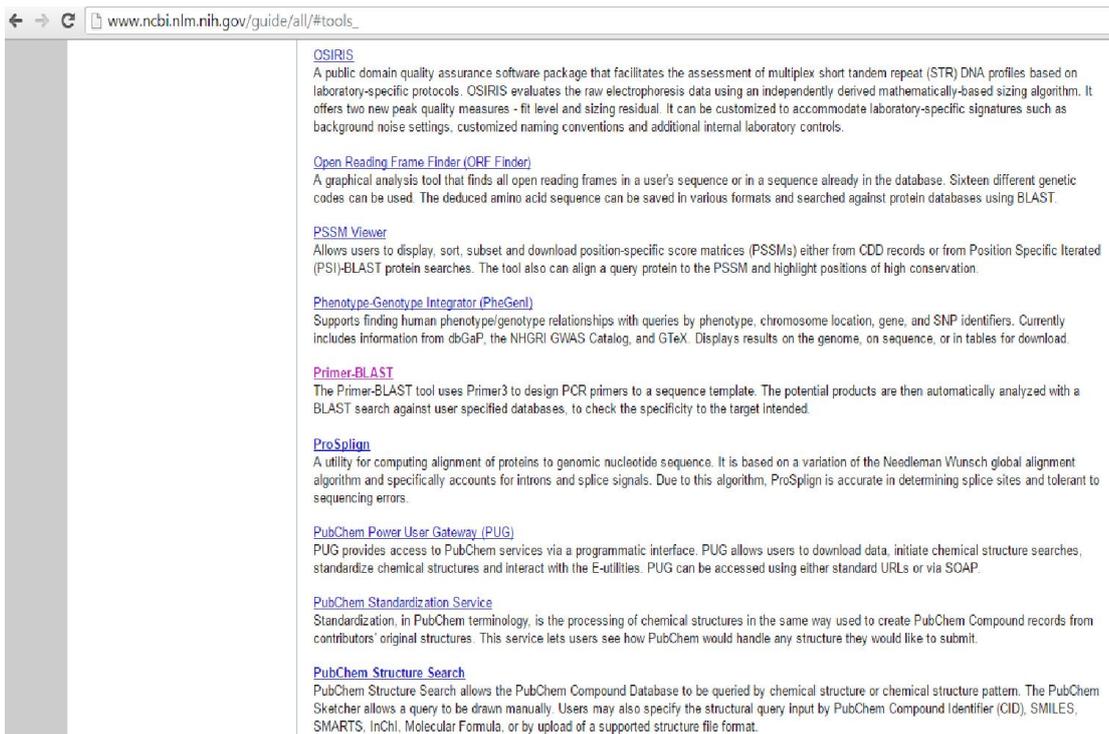


Figure 6 : plateforme de la base de données NCBI.

