

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

LA REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie Animales

N° D'ordre.....

N° De série.....

mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de magister en Génétique moléculaire
Option : génétique des pathologies humaines

Présenté par : M^{elle} BENLATRÈCHE MOUFIDA

Thème

Étude de la relation entre le polymorphisme de la
méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), et la survenue des
complications dégénératives chez le diabétique de type 2 (DNID) dans la
commune de Constantine

Soutenu le 29 Juin 2008

Devant le jury :

Président : C. BENLATRÈCHE
Rapporteur : N. ABADI
Examineurs : D. SATTA
D. KHOUDJA

Prof. CHU. De Constantine
Prof. CHU. De Constantine
Prof. Université Mentouri
M C. Université Mentouri

Année Universitaire : 2007/2008

Remerciements

Mes vifs remerciements s'adressent :

Aux honorables membres du CPM (comité pédagogique du magister) :

Madame Le Professeur cherifa Benlatrèche, Mer le professeur Nourredine Abadi, madame le professeur Dalila Satta, et Madame le professeur Dalila Naimi

Au professeur Cherifa Benlatrèche, grand maître, fierté de la nation, médecin chef de laboratoire de Biochimie au CHUC, et directrice de l'unité de recherche, d'avoir accepté de juger ce travail et m'honoré par sa présidence du jury, et d'avoir ouvert les portes de son laboratoire pour me permettre la réalisation de ce travail,

Très cher professeur merci pour tous, et j'espère vous exprimer ici mon fidèle attachement et mon inaltérable gratitude.

A mon encadreur le professeur Nourredine Abadi Directeur de laboratoire de Génétique et Biologie moléculaire au CHUC pour son attention, sa simplicité et sa modestie, sa sympathie, et sa générosité scientifique.

Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et mon profond respect.

Au professeur Dalila Satta au département des sciences de la Nature et de la Vie et responsable de la filière de Génétique à l'université Mentouri Constantine pour son dévouement, suivi et encouragements durant toute notre formation.

Qu'elle trouve ici le témoignage de mon admiration des qualités Humaines dont elle fait preuve, et mon profond respect : merci madame

A Mer Khoudja Djamèl, exemple de gentillesse et de sagesse, Vous me faites le grand honneur de juger ce travail

Au Docteur Sihèm Amina Hama au CHUC pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique, sa compétence, son sens de responsabilité et son souci de perfection, et qui ma honorer par leurs précieux conseils au cour de la réalisation de ce travail.

Au Docteur Karima Benmebarèk au CHUC dont j'ai pu apprécier les qualité en si peu de temps, merci madame

*Au Docteur Karima Sifi au CHUC pour son suivi, et précieux conseils, lors de la PCR
Au professeur Haddad Mustapha médecin chef de service de médecine de travail, d'avoir ouvert les portes de son service pour me permettre la réalisation de ce travail, et j'exprime ma profonde reconnaissance à tous ses maîtres assistants notamment le Dr Nasri Mustapha, Dr Khaldi, Mouhamed Lamine, Dr Alioua Asma (ep : Khaldi), Dr Chemaa Farida, Dr Chachour Hayet (ep : Benmoussa)*

Au professeur Al Kassèm Lezzar medecin chéf de service d'endocrinologie d'avoir voulu accepté le recrutement de patients Diabétique au niveau de son service, pour son collaboration, A Son maître assistante l'adorable Dr Benmohammed Karima dont je le remercie infiniment,

A tous les médecins résidents de son service pour leur aide appréciable notamment :

Dr Harbi Amina, Dr Habtoun Radia, Dr fahmi Rima, Dr Boufama Houda, Dr Belkhouidja Mérième, Dr Lezzar Manèl, Dr Benayad fariza, Dr Benali Hanène, Dr Naili Radia, Dr Zitouni Zoubir, Dr Benhamada Yacine, et tous les personnels de son service

Je remercie chaleureusement tous les membres : du laboratoire de génétique et de Biologie moléculaire, du laboratoire de Biochimie, de médecine de travail, et de service d'endocrinologie au CHUC pour leurs aides appréciables, pour les inoubliables bons moments et l'ambiance qui a été le bon compagnons de route au cour de la réalisation de ce travail.

A mon adorable binôme dans la technique de PCR : Amèl Abbas quelle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance

Dédicaces

*A vous lumière de ma vie, le plus beau don de dieu, avec vous je partage le plus sacré lien spirituel et affectif : mes parents ; que dieu vous gardent
A tous les membres de ma famille*

A toi très chère leuer Dr KARIMA BENMOHAMMED merci d'existé dans ma vie, merci pour ton amitié, très chère fleur dans une circonférence de sagesse : merci

A vous très chère Pr. Cherifa Benlatrèche, pour mois c'est un honneur et c'est une grande responsabilité d'avoir le droit de m'estimer une de vos post-gradue.

A vous Mr le Pr. Nouredine Abadi, homme des sciences, exemple de simplicité, de gentillesse, et de sympathie qui nous ont tout le temps facilité le contact,

Vous avez donnez à la génétique de notre université, ses moments de gloire

A vous très chère Pr Dallila Satta merci madame pour vous conseils, vous m'avez toujours encouragée, et J'ai eu l'immense chance d'apprendre et j'apprends toujours de votre enseignement et de votre expérience.

A vous M^{me} Sihèm Amina Hamma, exemple de l'esprit scientifique,

A tous mes professeurs

A tous les membres du laboratoire de génétique et de Biologie moléculaire CHUC

A tous les membres du laboratoires de Biochimie CHUC

A tous le personnel du services de médecine de travail CHUC

A tous le membres du service d'endocrinologie CHUC

A tous les Diabétiques

A tout le groupe de ma promotion Génétique des pathologies Humaines (2004-2008) : Amèl, Hanène,

Sabrina, Djalila, Zienèb, Nadira, Abla, Khadidja, Warda, Fèthi et Adèm

A tous mes amies, avec qui je passé des bons moments

A tous ceux qui m'ont aidés de près ou de loin dans la réalisation de ce travail

A tous ceux éprouvent d'affection et du respect envers Moufida.

Introduction

Plus de 100 millions de personnes sont atteints dans le monde de diabète de type 2 (DT2, ou DNID) (1), sa prévalence en Algérie est de 7 à 10%, (7,71% à Constantine) (2). Sa physiopathologie est encore loin d'être élucidée, mais il est à présent reconnu que le déséquilibre glycémique des patients diabétiques de type 2 est la résultante de deux anomalies interdépendantes:

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

La contribution de chacune de ces anomalies au développement de l'intolérance au glucose est variable.

De nombreux arguments sont en faveur d'une composante héréditaire du DT2: concordance élevée chez les jumeaux monozygotes (allant jusqu'à 80 %), forte agrégation familiale, forte prévalence au sein d'ethnies isolées (3). Dans ses formes les plus communes, le DT2 est un syndrome multifactoriel complexe dont l'apparition est déterminée par des facteurs génétiques, en présence de facteurs environnementaux; sa nature polygénique met en jeu des "diabétogènes" d'importance variable, contrôlant des voies métaboliques complémentaires comme le suggèrent les études de modèles animaux chez lesquels plusieurs gènes de l'homéostasie glycémique avaient été inactivés (4), (5).

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

Les complications oculaires, rénales, cardiovasculaires et la neuropathie liées aux diabètes sont pour l'essentiel consécutives au déséquilibre glycémique persistant. La présence d'une microalbuminurie persistante même faible est prédictive de la survenue d'une néphropathie, le pourcentage de diabétiques parmi les insuffisants rénaux en dialyse concerne 2/3 des cas des DT2, confirmant la gravité de cette forme de diabète.

La perturbation du métabolisme cellulaire au cours du diabète touche non seulement le métabolisme de glucides mais également celui de lipides (cholestérol, cholestérol-HDL, cholestérol-LDL, triglycérides).

Des études récentes ont confirmées que le polymorphisme C 677 T de la MTHFR est un facteur de risque de rétinopathie, de néphropathie et de maladies cardiovasculaires chez les diabétiques de type 2 (6), (7).

La MTHFR est une enzyme qui catalyse la conversion de la 5.10 methylenetetrahydrofolate en 5-metyltetrahydrofolate (cofacteur de la remethylation de l'homocystéine vers la méthionine.)

Une déficience sévère en MTHFR est associée à l'hyperhomocystéinémie.

La mutation la plus fréquente du gène de la MTHFR est celle causée par la substitution d'une cytosine par une thymine dans la séquence nucléotidique du gène de l'enzyme en position 677 (C677T) et conduisant à une MTHFR thermolabile. Le sujet peut parfois présenter une hyperhomocystéinémie provoquée par des facteurs environnementaux. Cette mutation conduit à une enzyme ayant un défaut fonctionnel, avoisinant une activité spécifique de 50% pour le sujet homozygote 677TT et de 75% pour le sujet hétérozygote 677CT.

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

Au moment où ce travail a débuté, en 2005, il était connu que l'accumulation de l'homocystéine dans le sang à des concentrations très importantes provoque les complications vasculaires chez le diabétique de type 2 (DNID).

C'est dans ce contexte que nous avons tracé les objectifs suivants :

- Rechercher l'incidence du déficit en MTHFR à travers l'analyse biologique par dosage de l'homocystéine
- Déterminer la relation entre la concentration plasmatique de l'homocystéine et la survenue de complications dégénératives du DT2
- Réaliser l'étude moléculaire du gène MTHFR sur notre population de malades et témoins supposés sains
- Établir la fréquence du polymorphisme MTHFR au sein de la population diabétique de type 2 de la commune de Constantine.
- Rechercher la relation entre le polymorphisme du gène MTHFR (C677T) et la survenue des complications dégénératives du DT2 telles que les rétinopathies, néphropathies, neuropathies et atteintes cardiovasculaires.

1. Définition du diabète

«État d'hyperglycémie chronique (c'est-à-dire de concentration excessive de glucose dans le sang), qui peut résulter de nombreux facteurs génétiques et liés à l'environnement, agissant souvent de concert» (Organisation Mondiale de Santé, ou OMS, 1980).

L'hyperglycémie est elle-même définie de manière chiffrée avec précision comme la glycémie à partir de laquelle apparaissent les complications chroniques du diabète, et en particulier la rétinopathie (8).

L'OMS, dans la dernière révision des critères diagnostiques en 1999, indique que le diagnostic de diabète peut être retenu dans quatre situations différentes:

- Présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) et glycémie (sur plasma veineux) $\geq 2,00$ g/l (11,1 mmol/l) ;
- Glycémie (sur plasma veineux) à jeun $\geq 1,26$ g/l (7,0mmol) ;
- Glycémie (sur plasma veineux) mesurée n'importe quand $\geq 2,00$ g/l (11,1 mmol/l) ;
- Glycémie (sur plasma veineux) deux heures après ingestion de 75g de glucose [test d'hyperglycémie provoquée orale (HGPO)] $\geq 2,00$ g/l (11,1mmol/l).

Pour que le diagnostic de diabète soit retenu en pratique clinique, il convient d'obtenir confirmation par une deuxième mesure glycémique montrant un nouveau résultat anormal, sauf s'il existe des symptômes cliniques. Dans ses recommandations, l'OMS ne propose pas de modalités différentes de diagnostic du diabète durant la grossesse, sinon qu'elle considère comme atteinte de diabète gestationnel toute femme enceinte ayant une intolérance au glucose (IG).

- **Le diabète de type 2**

Le diabète de type 2, appelé auparavant diabète non insulino-dépendant (DNID), est un ensemble des maladies.

Il est beaucoup plus fréquent, que les autres types de diabètes, il s'observe dans la plupart des cas après l'âge de 50 ans.

Il est habituellement asymptomatique, il s'accompagne dans 80% des cas en moyenne d'un surpoids ou d'une obésité.

C'est une maladie grave qui entraîne de nombreuses complications souvent fatales.

En plus des facteurs héréditaires, la maladie est déclenchée par le mode de vie : trop de calories dû en particulier au changement des habitudes alimentaires et trop peu de dépenses physiques.

2. Historique

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

Les Arabes décrivent également les personnes présentant une polyurie et aussi la notion "d'urine sucrée ", selon ce qu'il a été rapporté dans les encyclopédies " Lissan El Arab " et

"El Kamous El Mouhit". Au V^{ème} siècle de l'Hégire (X^{ème} siècle après J.C.), Ibn Sina puis El Rhazi décrivent la maladie diabétique de façon remarquable et énoncent les premières mesures diététiques (9).

C'est à l'Université de Strasbourg, en 1886, qu'Oscar Minkowski et Joseph Von Mehring découvrent le rôle du pancréas. L'ablation du pancréas (ou pancréatectomie) chez le chien est suivie d'un diabète, ce diabète étant corrigé par la greffe de pancréas. Il faut attendre 1921 pour que soit faite la découverte majeure, celle de l'insuline. En 1959 la méthode radio-immunologique, et le dosage de l'insuline dans le plasma ont permis de distinguer les diabètes où l'insuline fait complètement défaut (diabète de type 1 ou insulino-dépendant) de ceux dont la carence en insuline n'est que partielle (diabète de type 2 ou non insulino-dépendant). (8).

3. Épidémiologie

Le diabète sucré est considéré actuellement comme un véritable problème de Santé publique et on parle de plus en plus d'«épidémie de diabète». Même si le diabète de type 1 est en légère augmentation, c'est avant tout le diabète de type 2 qui fait peser la menace. Son augmentation est liée au vieillissement des populations et aux changements de mode de vie, sources de prise de poids et d'obésité (réduction de l'activité physique, alimentation de plus en plus riche en graisses saturées avec diminution des fibres). À l'échelle planétaire, d'après les prévisions de l'OMS, la prévalence du diabète chez l'adulte (≥ 20 ans) était de 4,0 % en 1995 et devrait atteindre 5,4 % en 2025, alors que le nombre des diabétiques devrait passer de 135 à 300 millions surtout du fait d'une démographie galopante dans les pays en voie de développement. De plus, ces chiffres alarmants semblent sous-estimés, l'OMS n'ayant tenu compte pour établir ces prévisions que de l'évolution démographique, avec l'allongement de l'espérance de vie attendue partout dans le monde, et n'ayant pas pris en considération la croissance de

l'obésité, réalité pourtant présente dès aujourd'hui et qui ne devrait que s'accroître dans le futur proche.

Cette «épidémie de diabète» engendre des coûts majeurs, humains et financiers, pour les individus et pour la société, du fait des complications liées au diabète (10).

- **Épidémiologie du diabète de type 2**

Le diabète de type 2 représente, l'essentiel du problème de santé publique constitué par l'«épidémie de diabète» puisque plus de 90% des diabétiques ont un diabète de type 2 dont la croissance dans un futur proche devrait être très forte (11). Il est donc capital de disposer de données épidémiologiques fiables. Ces données sont difficiles à recueillir car ce diabète est le plus souvent asymptomatique, ce qui impose le recours à des mesures glycémiques pour le reconnaître. Pratiquer un dosage sanguin systématique, sur de vastes échantillons représentatifs, pour évaluer le nombre de diabétiques de type 2 dans une population, n'est pas aisé. Cela explique qu'on ne dispose pratiquement d'aucune donnée d'incidence du diabète de type 2, en dehors de quelques populations très particulières, car il est difficile de répéter des mesures glycémiques systématiques chez des sujets ne se plaignant de rien. On doit donc se contenter presque uniquement de données de prévalence pour le diabète de type 2. De plus, il faut souligner que les problèmes de diagnostic du diabète évoqués précédemment rendent difficiles les comparaisons temporo-spatiales de prévalence du diabète de type 2 du fait de l'hétérogénéité des méthodes employées (utilisation de la glycémie à jeun et/ou de l'HGPO) et des modifications fréquentes des critères diagnostiques (10).

- **Prévalence du diabète de type 2**

- **Données internationales :** À l'échelle de la planète, la prévalence du diabète de type 2 peut être assimilée en première approximation à la prévalence du diabète tous types confondus et nous avons vu que, chez les sujets adultes d'âge ≥ 20 ans, cette prévalence était

de 4,0% en 1995 et que l'OMS prévoit une augmentation à 5,4% en 2025, sensiblement identique dans les pays en voie de développement (11). Cette augmentation de 35% en 30 ans ne semble pas énorme à première vue. Pourtant, traduite en nombre de diabétiques, nous avons vu que le chiffre doit passer de 135 à 300 millions entre 1995 et 2025. La prévalence est plus élevée actuellement dans les pays industrialisés et elle le restera, mais l'accroissement du nombre des diabétiques proviendra surtout des pays en développement où une augmentation de 171% est prévue, de 84 à 228 millions, alors que les pays industrialisés devraient connaître une augmentation de 41% seulement, de 51 à 72 millions. Ce contraste dans l'évolution du diabète de type 2 entre prévalence et nombre de patients tient à l'effet de la taille des populations des pays en développement. Ainsi, en 2025, plus de 75% des diabétiques de la planète résideront dans les pays en développement, contre 62% en 1995. Dans les pays en développement, la plupart des diabétiques sont âgés de 45 à 64 ans alors que dans les pays développés, la majorité des diabétiques a plus de 65 ans et cette tendance va s'accroître. Les pays comprenant le plus grand nombre de diabétiques sont aujourd'hui, dans l'ordre : l'Inde, la Chine et les Etats-Unis. D'après les prévisions, le classement devrait rester le même en 2025 (11). Pour toutes ces projections de l'OMS, il faut rappeler qu'elles ne tiennent compte que de l'évolution démographique attendue et qu'elles ne prennent pas en considération l'évolution prévisible de l'obésité dans le monde, ce qui entraîne vraisemblablement une sous-estimation majeure des chiffres de prévalence et de nombre de diabétiques en 2025.

À partir des multiples enquêtes épidémiologiques, malgré les différences méthodologiques précédemment signalées, il est possible de dégager les grandes lignes de la prévalence du diabète de type 2 à travers le monde (12). Le tableau 1 rapporte ces données et met en évidence d'énormes différences de prévalence entre différents groupes ethniques et aussi, à l'intérieur d'une même ethnie, en fonction du lieu d'implantation géographique. Ce résumé ne

traduit pourtant pas qu'imparfaitement les contrastes, pour des raisons de regroupement dans la présentation ; ainsi, par exemple, la prévalence du diabète de type 2 chez les Amérindiens est indiquée < 3 % chez les Indiens Mapuches alors qu'elle est voisine de 1%, et > 20% chez les indiens Pimas d'Arizona alors qu'elle est en fait proche de 50 %. Les comparaisons interethniques soulignent le rôle des facteurs génétiques dans la prédisposition au diabète de type 2 lorsqu'il existe des différences marquées de prévalence du diabète de type 2 dans un même environnement, comme on le voit aux îles Fidji entre les sujets d'origine indienne et les mélanésiens. Les comparaisons intra ethniques mettent en exergue l'influence des facteurs d'environnement ; ainsi, quels que soit l'ethnie, les sujets vivant en zone rurale sont-ils moins souvent diabétiques que ceux habitant en ville (voir Tableau 1) (10).

En Algérie, la prévalence du diabète de type 2 dans la population générale est méconnue. Les données existantes restent parcellaires et sous estimées du fait qu'une enquête de prévalence est souvent coûteuse, difficile à réaliser et prolongée dans le temps. Récemment dans une étude effectuée à Batna, la prévalence du diabète de type 2 dans cette région est estimée à 16,32 % (13).

Tableau 1- Prévalence du diabète chez les sujets de 30 à 64 ans dans différents groupes ethniques et diverses régions du monde.

	< 3 %	3 -10 %	11-20 %	> 20 %
Chinois	Da Qinq (chine continentale)	Singapour	île Maurice	
Indiens (d'Inde)	Inde du sud (rurale)	Dar es-salaam (Tanzanie)	Madras	îles Fidji
			Durban (Afrique du Sud)	
			Singapour île Maurice	
Amérindiens	Mapuches (Chili)	Pimas (Mexique)		Pimas (Arizona)
Mélanésiens	Fidji (ruraux)	Fidji (urbains)		
Micronésiens		Kiribati (ruraux)	Kiribati (urbains)	Nauru

-Incidence du diabète de type 2

Comme nous l'avons dit plus haut, très peu de données d'incidence du diabète de type 2 sont actuellement disponibles puisqu'elles nécessitent des études spécifiques, avec mesures glycémiques systématiques au moins à deux reprises, à distance, chez un même sujet.

En 1999 l'incidence du diabète de type 2, selon l'OMS dans une étude réalisée (durée du suivi 9 années) au Vietnam sur un échantillon de 4849 personnes été de 2,3 %.

4. Physiopathologie du diabète de type 2 :

Pendant de nombreuses années, le diabète de type 2 a été considéré comme une maladie de l'insulino-résistance; plusieurs études ont suggéré que l'entrave à l'action de l'insuline était le défaut majeur identifiable chez les sujets à risque de diabète de type 2 (14), (15), alors que la fonction pancréatique ne devenait anormale qu'à partir du moment où la glycémie à jeun commençait à s'élever (16). Le rôle de l'insuffisance de la sécrétion pancréatique dès le début de la maladie est évoqué.

Il semble que les deux processus de perte de la fonction pancréatique et d'aggravation de l'insulino-résistance évoluent de façon parallèle, plus ou moins indépendamment l'un de l'autre (10).

4.1. Atteinte de la fonction et de la capacité sécrétoire insulinaire du pancréas

La régulation glycémique normale dépend d'une balance entre la production hépatique de glucose, la consommation par les tissus périphériques (essentiellement le muscle et le tissu adipeux) et la production d'insuline par les cellules bêta (β). Chez le sujet normal, une fonction cellulaire bêta s'adapte à la sensibilité périphérique des tissus en augmentant l'insulino-sécrétion de façon à prévenir l'apparition d'une hyperglycémie à jeun. Dans le

diabète de type 2, l'élévation de la glycémie à jeun témoigne d'une défaillance de la cellule bêta engendrant une production d'insuline insuffisante par rapport aux besoins, la production hépatique de glucose n'est plus alors suffisamment contrôlée et augmente contribuant ainsi à l'élévation de la glycémie. Le défaut de l'insulino-sécrétion est la conséquence soit d'une dysfonction des îlots soit d'une diminution de leur nombre, soit de l'association des deux. Par ailleurs, ces anomalies évoluent vers la dégradation.

**Anomalies fonctionnelles*

L'insuline (Figure 1) est une protéine globulaire de 51 acides aminés (5808 Da), composée d'une chaîne A (21 acides aminés) et d'une chaîne B (30 acides aminés) reliées par deux ponts disulfures. La chaîne A contient en outre un pont dissulfure intracaténaire.