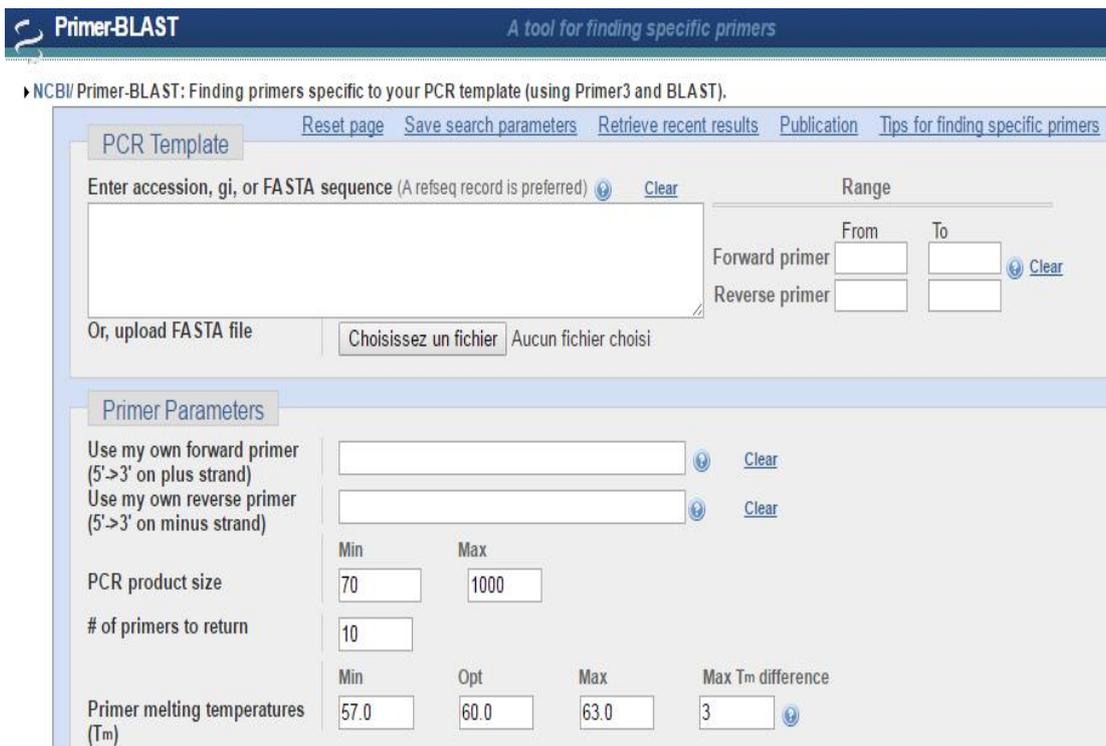


Figure 7: L'outil primer blast

**3. Analyse des Résultats du Primer Blast:**

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

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

### 1. Résultats de la conception des amorces:

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

Nous avons, par la suite, élargie la séquence à amplifier, afin de fournir au logiciel un plus large choix de séquences pour les amorces.

Grâce au logiciel Primer-Blast nous avons obtenue un couple d'amorce spécifique à la région encadrant l'INS-VNTR (figure8).

```

atccatggcggcatcttggccatccgggactggggacaggggtcctggggacaggggtgtggggacaggggtcctgg
ggacaggggtctggggacaggggtcctggggacaggggtgtggggacaggggtgtggggacaggggtgtggggaca
ggggtcctggggacaggggtctggggacaggggtctgaggacaggggtgtggggacaggggtgtggggacaggggt
gtggggacaggggtgtggggacaggggtctggggacaggggtcggggacaggggtgtggggacaggggtgtgg
ggacaggggtgtggggacaggggtctggggacaggggtgtggggacaggggtcctggggacaggggtgtggggata
ggggtgtggggacaggggtgtggggacaggggtgtggggacaggggtctggggacagcagcgcaagagccccgc
cctgcagcctccagctcctcctggtctaattgtgaaagtggcccaggtgagggcttctcctcctggagacattgccccag
ctgtgagcagggacaggtctggccaccgggccccctggtaagactctaatacccgctggtcctgaggaagaggtgctga
cgaccaaggagatctccacagaccagcaccagggaatgtccggaaattgcagcctcagccccagcccatctgcc
gacccccccaccccaggccctaa

```

**Figure 8.** Amorces spécifiques (en jaune) encadrant l'INS-VNTR.

Parmi les dix nouveaux couples d'amorces la septième paire amplifiera un fragment de 622 pb correspondant au promoteur du gène INS et un produit aspécifiques de 3167 pb.

Cette paire d'amorces a été choisi car la réaction de polymérisation en chaine n'amplifie pas des produits au delà de 3000 pb. En effet des produits de PCR de plus de 3000 pb pourraient être difficiles à amplifier, la concentration d'ADN devenant un facteur limitant. En effet plus un produit de PCR est long plus sa concentration doit être élevée pour obtenir un résultat d'amplification satisfaisant (Lorenz *et al.*, 2012).

La température d'hybridation des amorces est de 60°C, une température de 55 C -72 ° C donne les meilleurs résultats (à noter que cela correspond à une longueur de l'amorce de 18-24 bases).

Les longueurs des amorces sont de 17 et 20 nucléotides (figure 9). Les oligonucléotides entre 18 et 24 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence, à condition que la température d'hybridation soit optimale. La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation. En général plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace.

La teneur en GC est de 64.71% et 55% pour l'amorce sens et anti sens respectivement. La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%.

#### Primer pair 7

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCATCTTGGGCCATCC	Plus	17	10	26	59.08	64.71	5.00	0.00
Reverse primer	ATCTCCTTGGTCGTCAGCAC	Minus	20	631	612	60.55	55.00	2.00	1.00
Product length	622								

#### Products on potentially unintended templates

>NC\_000011.10 Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 622  
 Features flanking this product:  
[487 bp at 5' side: insulin preproprotein](#)  
[2234 bp at 3' side: tyrosine 3-monooxygenase isoform b](#)

Forward primer 1 6GCATCTTGGGCCATCC 17  
 Template 2161998 ..... 2161982  
 Reverse primer 1 ATCTCCTTGGTCGTCAGCAC 20  
 Template 2161377 ..... 2161396

>NC\_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 3167  
 Features associated with this product:  
[protein NLR3 isoform X1](#)  
[protein NLR3 isoform X1](#)

Forward primer 1 6GCATCTTGGGCCATCC 17  
 Template 3554181 .....AG..... 3554117  
 Forward primer 1 6GCATCTTGGGCCATCC 17  
 Template 3557267 T.....G.....A 3557251

**Figure 9.** Résultat du Primer blast montrant les caractéristiques de la paire d'amorces choisies.

## 2. Confirmations des résultats:

Nous avons soumis les séquences des amorces à une analyse de confirmation qui se fait par un programme dans le site <http://genome.ucsc.edu/>.

Les résultats de cette confirmation ont donné un produit de 622pb situé sur le chromosome 11 (figure 10) ce qui correspond à la localisation du gène INS.

Donc ces résultats nous confirment la fiabilité et la spécificité des amorces que nous avons conçues.

**UCSC In-Silico PCR**

```

>chr11:2161377-2161998 622bp GGCATCTTGGGCCATCC ATCTCCTGGTCGTCAGCAC
GGCATCTTGGGCCATCCggggactggggacaggggtcctggggacaggggt
gtggggacaggggtcctggggacaggggtctggggacaggggtcctgggg
acaggggtgtggggacaggggtgtggggacaggggtgtggggacaggggt
cctggggacaggggtcctggggacaggggtctgaggacaggggtgtggga
caggggtgtggggacaggggtgtggggacaggggtgtggggacaggggtc
tggggacaggggtcgggggacaggggtgtggggacaggggtgtggggac
aggggtgtggggacaggggtctggggacaggggtgtggggacaggggtc
tggggacaggggtgtgggataggggtgtggggacaggggtgtggggaca
ggggtgtggggacaggggtctggggacagcagcgaagagccccccct
gcagcctccagctctcctggtctaatgtggaagtggcccaggtgagggc
tttgcctcctggagacatttccccagctgtgagcagggacaggtctg
gccaccggccctggttaagactctaatgaccctggtcctgaggaag
agGTGCTGACGACCAAGGAGAT

```

---

**Primer Melting Temperatures**

```

Forward: 62.5 C ggcactctggggcactcc
Reverse: 60.3 C atctcctggtcgtcagcac

```

The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

**Figure 10.** Confirmation des Résultats par le site UCSC in silico PCR

### 3. Perspectives :

Nous avons conçus, avec spécificité le couple d'amorces encadrant le VNTR du gène INS associé au DT1 dans la population européenne pour que plus tard ce VNTR feras l'objet d'une étude cas-témoins pour voir l'association chez la population algérienne. Cette étape est la conception d'amorces encadrant la variation qui serviront à amplifier la séquence d'oligonucleotide contenant le VNTR recherché lors d'une réaction de polymérisation en chaine.