L'insuline est synthétisée sous forme d'un précurseur, la prépro-insuline (11500 Da) qui est très rapidement convertie en pro-insuline (86 acides aminés, 9600 Da) par élimination du peptide signal. Le gène de la pro-insuline, formé de 3 exons et 2 introns d'une taille de 1,5 kb, est situé sur le bras court du chromosome 11. Constituée d'une seule chaîne divisée en trois régions appelées A, B, C et comprenant trois ponts disulfures, la pro-insuline, transportée dans l'appareil de Golgi, est alors clivée par deux endopeptidases aux jonctions AC (Lys⁶⁴-Arg⁶⁵) et BC (Arg³¹-Arg³²); une carboxypeptidase élimine ensuite les deux paires d'acides aminés situés aux deux points de clivage, générant le peptide C et l'insuline (17).

Les anomalies fonctionnelles les plus précoces semblent être une altération de la pulsabilité insulino-sécrétoire de l'îlot, une diminution de la réponse sécrétoire avec perte du pic précoce et une anomalie sécrétoire avec une augmentation du rapport pro-insuline/insuline (18), aussi bien à l'état basal qu'à l'état stimulé (19); cette anomalie fonctionnelle semble cependant être un marqueur du diabète de type 2 puisque dans des conditions d'insulino-résistance sans

diabète (obésité), on peut observer un hyperinsulinisme, mais sans hyperpro-insulinémie ; l'importance de cette anomalie est par ailleurs proportionnelle au degré d'hyperglycémie (20).

Un taux élevé d'acides gras peut engendrer des anomalies fonctionnelles. Ceci est démontré par les tests *in vitro*, avec des îlots provenant d'animaux non diabétiques, où une perfusion prolongée d'acides gras désensibilise l'îlot au stimulus glucose. Des travaux réalisés chez l'homme montrent que les acides gras libres sont capables de réduire de 21 % l'insulino-sécrétion chez un sujet obèse non diabétique. Un des mécanismes évoqué dans l'induction du diabète est la glucotoxicité au niveau cellulaire. La cellule bêta possède des transporteurs de glucose de type GLUT-2 dont le nombre et l'affinité pour le glucose apparaissent régulés par le niveau glycémique. Ainsi, plus la glycémie est élevée, plus le nombre et l'affinité des récepteurs sont diminués, engendrant au niveau de la cellule bêta une diminution de l'information du niveau glycémique ambiant et une diminution de la glycolyse intra-îlot qui est un des signaux capable d'induire l'insulino-sécrétion ; de même le glucose est capable d'interférer avec plusieurs phosphorylases bêta cellulaires, elles-même acteur dans l'exocytose.

Cependant ce mécanisme n'explique pas l'installation du diabète de type Mody2 (10).

Mody2 : Maturity Onset Diabetes of the Young, dont on connaît six formes de type 2 survenant chez l'enfant, l'adolescent ou l'adulte jeune (2 à 5 % des diabètes de type 2) le MODY2 est dû à la mutation du gène d'une enzyme nécessaire à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ; les autres MODY codent des protéines qui activent l'expression d'autres gènes probablement impliqués dans la production ou la sécrétion d'insuline (21).

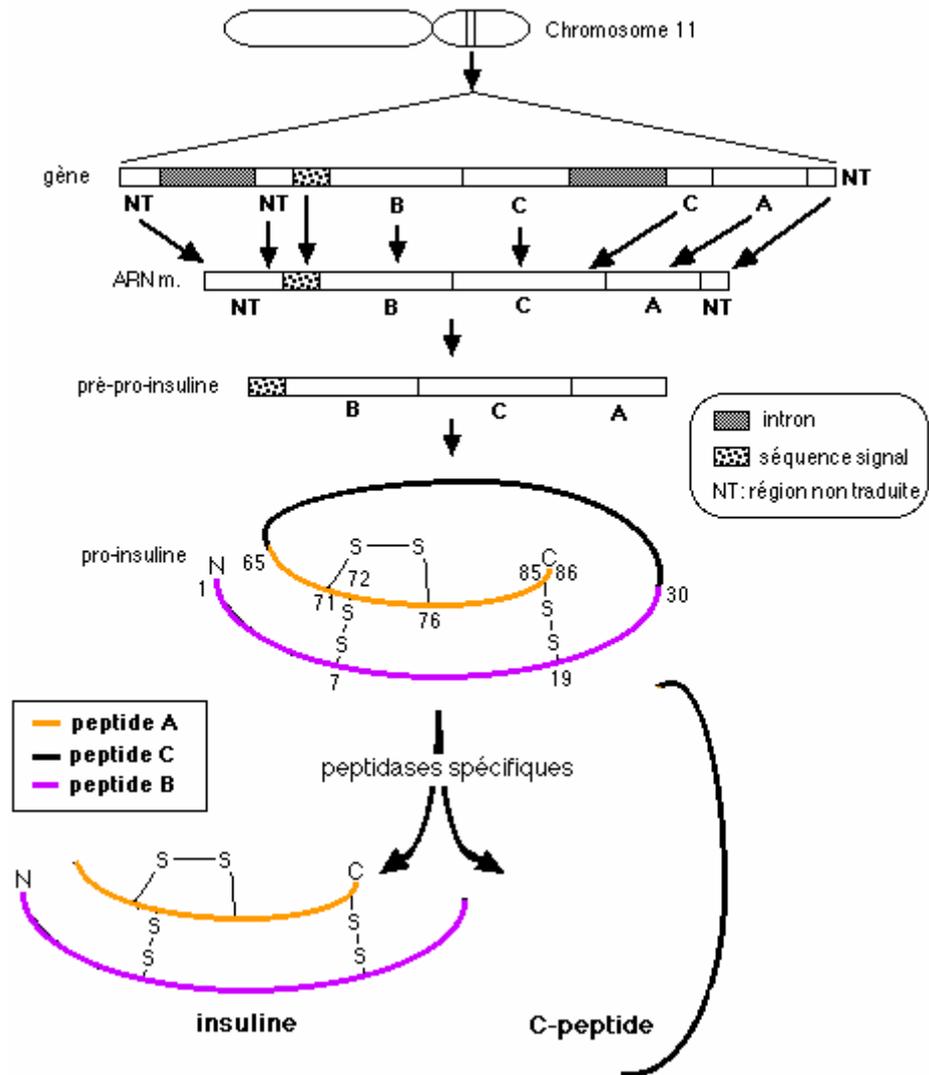


Figure 1 : Biosynthèse de l'insuline

*** Perte de masse cellulaire bêta**

La perte de masse cellulaire β est rapportée par des séries nécropsiques chez les patients diabétiques de type 2 (22).

Différents mécanismes ont été évoqués pour expliquer cette perte : l'amyloïdose et l'apoptose pourraient être impliqués.

° *Amyloïdose*

Le polypeptide amyloïde de l'îlot est coproduit avec l'insuline dans la mesure où le promoteur est commun aux deux gènes. Le développement d'un hyperinsulinisme est donc accompagné d'une augmentation de sécrétion du polypeptide. Ceci conduit à la précipitation de la molécule; et à la formation de fibrilles qui seront à l'origine de la dégénérescence hyaline des îlots (23), induit avec une orientation pro-apoptotique. De plus, les fibrilles ainsi formées peuvent engendrer une activation des canaux ioniques trans-membranaires, là encore, facteur d'apoptose (10).

° *Apoptose*

Il semble qu'une apoptose excessive ou accélérée soit un élément majeur dans la physiopathologie du diabète de type 2 avec une surexpression des gènes de la balance pro-apoptotique, cette surexpression est amplifiée par l'hyperglycémie et la dyslipémie (24). Les mécanismes conduisant à la mort de la cellule sont complexes avec une augmentation de la production des céramides (25), ces céramides (les céramides : sont des lipides mineurs, constituants des sphingolipides et intermédiaires de leur catabolisme) jouerait un rôle dans le changement d'expression des protéines apoptotiques (26), les caspases entre autres (10).

4.2. Insulinorésistance

**** Anomalies des voies de signalisation de l'insuline***

L'insulino-résistance est un trait commun à tous les diabètes de type 2 (27) (28), et chez les sujets non diabétiques ne présentant pas d'intolérance au glucose, l'apparition d'une insulino-résistance musculaire prédit la survenue d'un diabète de type 2 dans différentes populations (15), (29).

Les mécanismes moléculaire conduisant à l'insulino-résistance mis en cause se situent à différents niveaux métaboliques : les transporteurs de glucose (30), la synthèse de glycogène et ses voies métaboliques (31), l'activation de la glycogène synthétase (32).

Les mécanismes moléculaires de la signalisation par lesquels l'insuline régule la captation de glucose et son stockage sont initiés par la liaison insuline-récepteur qui conduit normalement à une auto-phosphorylation de ce récepteur et à une activation de l'*insulin-receptor-tyrosin kinase* qui phosphoryle à son tour des résidus de tyrosine d'IRS-1 (les IRS une famille de protéines, actuellement 4, IRS-1 à 4, dépourvues d'activité enzymatique, ils sont dites adaptatrices, capables d'être reconnues par d'autres protéines et de se lier à elles), IRS-1 étant un des substrats postrécepteur majeur initiant la machinerie cellulaire avec translocation des transporteurs du glucose GLUT-4, et mise en route du métabolisme du glucose (33); la liaison IRS-1/PI-3 kinase conduit à l'activation de la protéine kinase B et à l'induction de la cascade autophosphorylante aux nombreux potentiels dont l'activation de la glycogène synthase (34). Une entrave à l'activation de la glycogène synthase musculaire représente un défaut majeur qui corrèle parfaitement avec la résistance à l'insuline du métabolisme non oxydatif chez les patients diabétiques de type 2 (33) ; Cette anomalie est retrouvée chez les apparentés encore indemnes de toute anomalie du métabolisme glucidique et chez les patients intolérants au glucose. Il semble donc que c'est un des premiers mécanismes de la maladie (35), (36), la combinaison des deux processus étant le plus probable; la protéine kinase C et la tyrosine phosphatase 1B sont aussi deux acteurs de l'insulino-résistance et deux cibles thérapeutiques potentielles à ne pas oublier. En effet, la PKC inhibe l'activation des tyrosines kinases en phosphorylant les radicaux sérine et thréonine et la tyrosine phosphatase 1B désactive la première étape de la signalisation de l'insuline ; toutes les deux peuvent donc entraver le message cellulaire induit par l'insuline (10).

****Anomalie du bêta hydroxystéroïde déshydrogénase***

À cette insulino-résistance de type moléculaire s'ajoutent d'autres mécanismes de type hormonaux. C'est ainsi que l'expression intramusculaire de la 11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 qui assure la synthèse de cortisol actif à partir de la cortisone inactive est augmentée chez les patients présentant une intolérance au glucose ou une insulino-résistance et cette augmentation est corrélée avec le degré d'insulino-résistance (37).

**** Rôle des acides gras libres et des acides gras intramusculaires***

L'augmentation des acides gras libres est un facteur d'insulino-résistance et est une anomalie fréquemment constatée chez les patients diabétiques de type 2. Les acides gras libres ont deux autres effets bien démontrés, d'une part ils diminuent la clairance métabolique de l'insuline, et ils sont capables de réduire la sécrétion de la cellule bêta.

L'élévation des acides gras libres résulte d'une augmentation de la lipolyse (38).