La susceptibilité induite par le (INS-VNTR) a été rapportée à son rôle régulateur dans l'expression du gène de l'insuline, qui varie inversement dans le thymus et le pancréas (Dubois-Laforgue, 2007).

#### 3.1. Les classes de VNTR :

La région (INS-VNTR) appelée également "Insulin-Linked Polymorphic Region"(ILPR) ou encore "Hyper Variable Region"(HVR), est extrêmement polymorphe.

Il en existe au moins une douzaine de formes différentes que l'on peut classer en trois catégories distinctes de VNTR selon leurs longueurs :

- les allèles de classe I constitués de 28 à 44 unités de répétition (courts),
- les allèles de classe II répartis de 45 à 137 unités de répétition (intermédiaires)

-les allèles de classe III composés de 138 à 159 unités de répétitions (longs) (Magnan et Ktorza., 2005 ; Kahn., 1995 ; Dubois-Laforgue., 2007 ; Brookes., 2013).

L'effet de l'INS semble varier selon l'origine ethnique, avec moins d'effets dans les populations non caucasiennes (Undlien et al., 1994). En plus la présence de l'allèle à risque du VNTR-INS augmente le risque de DT1, en particulier chez les personnes qui n'expriment pas le locus HLA de susceptibilité (Hermann *et al.*, 2005).

### **3.2. Etude cas-témoins:**

Une étude cas-témoins (type d'étude observationnelle rétrospective), est une étude statistique utilisée en épidémiologie. Les études cas-témoin sont utilisées pour mettre en évidence des facteurs qui peuvent contribuer à l'apparition d'une maladie en comparant des sujets qui ont cette maladie (les cas) avec des sujets qui n'ont pas la maladie mais qui sont similaires par ailleurs (les contrôles).

Les études cas-témoins sont des études qui sont relativement peu onéreuses et faciles à mettre en place. L'un des succès les plus significatifs de l'étude cas-témoin a été de démontrer le lien entre le tabagisme et le cancer du poumon.

Le diabète constitue mondialement un problème majeur de santé publique avec une prévalence en continuelle progression. En effet selon les récentes estimations de l’OMS, il y aurait près de 346 millions de diabétiques dans le monde dont 10 % seraient diabétiques de type I. Le DT1 affecte jusqu’à 20 millions de personnes dans le monde. L’incidence de la maladie a augmenté rapidement au cours des dernières décennies.

Des prévisions plus récentes montrent que, si les tendances actuelles se poursuivent, le nombre de nouveaux cas de diabète de type 1 sera doublé chez les enfants européens de moins de 5 ans entre 2005 et 2020, et les cas prévalent moins de 15 ans augmentera de 70% (Patterson *et al.*, 2009).

L’Algérie est également concernée par ce fléau qui occupe la deuxième position des maladies chroniques. La connaissance des facteurs de risque pouvant engendrer le diabète de type 1 permet de limiter sa fréquence et contribue à sa prévention.

Parmi ces facteurs les facteurs génétiques qui sont identifiées grâce au dépistage du génome, approches de gènes candidats et aux études de déséquilibre de liaison et sont mis en cause dans environ un tiers de la susceptibilité au diabète type 1 (Perlemuter *et al.*, 2003). Dont le INS-VNTR a été démontré comme associé génétiquement avec le diabète de type 1.

Il est important de bien concevoir les amorces avant toute manipulation ultérieure concernant l’étude cas témoins en Algérie. Pour cela il existe plusieurs outils de la bioinformatique qui permettent de retrouver les séquences de référence de n’importe quel gène et de concevoir des amorces spécifiques.

En effet la bioinformatique est une science née de la rencontre entre la biologie et l’informatique constituée par l’ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l’interprétation informatique de l’information biologique, c’est une science en devenir.

Ce travail m’a permis de m’initier à l’analyse bioinformatique des séquences nucléiques et connaître les étapes nécessaires à une bonne conception des amorces encadrant n’importe quelle région d’un génome donné. Cette étude m’a permis également d’apprendre à analyser les résultats du Primer-Blast et a prendre la bonne décision concernant le choix du meilleure couple d’amorces qui donnerait un produit spécifique.

### A

ADA (American Diabetes Association). **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care, 2009; 32(1): S62-S67.

ADA (American Diabetes Association). **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** Diabetes care, 2012; 35: 64-71.

Alddafari MS. **Etude du Polymorphismes Génétique du Diabète de Type 1 dans La Population de l'Ouest Algérien (INS-VNTR & CTLA-4).** Diplôme de Magister, Génétique moléculaire humaine et santé, 2011; université de Tlemcen.

Appleman Lj, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis Va. **CD28 Costimulation Mediates T cell expansion via IL-2-Independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression.** J Immunol 2000; 164: 144–51.

Arvan P, Pietropaolo M, Ostrov D, Rhodes CJ. **Islet autoantigens: structure, function, localization, and regulation.** Cold Spring Harb Perspect Med, 2012 ; 2: 1-20.

Axel Kahn, généticien, interviewé par Futura Sciences, 2002.

### B

Bain SC, Prins JB, Hearne CM, Rodrigues NR, Rowe BR, Pritchard LE, Ritchie RJ, Hall JR, Undlien DE, Ronningen KS. **Insulin gene region–encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA–DR4–positive individuals.** Nat Genet, 1992 ; Nov;2(3):212-5.

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

Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS. **Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Genome-wide association study and metaanalysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes,** 2009; 4: 703-7.

Bell GI, Horita S, Karam JH. **A Polymorphic Locus near the Human Insulin Gene is Associated with Insulin-dependant diabetes mellitus.** Diabetes, 1984; 33(2): 176-183.

Bennett & Todd. **Human Type 1 Diabetes and the Insulin Gene: Principles of Mapping Polygenes**. *Annu Rev Genet*, 1996; **30**:343-370.

Bennett ST, Lucassen AM, Gough SCL, Powell EE, Undlien DE. **Susceptibility to Human Type 1 Diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus**. *Nat Genet*, 1995 ; **9(3)**:284–292.

Bennett ST, Wilson AJ, Esposito L, Bouzekri N, Undlien DE. **Insulin VNTR alleles specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele**. *Nat Genet*, 1997; **17(3)**: 350-352.

Bouhours-Nouet N, Coutant R. **Aspect clinique et diagnostique du diabète de l'enfant**. EMC Pédiatrie, 2011.

Brookes KJ. **The VNTR in complex disorders: The forgotten polymorphisms ? A functional way forward**. *Genomics*, 2013; Elsevier Masson **101**: 273-281.

### C

Cai CQ, Zhang T, Breslin MB, Giraud M, Lan MS. **Both polymorphic variable number of tandem repeats and autoimmune regulator modulate differential expression of insulin in human thymicepithelial cells**. *Diabetes*, 2011; **60**: 336-44.

Coletta RD, Jorge AL, Brasil D' Alva, Pinto EM, Billerbeck AE. **Insulin- like growth factor 1 gene (CA)<sub>n</sub> repeats and a variable number of tandem repeats of the insulin gene in Brazilian children born small for gestational age**. *CLINICS*, 2013 ; **68(6)**: 785-791.

Cox NJ, Bell GI, Xiang KS. **Linkage disequilibrium in the human insulin/insulin-like growth factor II region of human chromosome 11**. *Am J Hum Genet*, 1988; **43(4)** : 495-501.

### D

Danze PM, Penet S, Fajardi I. **Genetic approach for insulin-dependent diabetes mellitus in clinical practice**. *Ann Biol Clin*, 1997; **55(6)**: 537-544.

Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SCL, Jenkins SC, Palmer SM, Balfour KM, Rowe BR, Farrall M, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. **A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes**. *Nature*, 1994; **371**: 130-136.

Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J. and Dveksler, G.S. **General Concepts for PCR Primer Design**. In: Dieffenbach, C.W, and Dveksler, G.S. (Eds.) PCR Primer: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1995; pp. 133–155.