C'est cette élévation en contenu qui peut finalement être un frein à l'entrée des acides gras entraînant leur rémanence au sein du secteur plasmatique ; cet excès de lipides intramusculaire et son rôle dans l'insulino-résistance sont confirmés par les études de composition musculaire faites autrefois sur biopsie et aujourd'hui en résonance magnétique (RMN) : l'augmentation des acides gras en intramusculaire est le facteur qui est le plus corrélé à l'insulino-résistance. (39), (40), (41).

Une surexpression de la lipoprotéine lipase au niveau des muscles est associée à une glycémie élevée et une insulino-résistance et tout laisse donc à penser qu'il s'agit d'une augmentation de la mise à disposition des acides gras au niveau intramusculaire même (42) (43) (44). Ce phénomène est corroboré par les études interventionnelles de prévention du diabète de type 2 qui ont démontré que plus la capacité à oxyder les acides gras est augmentée (par l'activité

physique) plus l'insulino-résistance est diminuée et plus l'incidence du diabète de type 2 baisse (45) (46).

D'autres facteurs peuvent également intervenir dans l'insulinorésistance parmi les quels la leptine (47) (48), l'adiponectine (49) (50), l'adiponutrine (51), la résistine (pour résistance à l'insuline) qui sont des molécules protéiques sécrétées par l'adipocyte (52) (53) et les molécules inflammatoires (cytokines, TNF, IL6...) (54), (55), (56), (57), (58).

Cette insulinorésistance est rencontrée dans différent tissus et organes : muscles (59), vaisseaux sanguins (60), (61), (62), (10), et tissus adipeux (58).

4.3. Processus d'auto- aggravation (la glycémie, la glycosylation...)

Enfin, de nombreux arguments montrent, qu'une fois enclenché, le diabète de type 2 est à l'origine d'un cercle d'auto-aggravation, véritable cercle vicieux. Nous avons déjà vu l'effet toxique de l'hyperglycémie elle-même qui peut-être inducteur d'apoptose au niveau de la cellule bêta.

Une fois apparue, l'hyperglycémie est un facteur de diminution de l'insulino-sécrétion, et de fait induit une autoaggravation (63). L'insuline synthétisée subit une glycation et perd une partie de son activité au moment où elle est sécrétée, probablement par perte de sa capacité de liaison avec le récepteur.

Le problème de glycation de l'insuline ne se pose pas dans le diabète de type 1 puisque l'insuline injectée en sous-cutanée diffuse immédiatement (10).

4.4. Rôle du foie

Principal organe producteur de glucose à jeun (64), le foie contribue pour environ 25 % à l'utilisation du glucose ingéré lors d'un repas. Il intervient donc sûrement dans l'hyperglycémie du diabète de type2, mais son rôle est difficile à appréhender, l'étude directe du fonctionnement hépatique est en effet limitée chez l'homme, pour des raisons éthiques(65).

Des avancées techniques (meilleure utilisation des traceurs isotopiques, mesure du contenu hépatiques en glycogène par RMN métabolique) et conceptuelles (existence d'une autorégulation de la production hépatique de glucose) permettent cependant de mieux préciser comment des anomalies de la production et de l'utilisation du glucose par le foie participent à l'hyperglycémie des diabétiques de type2, et quel rôle les acides gras libres jouent dans ces anomalies (10)

**** Production de glucose.***

Le glucose produit en excès provient d'une néoglucogenèse accélérée, ses précurseurs (acides aminés, lactate, glycérol) étant plus disponibles et davantage captés par le foie.

des perturbations surajoutées à la néoglucogenèse, impliquant les autres voies métaboliques du glucose-6-phosphate (couple glucose-6-phosphate/glucokinase, métabolisme du glycogène hépatique), accroissant la production endogène de glucose (10),(16),(66),(67),(68), (69),(70).

**** Utilisation splanchnique du glucose***

Avant de parvenir à la circulation systémique, le glucose ingéré doit traverser un double filtre, intestinal puis hépatiques. La réduction de l'utilisation « splanchnique » du glucose ingéré peut alors contribuer à l'hyperglycémie postprandiale: ce défaut a été constaté chez les diabétiques de type2 par certains auteurs, mais même dans les conditions postprandiales, il

joue un rôle quantitatif mineur par rapport à la réduction d'utilisation périphérique du glucose(71), (72), (73), (74), (75) (76), (77), (78)

Ainsi le métabolisme hépatique du glucose est profondément et précocement altéré chez les diabétiques de type2. L'obésité et l'afflux d'acides gras libres au foie qu'elle implique stimulent la néoglucogénèse et diminuent l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production endogène de glucose. Mais son élévation nette, et le défaut d'utilisation splanchnique du glucose, nécessitent des perturbations surajoutées concernant le métabolisme hépatique du glucose-6-phosphate et du glycogène, dont la nature reste à préciser (10).

- Le rôle d'autres organes producteurs et utilisateurs de glucose comme le rein (79), ou l'intestin (76), ne peut donc pas être distingué lors d'études métaboliques réalisées sur l'organisme entier (10).

5. Facteurs de risque (80)

• La glycémie :

Des études prospectives ont montré que les individus ayant des glycémies, tant à jeun qu'après HGPO, juste en dessous du seuil définissant le diabète avaient un risque considérablement accru de devenir diabétiques ; ceci a entraîné la création de la catégorie des "intolérants aux hydrates de carbone " dans la classification du NDDG de l'OMS et l'adoption de mesures préventives vis-à-vis de ces sujets.

• L'âge :

La prévalence et l'incidence du DNID augmentent avec l'âge dans la plupart des populations étudiées à travers le monde ; il semble que le vieillissement favorise le développement d'un surpoids et entraîne une résistance des récepteurs à l'insuline.

L'allongement de l'espérance de vie est une des explications de l'accroissement de la fréquence du diabète dans le monde. Une exception apparente à cette règle est constituée par la population indienne des Pimas chez qui l'incidence du diabète est à son maximum entre 25 et 44ans chez les hommes (5,4% par an) et entre 35 et 54 ans chez les femmes (5,9 % par an) avant de chuter considérablement chez les sujets plus âgés des deux sexes ; sans doute les facteurs responsables du diabète chez les Pimas sont moins présents chez les plus vieux ou bien les individus les plus prédisposés au diabète ont démasqué leur DNID plutôt ; cette dernière explication est sous-tendue par l'hypothèse que le DNID, déterminé par plusieurs facteurs ; apparaît lorsque la somme cumulée de ces différents facteurs atteint un certain seuil.

- **L'obésité :**

Elle est considérée par l'OMS comme le plus grand facteur de risque du diabète; mais l'interaction avec les facteurs génétiques apparaît essentielle.

- **L'activité physique :**

même si l'interaction entre le régime, l'exercice et l'obésité sont complexes, si le rôle respectif de chacun de ces facteurs apparaît difficile à isoler et si la quantification de l'exercice physique reste imprécis, le rôle protecteur de l'activité physique semble tout à fait incontestable; le transfert de la campagne vers la ville comme l'émigration s'accompagnent de façon quasi systématique d'une réduction des dépenses physiques par adoption d'un mode de vie plus sédentaire; il est certain que l'évolution sociologique très rapide des pays en voie de développement rend apparent le rôle du mode de vie.

Dans les pays occidentaux, les mutations sont faites beaucoup plus lentement ; ce qui a sans doute permit aux individus de mieux s'adapter.

- **L'alimentation** :

Le régime alimentaire contribue au développement du DNID de deux manières :

- à travers l'apport de calories et l'obésité qui peut en résulter, et si l'activité physique est réduite.

- la constitution qualitative des aliments semble intervenir dans le déclenchement du DNID chez des individus génétiquement prédisposés, indépendamment de l'obésité. La controverse persiste toujours concernant le rôle de la consommation du sucre pur dans l'induction du DNID par contre la relation inverse entre la ration des fibres alimentaires et le diabète paraît mieux établi.

- **Le stress psycho-sociologique dû à la vie moderne** :

Il est possible que le stress intervienne dans l'accroissement du DNID dans les sociétés industrialisées, indépendamment des facteurs alimentaires et de la sédentarité (81).

6. Complications

Le diabète de type 2 entraîne des complications nombreuses, très invalidantes et qui sont d'autant plus redoutables qu'il n'existe pas (ou peu) de signes cliniques au début de la maladie, le développement progressif de l'hyperglycémie est bien toléré et souvent asymptomatique pendant plusieurs années. Cependant, au cours de cette période, l'hyperglycémie entraîne des effets délétères qui ne se manifesteront cliniquement que plusieurs mois ou années plus tard, à un stade parfois très évolué (17).

6.1. Complications métaboliques

Si l'on s'accorde bien pour dire qu'il y a non pas un, mais des diabètes, nous ajouterons qu'il y a pour un sujet diabétique donné non pas un, mais des statuts métaboliques différents (10).

1- *Acidocétose diabétique* :

-Définition :

L'acido-cétose est la résultante clinique et biologique d'un trouble métabolique, ionique et hydrique lié à la carence absolue ou relative en insuline. Elle se définit de façon arbitraire par un PH < 7,2 et une hyperglycémie ≥ 3 g/l (16,7 m Mole/L), cette acidose étant en rapport avec une concentration excessive de corps cétoniques.

La prévention et le traitement reposent sur l'administration la plus précoce possible d'insuline à dose le plus souvent faible et sur la recherche et le traitement des circonstances déclenchantes (82).

L'acidocétose est une complication métabolique aiguë qui met en jeu le pronostic vital. Sa fréquence est variable.

L'incidence annuelle de l'acidocétose était estimée à 12,5 pour_mille patients diabétiques (10).

2- *Coma hyperosmolaire* :

Une forme grave de décompensation du diabète sucré. Caractérisée par l'association d'une hyperglycémie et d'une déshydratation majeures avec troubles de la conscience sans cétozes(10). Cette hyperglycémie est responsable de la glycosurie dès lors que le seuil rénal du glucose en général de 1,80g/l est dépassé. Dans la mesure où une molécule de glucose filtrée par le rein entraîne 18 molécules d'eau, la glycosurie est responsable d'une diurèse osmotique, puis d'une déshydratation (la perte d'eau est en moyenne de 5 à 10% du poids du corps, soit environ 5 à 6 litres pour un adulte de corpulence moyenne) (82).

3- *Acidose lactique* : (10)

Les critères diagnostiques sont :

- ° Un taux de lactate artériel dans le sang total supérieur à 5-6 mmol/l ;
- ° et un pH artériel égal ou inférieur à 7,35.

L'acidose lactique est la cause la plus fréquente d'acidose métabolique. Son diagnostic doit être évoqué devant : un coma de stade I ou II, une tachypolypnée (c'est la dyspnée d'acidose), une asthénie musculaire majeure, des douleurs abdominales, et une hypothermie.

L'acidose lactique est considérée comme associée à une mortalité élevée.

6.2. Complications dégénératives

L'hyperglycémie chronique qui définit les diabètes, quelle qu'en soit la cause, se caractérise par l'apparition retardée de lésions caractéristiques, et pour certaines spécifiques, dont les conséquences cliniques les mieux caractérisées se manifestant au niveau de la rétine, des glomérules rénaux, des nerfs périphériques, ainsi que dans la paroi des gros vaisseaux (10).