Drouin P, Blickle JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ. **Diagnostic et classification du diabète sucré, les nouveaux critères**. Diabetes and metabolism, 1999; 25(1): 72-83.

Dubois-Laforgue.D. **Etiologie et physiopathologie du diabète de type 1**. Endocrinologie-Nutrition, 2007 ; Elsevier Masson: 1-18.

### F

Faas et Trucco. **The Genes Influencing the Susceptibility to IDDM in Humans**. J Endocrinol Invest,1994; 17: 477-495.

Frye RR, Benz CC, Liu E. **Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction**.Oncogene, 1989; 4: 1153-7.

### G

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

Gerozissis K. **Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions**. Cell Mol Neurobiol, 2000; 23:1–25.

Grimaldi A., dir. << **Traité de Diabétologie**.>> 2<sup>e</sup> éd Médecine-Sciences, 2009 ; 32-46.

### H

Hammond Kosack MC, Kilpatrick MW, Docherty K. **The human insulin gene-linked polymorphic region adopts a G-quartet structure in chromatin assembled in vitro**. Mol Endocrinol, 1993; 10(2):121-126.

Hashimoto L, Habita C, Beressi JP, Delepine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Rotter JI, Djoulah S, James MR. **Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q**. Nature, 1994; 371(6493):161-4.

Hermann R, Laine AP, Veijola R, Vahlberg T, Simell S, Lahde J, Simell O, Knip M, Ilonen J. **The effect of HLA class ii, insulin and ctla4 gene regions on the development of humoral beta cell autoimmunity.** Diabetologia, 2005; **48**: 1766-75.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. **Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions.** Biotechnology, 1993; **11**: 1026-30.

### I

IDF Diabetes Atlas, Fifth edition. Brussels: **International Diabetes Federation**. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new, 2011.

Innis, M.A., and Gelfand, D.H. Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Eds). **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. London: CRC Press, 1994; pp. 5–11.

### J

Julier C, Hyer RN, Davies J, Merlin F, Soularue P, Briant L. **Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility.** Nature, 1991; **354(6349)**: 155-159.

### K

Kahn A. **Le niveau d'expression du gène de l'insuline est-il relié à la susceptibilité au diabète de type 1?** médecine/sciences, 1995 ; **11(7)** : 1042-1043.

Kantárová D, Buc M. **Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus in Humans.** Physiol, 2007; Res. **56**: 255-266.

Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. **Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide.** Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes Care, 2000; **23**: 1516-26.

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

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

Knip M, Veijola R., Virtanen S.M., Hyöty H., Vaarala O., Akerblom H.K <<**Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes**>>. Diabetes, 2005; **54**(Suppl 2): S125-36.

Knip M. <<**Can we predict type 1 diabetes in the general population?**>> Diabetes care, 2002; **25**(3): 623-5.

Kukko M, Kimpimäki T, Kupila A, Korhonen S, Kulmala P, Savola K, Simell T, Keskinen P, Ilonen J, Simell O, Knip M. . **Signs of beta-cell autoimmunity and hla-defined diabetes susceptibility in the Finnish population: The sib cohort from the type 1 diabetes prediction and prevention study**. Diabetologia, 2003 ; **46**:65-70.

### L

Lew A, Rutter WJ, Kennedy GC. **Unusual DNA structure of the diabetes susceptibility locus IDDM2 and its effect on transcription by the insulin Promoter Factor Pur-1/Maz**. Proc Natl Acad Sci USA, 2000; **97**:12508–12512.

Lorenz, T. C. **Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies**. J. Vis. Exp. (63), e3998, 2012.

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

### M

Magnan C et Ktorza A **Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique. Production and secretion of insulin by the pancreatic  $\beta$ -cell**. EMC-Endocrinology, 2005; **2**: 241-264.

Moussavou A, Ategbo S, Vierin Nzame Y, Mavoungou S, Baye E. **difficulté de la prise en charge du diabète de l'enfant au sud de Sahara : cas du Gabon**. Elsevier Masson, 2009; **16**: 868-869.

Mullis KB, Faloona FA. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction**. Methods Enzymol, 1987; **155**: 335-50.

### N

Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA. **Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction.** Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87** : 7160-4.

### O

Owerbach et Gabbay. **Linkage Of The VNTR/Insulin-Gene and Type I Diabetes Mellitus: Increased Gene Sharing In Affected Sibling Pairs.** Am. J. Hum. Genet, 1994; **54**: 909-912.

### P

Paquette J, Giannoukakis N, Polychronakos C., Vafiadis P, Deal C. **The Ins 5' Variable Number Of Tandem Repeats Is Associated With IGF2 Expression In Humans.** Journal of Biology Chemistry, 1998; **273**:14158–14164.

Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G. **EURODIAB Study Group**, 2009.

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

Pugliese A, Awdeh ZL, Alper CA, Jackson RA, Eisenbarth GS. **The paternally inherited insulin gene B allele (1.428 Fok I site) confers protection from insulin dependent diabetes in families.** J Autoimmun, 1994; **7**: 687-694.

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalcberg LJ, Bartlett RJ. **The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes.** Nat genet, 1997; **15(3)**: 293-297.

### R

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

Rich, Surmin. **Blockade of Insulin-Like Growth Factor I– estimated proliferation of Human osteosarcoma Cells.** J. Natl. Cancer Inst, 1990; **82**:1349-1353.

### S

Sharrocks, A.D. **The design of primers for PCR**. In: Griffin, H.G. and Griffin, A.M (Eds.) PCR Technology: Current Innovations. London: CRC Press, 1994; pp. 5–11.

Siebert PD, Larrick JW. **Competitive PCR**. Nature, 1992; **359**: 557-8.

Spielman RS, Mc Ginnis RE, Ewens WJ. **Transmission test for linkage disequilibrium : the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)**. Am J Hum Genet, 1993; **52(3)** 506-513.

Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC. **Structure and evolution of the insulin gene**. Annu Rev Genet ; 1985;19:463–84.

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

### U

Undlien, D.E., Hamaguchi, K., Kimura, A. **Type 1 diabetes susceptibility associated with polymorphism in the insulin gene region: a study of blacks, Caucasians, and orientals**. Diabetologia, 1994; **37**: 745-749.

### V

Vafiadis P. **Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR Alleles at The IDDM2 Locus**, 1997 Nat Genet, 1997; **15**:289–292.

### Y

Y. Park, G.S. Eisenbarth, S. Taylor, D. Leroith, J. Olefsky (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. **Diabetes Mellitus A Fundamantal and Clinical Text**. Second ed, 2000; Pp. 347–362.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. **Primer-Blast: A tool to design target-specific for polymerase chain reaction**, 2012.

### Z

Zimmermann K, Mannhalter JW. **Technical aspects of quantitative competitive PCR.** Biotechniques, 1996; **21**: 268-79.

## ملخص

**مقدمة:** مرض السكري المعتمد على الأنسولين أو السكري من النوع الأول (DT1) هو مرض مزمن يؤثر على الأطفال والشباب ، و ينتج عن تدمير خلايا بيتا في جزر لانجرهانز ، والنتائج التهاب في الجزر. وهناك أكثر من 20 منطقة تشارك في التسبب في مرض السكري من النوع 1 تم تحديدها من خلال الجينات المرشحة و دراسات ربط اختلال التوازن فيما بينها. جين الأنسولين (INS) على كروموسوم 11 هو على الأرجح ثاني أكبر مساهمة وراثية لمرض السكري من النوع 1؛ فهي تساهم بنسبة 10% في الخطر الوراثي لمرض السكري .

المنطقة ( VNTR ) التي تقع في نهاية 5' من الجين INS تحتوي على مواقع ربط متعددة لعوامل النسخ، مرتبط بحدوث DT1 لدى سكان أوروبا.