- La Rétinopathie diabétique

La RD est une maladie de capillaire rétinien. On observe une disparition des péricytes qui sont les cellules qui entourent les capillaires. Les cellules endothéliales des capillaires ne sont plus régulées par les péricytes et vont être plus volumineuses et plus nombreuses ; on note également une membrane basale qui devient trois fois plus épaisse que la normale. On assiste alors à une rupture de la barrière hémato-rétinienne, conséquence d'une altération des jonctions inter endothéliales. Va ainsi surgir une hyperperméabilité du réseau capillaire qui correspond à la diffusion du colorant lors de l'angiographie fluorescéinique.

Des anomalies hémorhéologiques vont perturber encore plus le fonctionnement des capillaires. On décrit une augmentation de l'agrégabilité plaquettaire et érythrocytaire, et des variations de concentrations en divers facteurs (antithrombine III, facteur VIII...).

La néovascularisation va être l'aboutissement de ces dysfonctionnements. La modification de l'architecture des capillaires va provoquer des zones d'ischémie rétinienne qui vont être le

point d'appel de néovaisseaux, redoutables. Ils seront responsables (sans traitement) d'hémorragies dans le vitré, de voiles gliaux, de décollements de rétines, de cécité (83).

La rétinopathie diabétique (RD) reste une cause majeure de malvoyance et de cécité dans le monde. Les patients diabétiques ont une diminution de la sensibilité cornéenne dont l'importance serait corrélée à la sévérité de la RD.

Des modifications transitoires de la réfraction sont fréquentes chez les diabétiques, elles surviennent lors d'un déséquilibre glycémique aigu. Les diabétiques peuvent présenter une diminution de leur pouvoir d'accommodation. Elle serait liée à une augmentation progressive et précoce de l'épaisseur du cristallin aboutissant à une cataracte (10).

- la néphropathie diabétique

Pathologie du glomérule secondaire au diabète. Ainsi il s'agit d'une glomérulopathie (avec une protéinurie majoritairement constituée d'albumine, une hypertension artérielle et un déclin rapide de la filtration glomérulaire) attribuable à l'hyperglycémie chronique. En général, devant une glomérulopathie chez un diabétique, on retient le diagnostic étiologique de néphropathie diabétique, par argument de fréquence, s'il existe une rétinopathie diabétique(10).

La prévalence de la rétinopathie est de 40 % après 10 années de diabète (84), (85). La prévalence de la néphropathie, nulle avant 5 ans atteint 40 % après 15 ans d'hyperglycémie(85).

- la neuropathie diabétique

La neuropathie diabétique est un désordre extrêmement hétérogène qui comprend une très grande variété d'anomalies qui affecte à la fois le système nerveux périphérique proximal et

distal, sensitif et moteur aussi bien que le système nerveux autonome. Une manque de connaissance et une prise en charge inappropriée de la neuropathie diabétique conduisent à une augmentation substantielle des coûts en santé publique : au moins la moitié des ulcérations du pied pourrait être évitée par une éducation plus efficace des patients et une prise en charge plus adéquate.

Dans le diabète de type1 et dans le diabète de type2, la prévalence d'une neuropathie varie avec à la fois la sévérité et la durée de l'hyperglycémie.

Si des facteurs génétiques et d'environnement modulent le risque de manifestation clinique des complications dégénératives chroniques, il est indiscutable, et tous les modèles animaux le démontrent, que le facteur primordial dans la genèse de ces complications est l'hyperglycémie chronique.

La présence de micro-anévrismes dans le myocarde a été rapportée. Ces altérations pourraient participer néanmoins à la « cardiopathie diabétique » mais la prévalence réelle des micro-anévrismes dans ce contexte reste discutée (10).

· ***Micro-angiopathie et Macro-angiopathie*** :(17).

L'hyperglycémie chronique (évaluée par le dosage de l'hémoglobine glyquée : l'HbA1c) est un déterminant majeur des complications microvasculaires. L'hyperglycémie mais aussi l'insulinorésistance jouent de même un rôle important dans la pathogenèse des complications macrovasculaires.

Les complications sont globalement identiques dans les différents types de diabètes (hors les formes exceptionnelles, comme le leprechaunisme); cependant, leurs fréquences et leurs sévérités sont variables. Différents paramètres entrent en jeu, comme l'âge d'apparition et la durée de la maladie, le degré d'hyperglycémie, les pathologies associées (l'obésité,

l'hypertension artérielle "HTA", et les dyslipidémies sont très fréquentes dans le diabète de type 2), les traitements, certains facteurs génétiques...

1. Complications microvasculaire (microangiopathie) :

La micro-angiopathie diabétique s'exprime par une rétinopathie, une néphropathie et une neuropathie. Les principales caractéristiques de la micro-angiopathie sont : une augmentation du débit, de la pression et de la perméabilité capillaire, avec une transmission directe, sans autorégulation hémodynamique, de la pression artérielle systémique ; une augmentation de leur membrane basale et de la matrice extracellulaire. Avec le temps, ces anomalies s'aggravent et deviennent irréversibles ; la perméabilité augmente, les capillaires s'obstruent, entraînent une perte des cellules microvasculaires. Ces anomalies entraînant des œdèmes et des ischémies, notamment rétiniennes, avec angiogenèse (développement de néovaisseaux peu fonctionnels en réaction à l'hypoxie) ; au niveau rénal, une augmentation de la filtration glomérulaire, probablement liée à une altération de la résistance artériolaire rénale, s'installe, suivie d'une protéinurie et d'une glomérulosclérose. Il existe une corrélation étroite entre la sévérité de ces complications, le degré de l'hyperglycémie et la durée du diabète. Une valeur seuil, d'environ 7 mmol/l à jeun, au-dessous de laquelle ces complications deviennent rares.

2. Complications macrovasculaires (macroangiopathie) :

Le diabète est associé à une athérosclérose, apparaissant généralement de manière précoce, source notamment d'insuffisance coronarienne et d'artérite des membres inférieurs. L'athérosclérose est devenue la première cause de décès des diabétiques. La corrélation entre le degré de l'hyperglycémie et la sévérité de la macroangiopathie est différente de celle des microangiopathies. Contrairement aux microangiopathies, il n'existe pas de valeurs seuils de glycémie au-dessous desquelles les complications macrovasculaires seraient très diminuées.

L'insuffisance coronarienne et les accidents vasculaires cérébraux sont 2 à 5 fois plus fréquents que dans la population non diabétique.

Il est à noter que l'ischémie myocardique a la particularité d'être beaucoup plus souvent indolore chez les diabétiques, probablement en raison d'une neuropathie associée. Par ailleurs, l'artérite des membres inférieurs est 4 fois plus fréquente que chez les non diabétiques ; elle est caractérisée par la fréquence des gangrènes conduisant à des amputations.

La pathogenèse de l'athérosclérose chez les diabétiques débute par un dysfonctionnement endothélial, étant secondaire à l'insulinorésistance et à l'hyperglycémie.

II. Biologie moléculaire et DNID

Comme dans le cas du type 1, l'héritabilité du diabète de type 2 est indéniable : la concordance entre jumeaux monozygotes est de 50 % à 80% et le LS (rapport de la prévalence d'une affection dans la fratries comportant un sujet affecté sur sa prévalence dans la population générale, utilisé comme indice pour apprécier l'agrégation familiale) est de 10. Il s'agit ici encore d'une pathologie à l'évidence polygénique qui, en outre, est caractérisée par l'association d'une anomalie de la réponse insulinosécrétoire au glucose et d'une diminution de la sensibilité tissulaire aux effets de l'insuline, traduisant clairement la double origine de cette pathologie.

Ces pathologies polygéniques reposent sur l'hypothèse de l'association d'un grand nombre de variants de susceptibilité dans de très nombreux gènes candidats, considérés individuellement comme mineurs car ne pouvant conférer à eux seuls une susceptibilité significative. Toutefois, il est également possible de considérer que certains de ces gènes jouent un rôle plus déterminant (gènes « majeurs »), les autres gènes ne pouvant au mieux que moduler l'expression et l'évolution de la maladie.

Parmi l'ensemble des gènes candidats qui ont été étudiés à ce jour, nous citons quelques uns qui ont été décrits avec des associations significatives entre le diabète de type 2, d'une part, et un polymorphisme ou une mutation à l'intérieur du gène correspondant, d'autre part : gène de la glucokinase; gène du récepteur au glucagon ; gène d'IRS-1; gène de la glycogène synthase; gène de Rad ; gène du récepteur aux sulfonylurée ; gène de la *fatty acid binding protein 2* ; gène du récepteur adrénergique β_3 ; gène de la PEPCK ; gène codant le facteur *islet-brain 1* ; gène du facteur de transcription Pax 4 ; gène codant SHIP-2.

Enfin et plus récemment, les approches de type « génome entier » ont permis de mettre en évidence des liaisons du diabète de type 2 avec les régions 2q et 12q. Les deux loci ainsi caractérisés ont été appelés NIDDM-1 et NIDDM-2. Le locus NIDDM-1 correspond à un

polymorphisme touchant un seul nucléotide dans le gène codant la calpaïne 10 (*calcium-activated neutral protease*) (17).

Plus récemment un déterminant putatif, le polymorphisme 677C > T de la méthylènetetrahydrofolate réductase (MTHFR) qui a été trouvé associé dans les complications du diabète de type 2 y compris la rétinopathie, néphropathie, athérosclérose, infarctus de myocarde et les autres complications cardiovasculaire.

1. La MTHFR (86)

La 5,10-méthylènetetrahydrofolate réductase (MTHFR), est une enzyme qui joue un important rôle dans le processus de synthèse des protéines. La MTHFR est importante pour les réactions chimiques comportant les formes des folates (vitamines), nommés communément vitamine B9, cette enzyme converti le 5,10-méthylènetetrahydrofolate en 5-méthyltetrahydrofolate. Cette réaction est indispensable pour les différentes étapes de conversion d'homocystéine en méthionine. L'organisme utilise la méthionine pour la synthèse des protéines et autres composants importants.

2. la protéine MTHFR

La MTHFR est un dimère de 150 kDa comprenant deux isoformes de tailles variables : 77 kDa et 70 kDa. L'expression de l'ADNc humain de 2,2 kpb donne une protéine de 70 kDa comportant 656 acides aminés (87). Le site de démarrage de la traduction de l'isoforme de 77 kDa permet l'ajout de codons additionnels en amont de la séquence de l'isoforme de 70 kDa (88).

L'enzyme **MTHFR** est un homo dimère présent dans le cytoplasme, et localisée dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Elle possède un site de liaison pour le FAD. Son expression est plus intense dans le testicule, intermédiaire dans le cerveau et rein, et inférieure dans d'autres tissus.

3. Rôle de la MTHFR

La MTHFR intervient dans le métabolisme de l'homocystéine. L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré intermédiaire du métabolisme de la méthionine. Elle est synthétisée par l'ensemble des cellules de l'organisme et peut être catabolisée selon deux voies métaboliques : la voie de la transsulfuration et la voie de la reméthylation (Figure 2). En cas d'apport protéique excessif, la voie de la transsulfuration est favorisée par rétrocontrôle positif de la cystathionine- β -synthase (CBS) et rétrocontrôle négatif de la 5,10 méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR), le régulateur allostérique étant la S-adénosyl-L-méthionine (SAM). À l'inverse, en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée et l'Hcy est recyclée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine. Dans les deux cas, l'Hcy est métabolisée dès sa formation, et sa concentration intracellulaire demeure faible (de l'ordre de 5 nmol/g de tissu). Dans les conditions physiologiques normales, l'homocystéinémie est également faible puisque l'Hcy plasmatique dérive du métabolisme cellulaire (voir figure 2). En revanche, tout déficit portant sur l'un des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme de l'Hcy entraîne une augmentation de ses concentrations cellulaire, plasmatique et urinaire. La C677T de la MTHFR est un exemple de ces déficits (17).

- **Métabolisme des acides aminés soufrés** (83) : (voir figures : 2, 3)

Le métabolisme des acides aminés soufrés débute avec la méthionine, acide aminé indispensable apporté par les protéines alimentaires. La méthionine est le vecteur de l'atome de soufre de la cystéine, lequel intervient dans la structure spatiale des protéines. Elle est

déméthylée pour fournir de l'homocystéine. L'homocystéine s'oriente alors soit dans la voie de la transsulfuration où elle est convertie en cystéine via la cystathionine, soit dans le cycle de reméthylation où elle est reméthylée en méthionine. Ces deux voies sont limitées à deux organes principaux qui sont le foie et le rein.

- Voie de la transsulfuration :

Approximativement, 50 % de l'homocystéine entre dans la voie de la transsulfuration où elle est irréversiblement combinée avec de la sérine pour former de la cystathionine, cette réaction étant catalysée par la cystathionine-synthétase dont le cofacteur est le phosphate de pyridoxal qui est une forme biologiquement active de la vitamine B6. Les mutations de la cystathionine-bêta-synthétase sont la cause principale d'homocystinurie ; elles sont de type récessif.

La cystathionine est hydrolysée en cystéine qui, à son tour, peut être incorporée dans de la glutathion ou être métabolisée en sulfates et excrétée dans les urines.

- Voie de reméthylation :

Si l'homocystéine s'oriente vers le cycle de reméthylation, elle donne de la méthionine en empruntant son groupement méthyl au 5-méthyltétrahydrofolate sous l'influence d'une méthyltransférase dont le coenzyme est la méthyl-cobalamine. La méthyl-cobalamine provient de la vitamine B12 apportée par l'alimentation. Plusieurs anomalies génétiques du transport et du métabolisme de la cobalamine ont pour conséquence une diminution de l'activité méthionine-synthétase et une hyperhomocystéinémie.

Le 5-méthyltétrahydrofolate est régénéré à partir du 5, 10-méthylènetétrahydrofolate au cours d'une réaction catalysée par la 5, 10-méthylènetétrahydrofolate-réductase (MTHFR). La MTHFR emploie alternativement le dinucléotide-adénine de flavine (forme biologiquement active de la vitamine B12) comme cofacteur.

Les mutations responsables d'une diminution marquée de l'activité de MTHFR sont rares. En revanche, la mutation C 677 T causant la thermolabilité de la MTHFR est fréquente et responsable d'une diminution d'environ 50 % de l'activité de cette enzyme.

Une partie de l'homocystéine est reméthylée dans le foie grâce à l'action de la bétaine-homocystéine méthyltransferase à partir de la bétaine comme donneur de méthyl.

- la régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine :

L'orientation de l'homocystéine vers la voie de reméthylation ou de la transsulfuration est sous le contrôle de la disponibilité en méthionine et SAM (S-adenosylmethionine). Lorsque l'apport de la méthionine diminue de moitié, le nombre de cycles de reméthylation augmente deux fois. A l'inverse, lorsque l'apport de la méthionine augmente, l'homocystéine utilise principalement la transsulfuration. Les données expérimentales obtenues principalement par la mesure in-vitro de l'activité des enzymes suggèrent que cette coordination est réalisée par au moins deux mécanismes : le premier mécanisme dépend de la capacité de la SAM à inhiber la MTHFR et activer la cystathionine β synthetase (CBS).

Le second mécanisme dépend de la régulation de la concentration intracellulaire de la SAM. Toute variation de la teneur intracellulaire de méthionine modifie le taux de synthèse de SAM

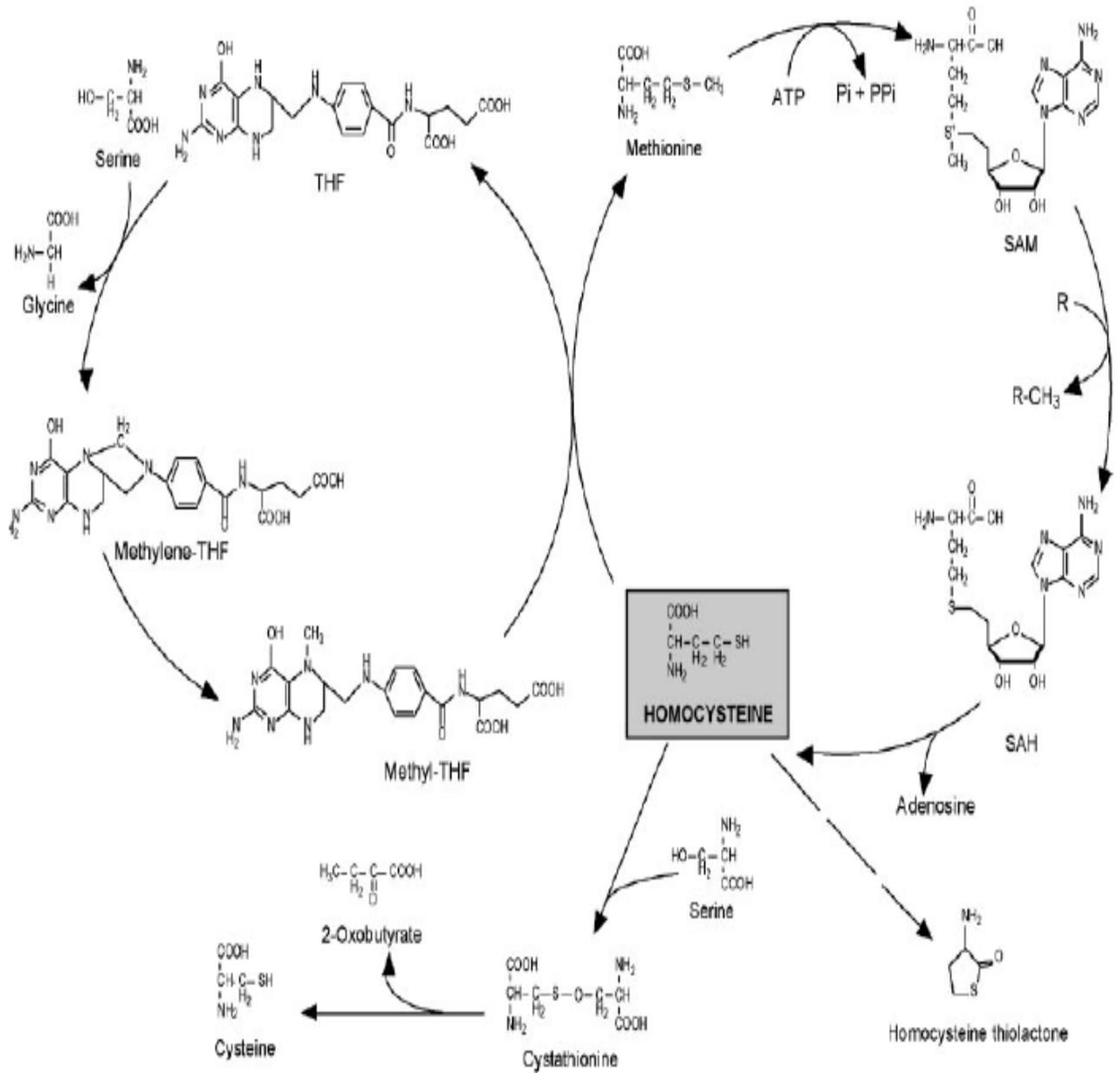


Figure 2 : Rôle de l'homocystéine dans le métabolisme cellulaire (89)

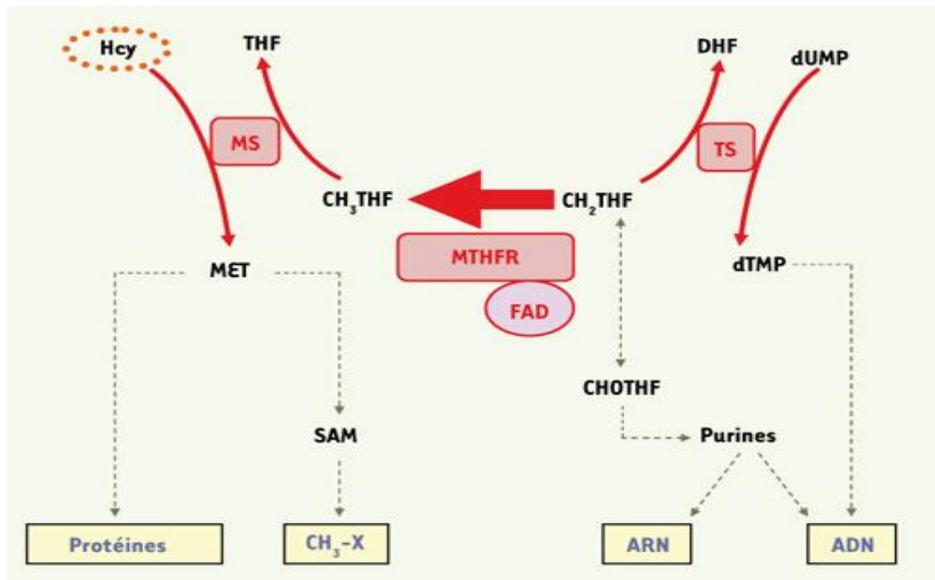


Figure 3. Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR. (90)

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate (CH_2THF) en 5-méthyltétrahydrofolate (CH_3THF). L'activité de la MTHFR affecte ainsi la disponibilité du CH_2THF , ce qui influence la synthèse de l'ARN et de l'ADN. Le CH_3THF est requis pour la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine (MET), qui intervient elle-même dans la synthèse protéique et la méthylation de l'ADN et d'autres composés ($\text{CH}_3\text{-X}$). Le FAD est le cofacteur de la MTHFR. MS, méthionine synthase ; TS, thymidylate synthase ; THF, tétrahydrofolate ; DHF, dihydrofolate ; CHOTHF, 10-formyltétrahydrofolate ; SAM, S-adenosyl méthionine.