**الهدف:** تصميم زوج تمهيد محدد المرافقة ل VNTR في جين الانسولين المرتبط مع DT1 ، لدراسة التنميط الجيني باستخدام PCR.

**الغرض:** زوج التمهيد التي صممت في هذه الدراسة تفيد في دراسة إشراك INS- VNTR في بداية DT1 عند الجزائريين في دراسات لاحقة أو دراسة الحالات والشواهد من الأسر.

**المواد والطريقة:** البحث في تسلسل إشارة جين الانسولين في قاعدة بيانات ensembl و استخدام البرنامج Primer-Blast.

**النتائج:** سمح تفسير النتائج التي قدمها البرنامج Primer-Blast لنا باختيار زوج من التمهيد متكون من 17 و 20 نيوكليوتيدة في الطول الذي اعطانا منتج من 622 نيوكليوتيدة و لديه منتج واحد لانوعي متكون من 3167 pb .

**الكلمات المركزية:** DT1، جين INS ، تمهيد ، INS- VNTR ، منتج لانوعي.

## Résumé

**Introduction:** Le diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1 (DT1) est une maladie chronique touchant l'enfant ou le jeune adulte, il résulte d'une destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, et aboutit à une insulite. Il existe plus de 20 régions qui sont impliquées dans la pathogénèse du diabète de type 1 identifiées grâce aux approches de gènes candidats et aux études de déséquilibre de liaison parmi eux le gène de l'insuline (INS) localisé sur le chromosome 11 est probablement la deuxième plus importante contribution génétique à la variation de la susceptibilité au diabète de type 1; elle contribue pour 10% au risque génétique du diabète. Une région polymorphe (VNTR) localisée à l'extrémité 5' du gène INS contient de multiples sites de liaison pour les facteurs de transcription, a été associée à la survenue du DT1 dans la population européenne. **Objectif:** Nous allons concevoir, avec spécificité le couple d'amorce encadrant le VNTR du gène de l'insuline associé au DT1, pour des études de génotypage par PCR.

**But:** Le couple d'amorces conçue au cours de ce travail servira à étudier l'implication du INS-VNTR dans la survenue du DT1 chez la population Algérienne; lors d'études ultérieures cas-témoins ou des études de familles.

**Matériels et méthodes:** Recherche de la séquence de référence du gène de l'insuline dans la base de données ensembl et utilisation du logiciel primer blast.

**Résultats:** l'interprétation des résultats donnés par l'outil Primer-blast nous a permis de choisir un couple d'amorces de 17 et 20 nucléotides de longueur qui nous donne un produit d'amplification de 622 paires de base et qui présente un seul produit aspécifique de 3167pb.

**Mots clés :** DT1, Gène INS, Amorces, VNTR, INS-VNTR, produit aspécifique.

## Abstract

**Introduction:** Insulin-dependent diabetes or type 1 diabetes (T1D) is a chronic disease affecting children and young adults, it results from destruction of  $\beta$  cells of the islets of Langerhans, and results in insulinitis.

There are over 20 regions which are involved in the pathogenesis of type 1 diabetes identified through approaches of candidate genes and linkage disequilibrium studies among them the insulin gene (INS) on chromosome 11 is probably the second largest genetic contribution to variation in susceptibility to type 1 diabetes ; it contributes 10 % to the genetic risk of diabetes .

A polymorphic region (VNTR) located at the 5 'end of the INS gene contains multiple binding sites for transcription factors, has been associated with the occurrence of T1D in the European population.

**Objective:** We will design, with specific primer couple flanking the VNTR of insulin gene associated with T1D, for genotyping studies using PCR.

**Purpose:** The pair of primers designed in this study serves to study the involvement of INS-VNTR in the onset of T1D among the Algerian population; in subsequent studies or case-control studies of families.

**Material and Methods:** Search of the reference sequence of the insulin gene in ensembl database and use the primer blast software.

**Results:** the interpretation of the findings given by the Primer -blast tool has allowed us to choose a pair of primers of 17 and 20 nucleotides in length that gives us an amplification product of 622 base pairs and has a single nonspecific product 3167pb.

**Keywords:** DT1, INS gene, Primers, VNTR, INS- VNTR, nonspecific product.