4. Gène de la MTHFR

Son gène est composé de douze exons et se situe sur le chromosome 1 à la position 1p36.3. (Figure4 et 5)

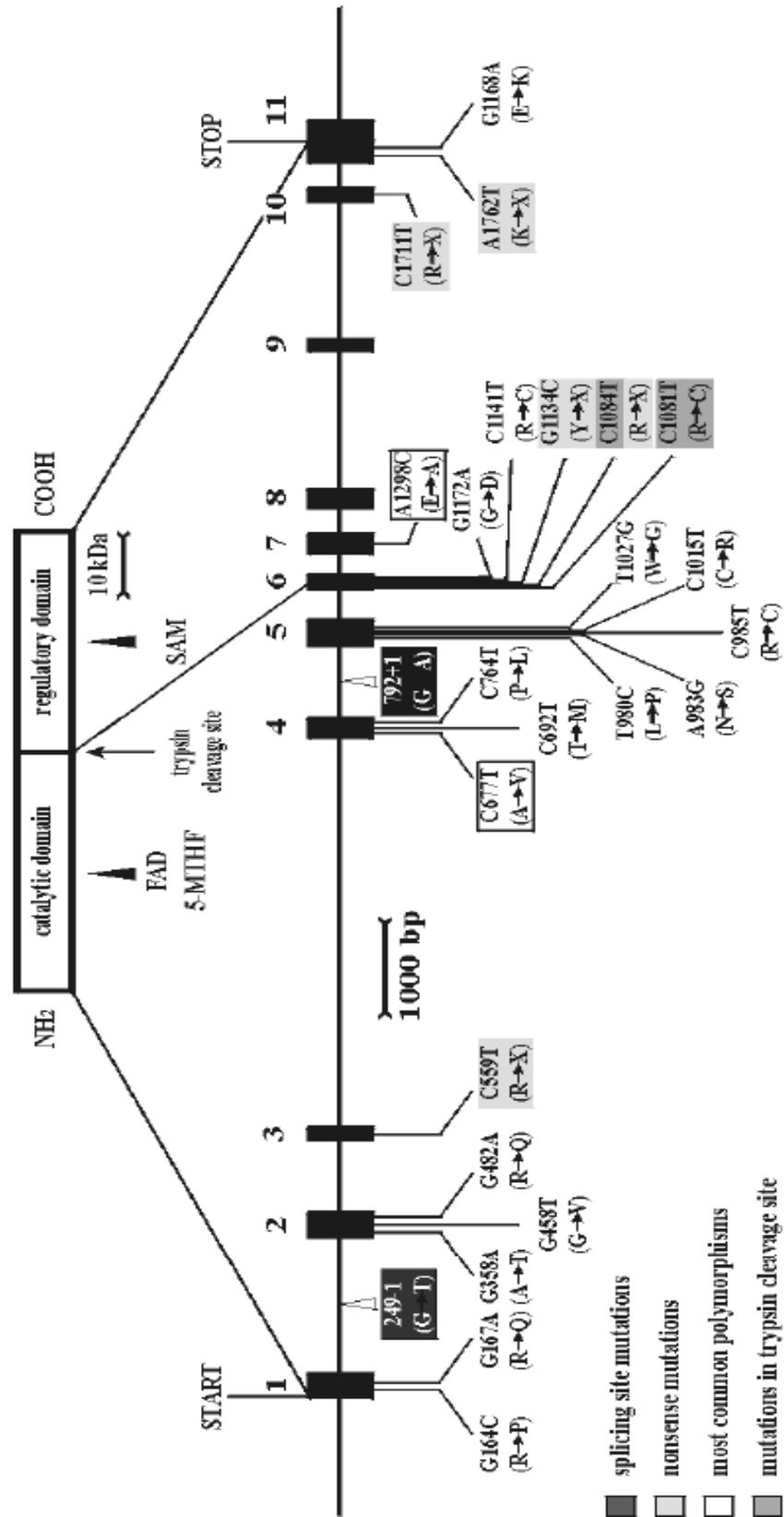


Figure 4 : structure de gène de la MTHFR avec la localisation des protéines et de mutations connus (91)

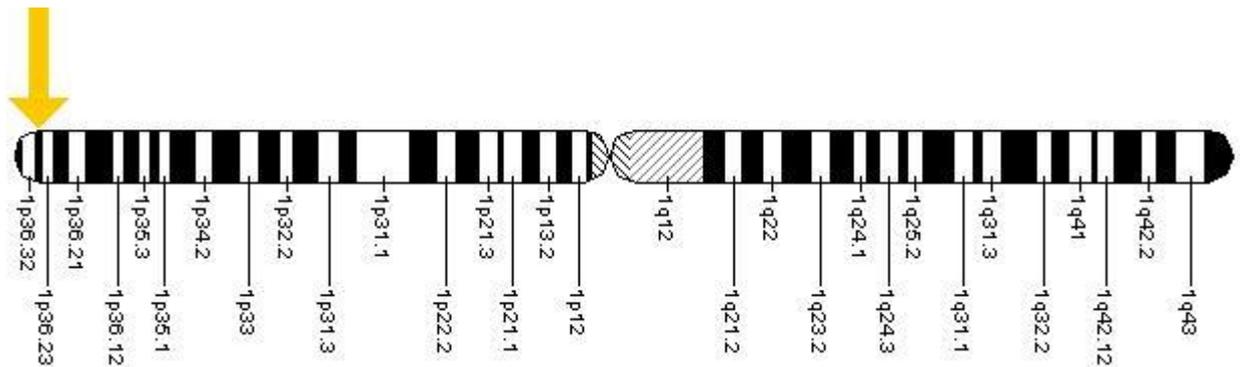


Figure 5: localisation cytogénétique du gène de la MTHFR.(ref : US National library of medicine)

Une banque d'ADNc a été criblée pour découvrir la portion carboxy-terminale de la séquence codante (87). L'ADNc ainsi déduit représentait 2,2 kpb et comprenait 11 exons. La partie N-terminal du gène MTHFR humain est mal connue (90).

Plusieurs sites d'amorce de la transcription, d'épissage alternatif et de polyadénylation ont été observés pour le gène MTHFR, la proportion de chaque transcription diffère selon les tissus. Il a été mis en évidence qu'il n'y a aucun élément TATA-box pour régler le gène MTHFR humain, fournissant ainsi une base pour approfondir les recherches sur le règlement du gène (88).

5. Mutation C677T

Actuellement, un total de 41 mutations rares mais nuisibles dans le gène MTHFR, aussi bien qu'approximativement 60 polymorphismes ont été rapportées. Identifié en 1995 par Frost et al, le variant 677C.T (Ala222Val), dans l'exon 4 du gène, a été particulièrement remarquable depuis qu'il a été reconnu comme la cause génétique la plus commune d'hyperhomocysteinémie. L'interruption de métabolisme de l'homocystéine par ce polymorphisme influence le risque pour plusieurs désordres complexes.

La *Figure 6* présente 41 mutations (numérotation en noir) qui sont propres aux familles des patients homocystinuriques répertoriés. Plusieurs mutations ont été exprimées en utilisant des

systèmes bactériens ou des systèmes de levures, afin de vérifier leur effet sur l'activité enzymatique (90). Comme chacune de ces mutations graves n'est généralement observée que dans une ou deux familles, il peut être avantageux de procéder à un diagnostic moléculaire prénatal par étude de liaisons génétiques (92) (93).

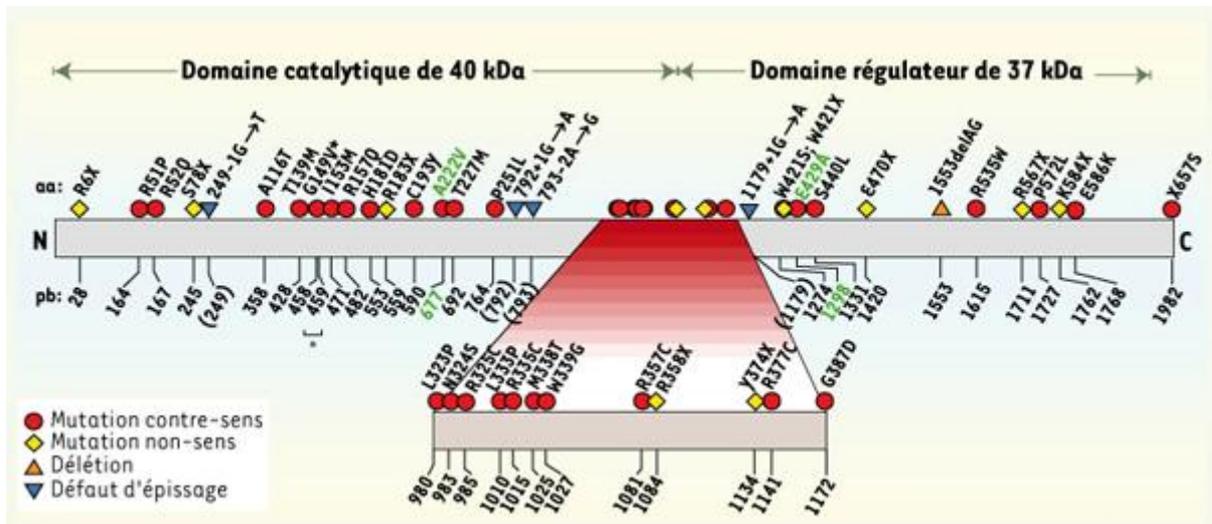


Figure 6. Représentation schématique de 41 mutations graves du gène MTHFR et de 2 polymorphismes particulièrement étudiés.

Les 41 mutations spécifiées n'ont été identifiées que dans des familles de patients présentant un déficit important de *MTHFR*. La protéine *MTHFR* est représentée par un rectangle et les acides aminés mutés sont indiqués au-dessus, ainsi que les mutations affectant l'épissage du gène. Les nombres sous le rectangle désignent la position des mutations dans la séquence de l'ADNc (GenBank GI: 6174884); 2 mutations différentes ont été identifiées à la position 1274. Les nombres entre parenthèses désignent la présence d'une mutation intronique à proximité du résidu mentionné. Les 2 polymorphismes de *MTHFR* les plus étudiés sont aussi indiqués, en vert (90).

6. Études moléculaires et biochimiques du polymorphisme 677C → T (90)

Le polymorphisme C → T à la pb 677 a été identifié de manière paradoxale en examinant un patient souffrant d'une altération sévère de *MTHFR*. De fait, ce polymorphisme se retrouve autant dans les groupes témoins que chez les patients homocystinuriques, bien que ces

derniers soient en plus victimes de mutations graves. La substitution 677 C → T dans l'exon 4 du gène, met en jeu une enzyme thermolabile possédant une activité moindre, c'est pourquoi le génotype mutant homozygote (677TT) est associé à une légère hyperhomocystéinémie. Cette association est encore plus évidente lorsque l'on considère des individus dont le sang présente un taux de folates réduit.

Les études biochimiques des versions 677C et 677T de l'enzyme ont fourni une explication à l'effet protecteur de l'acide folique sur l'hyperhomocystéinémie des individus mutants.

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

- Classification de l'hyperhomocystéinémie

- Hyperhomocystéinémie légère (16 - 30 $\mu\text{mol} / \text{l}$)
- Hyperhomocystéinémie modérée (31 - 100 $\mu\text{mol} / \text{l}$)
- Hyperhomocystéinémie sévère (> 100 $\mu\text{mol} / \text{l}$)

Elle peut provenir de facteurs génétiques, d'une excrétion urinaire inadaptée (insuffisance rénale, dialyse), ou accompagner des carences vitaminiques (folates, vitamine B12). Des origines médicamenteuses sont également connues (antifoliques, phénytoïne, carbamazépine, fibrates, lévodopa).

7. La multitude de répercussions cliniques du polymorphisme 677C → T (90)

Le produit de la réaction catalysée par la MTHFR est le 5-méthyltétrahydrofolate (*Figure 2*). Son seul rôle connu se manifeste par le transfert de son groupe méthyle lors de la reméthylation de l'homocystéine par la méthionine synthase. La MTHFR peut ainsi moduler les taux d'homocystéine, de méthionine et de S-adénosylméthionine. La MTHFR peut aussi indirectement influencer les taux de nucléotides, puisque son substrat, le 5,10-méthylène

tétrahydrofolate, est utilisé pour la synthèse de la thymidine et qu'il peut aussi être converti en d'autres dérivés foliques qui participent à la synthèse des purines. Heureusement, l'interaction entre les prédispositions génétiques (677TT) et des paramètres non-génétiques (acide folique alimentaire, suppléments vitaminés) est susceptible de prévenir certaines manifestations cliniques associées à une légère déficience en MTHFR.

PATIENTS ET METHODES

L'étude que nous avons entreprise est transversale de type cas témoins ; elle a duré huit mois, et porte sur deux types de populations : une population de 110 témoins présumés sains et une population de 117 malades représentée par 103 diabétiques de type 2 sans complications, et 14 diabétiques de type 2 avec une rétinopathie comme complication.

Recrutement des Sujets :

- les patients (malades) : il s'agit de sujets des deux sexes atteints de DNID présentant (ou non) des complications (nous avons pris comme complication la rétinopathie diabétique), âgé de 20 à 70 ans, admis au niveau du centre Hospitalier universitaire de Constantine (CHUC) essentiellement au niveau de service d'endocrinologie.
- Les témoins : population générale de référence, sujets sains des deux sexes (présumés en bonne santé) habitants à Constantine durant l'étude et âgé de 20 à 70 ans.

Des critères d'inclusions et d'exclusion ont été établis pour les patients (les malades) et pour la population témoins.

- **Critères d'inclusion :**

- *Pour les témoins* : sujets sains des deux sexes résidents à Constantine et âgé de 20 à 70 ans.
- *Pour les diabétiques* : sujets diabétiques de type 2 âgé de 20 à 70 ans présentent ou non des complications dégénératives de diabète.

- **Critères d'exclusions :**

- *Pour les témoins* :
 - infection urinaire (cause une élévation de la microalbuminurie)
 - Antécédents familiaux d'atteinte cardiovasculaire, de néphropathies, de rétinopathies, tabagisme, et la prise des

médicaments ayant comme effet secondaire une hyperhomocystéinémie).

- *Pour les diabétiques :*

- Infection urinaire, traitements causant une hyperhomocystéinémie.

Les critères de détermination de la rétinopathie diabétique sont standardisés par les cliniciens.

1. Prélèvement sanguin :

Le prélèvement sanguin est effectué, systématiquement à chaque hospitalisation d'un patient pour cause de DNID.

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube en présence d'EDTA (en quantité de 6 à 10 ml) dans de la glace caillée (pour éviter le contact entre plasma et sérum qui provoque une élévation dans la valeur de l'homocystéine et on ne prélève pas sur héparine parce que c'est un inhibiteur de la Taq polymérase),

Il est essentiel de connaître la glycémie, la triglycéridémie et la répartition du cholestérol dans les fractions lipoprotéiques. Pour obtenir ces données de façon standardisée, un jeun de 12 heures est nécessaire.

Les prélèvements faits plus de 12 heures après le dîner diminuent la sensibilité des valeurs calculées du cholestérol-LDL (LDL-C).

Avant le prélèvement, il est demandé au sujet de se placer en position semi assise pendant quelques minutes, de façon à limiter les effets hémodynamiques sur les taux de lipides, la position debout augmente la valeur de la cholestérolémie, tout comme une occlusion veineuse prolongée avec un garrot.

Dans nos prélèvements l'utilisation du garrot est proscrite parce qu'une augmentation de 2,8% de la concentration plasmatique d'homocystéine totale a été rapportée après application d'un garrot pendant 3 min (94).

Ainsi pour l'homocystéine il est conseillé d'utiliser un anticoagulant plutôt qu'un tube sec compte tenu du relargage en continu de l'homocystéine par les cellules. L'anticoagulant le plus utilisé est l'EDTA. C'est pour cette raison qu'on a opté pour l'utilisation de tubes EDTA pour le dosage de l'homocystéine (95) (96).

Pour le reste du bilan biochimique (glycémie, HbA_{1c}) nous avons utilisé :

- 1) un tube oxalate fluorure pour la glycémie (au minimum 2 ml de sang)
- 2) un tube EDTA (complexon), pour l'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}), au minimum 2 ml de sang.

- pour le prélèvement urinaire :

Prélèvement d'une miction dans un tube à hémolyse.

- Acheminements au laboratoire dans les plus brefs délais.

2. Questionnaire et Enregistrements

2.1. Questionnaire :

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

2.2. Enregistrement

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

3. Méthodes de dosage des paramètres Biochimiques

Le sang ainsi prélevé est acheminé directement au laboratoire pour l'analyser.

La glycémie, l'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}), et le cholestérol, les triglycérides et le cholestérol-HDL (HDL-C), ainsi que la microalbuminurie ont été dosés le jour même du prélèvement, l'homocystéine est dosée une semaine après.

- le dosage de paramètres biochimiques a été réalisé de la manière suivante :

1) séparation du sérum

Les prélèvements sanguins sont centrifugés pendant 15 min à 4000 rpm (tour par minute) afin d'obtenir du sérum par la suite dans le dosage de différents paramètres biochimiques (glycémie, cholestérol total, cholestérol-HDL, cholestérol-LDL, triglycérides, et homocystéine "HCys"), l'hémoglobine glyquée " l'HbA_{1c}" est dosée sur sang total.

2) Manipulations sur le sérum

2.1. Dosage de la glycémie :

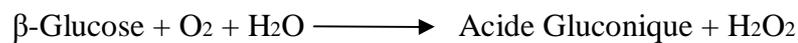
La glycémie peut être dosé par de très nombreuses méthodes, dont les plus anciennes sont colorimétriques alors que celles pratiquées actuellement sont enzymatiques.

Dans notre étude, la glycémie a été déterminée suivant une méthode enzymatique colorimétrique (réaction par la glucose-oxydase) par un auto analyseur de type (**Advia IMS System**)

- **Principe :**

La glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation de glucose à l'acide gluconique, le peroxyde hydrogène (H₂O₂) formé est détecté par l'accepteur chromogénique d'oxygène (chromogenic oxygen acceptor), phénol-aminophenazone avec la présence de la peroxydase (POD) :

GOD



POD



L'intensité de la coloration de la quinone (formé) mesuré à 505 nm est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon (97).

La technique est reproductible.

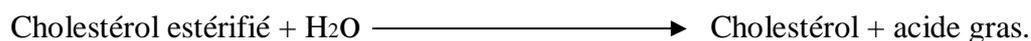
2.2. Dosage du cholestérol total :

Le cholestérol peut être dosé par de très nombreuses méthodes, dont les plus anciennes sont colorimétriques alors que celles pratiquées actuellement sont enzymatiques (98).

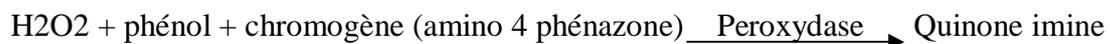
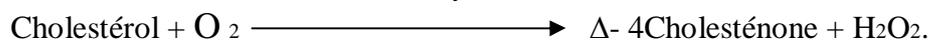
Dans notre étude, le cholestérol a été déterminé suivant une méthode enzymatique (réaction de Trinder) par un auto analyseur de type (Technicon RA et Opera systems N° de ref. T01-2801-56) en utilisant les coefficients de Boehring Mannheim.

- Principe :

Cholestérol estérase



Cholestérol Oxydase



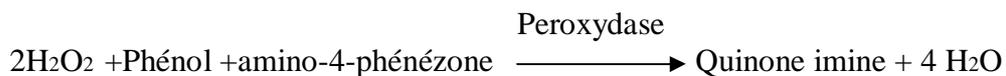
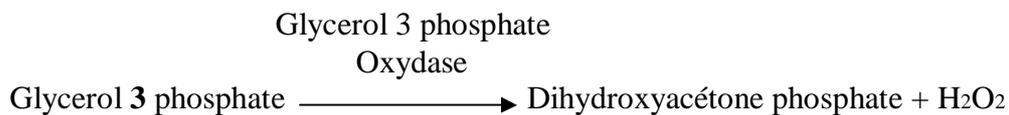
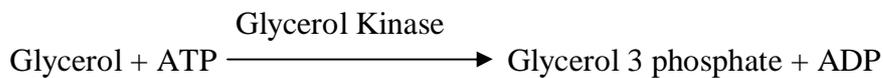
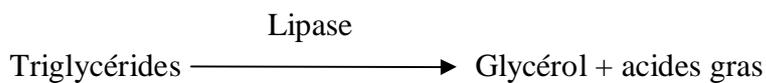
L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon du sérum.

2.3. Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides a été effectué par le même auto analyseur (Technicon RA et Opera systems № de ref.T01-2801-56) suivant une méthode colorimétrique enzymatique des triglycérides.

- Principe :

Repose sur le dosage enzymatique du glycérol libéré après action de la lipase.



L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm est directement proportionnelle à la quantité de triglycérides contenue dans l'échantillon du sérum.

2.4. Dosage du cholestérol HDL

- Principe :

Le dosage du HDL cholestérol s'effectue après précipitation grâce au réactif phosphotungstique associé au chlorure de magnésium (ref.T01-2801-56, 6×5ml) qui consiste à précipiter les LDL et les VLDL. Le HDL cholestérol est alors dosé dans le surnageant résultant de la centrifugation du précipité par la même technique enzymatique que le cholestérol total (98) (99)

2.5. Evaluation du cholestérol LDL

La formule de Friedewald (1972) permet de calculer le LDL-C à condition que les TG soient inférieurs à 3,5 g/l (4 mmol/l).

$$\text{LDL-C} = \text{CT} - [\text{HDLC} + (\text{TG}/5)]$$

- Essai de standardisation des techniques pour les paramètres lipidiques

- Contrôle de qualité

Le contrôle de qualité a été réalisé pour tous les paramètres. Nous avons apprécié ce contrôle par la répétabilité et la reproductibilité.

- Répétabilité

Il a été réalisé un pool à partir des sérums et ainsi que le cholestérol et les triglycérides de la journée même ont été dosés (30 fois), le cholestérol HDL (15 fois) le jour même (Tableau 2)

Tableau 2 : Tableau exprimant les résultats du contrôle de qualité préalablement réalisé

Répétabilité				Reproductibilité			
Paramètre	N	XS	CV %	Paramètres	N	XS	CV%
Cholestérol	3	1,85 ± 0,08	4,3	Cholestérol	30	2,29 ± 0,11	4,8
Triglycérides	30	1,08 ± 0,05	4,6	Triglycérides	30	1,48 ± 0,08	5,4
HDL	15	0,41 ± 0,01	2,4	HDL	30	0,45 ± 0,02	4,4

- Reproductibilité

Elle a été réalisée grâce à deux sérums de contrôle, l'un normale et l'autre pathologique pour chaque série d'analyse. Les contrôles sont préparés chaque jour et dosés soit au début, soit à la fin de la série.

2.6. Dosage de l'homocystéine

Les valeurs normales sont plus faibles chez les enfants et augmentent avec l'âge.

Les valeurs inférieures chez la femme rejoignent celles de l'homme après la ménopause.

Ces variations physiologiques sont faibles.

En l'absence d'une erreur innée du métabolisme par déficit enzymatique (homocystinurie),

l'homocystéine plasmatique est augmentée en cas de déficit en vitamines B6, B12 ou

folates et dans l'insuffisance hépatique ou rénale et lors des traitements par les antifoliques.

L'hyperhomocysteinémie est positivement corrélée à l'augmentation du risque de maladie coronarienne athéromateuse, d'accidents cérébro vasculaires et d'artériopathies périphériques.

Pour son dosage, le prélèvement effectué de préférence après un jeûne de 12heures.

Prélèvement de sang (capillaire ou de sang veineux) et le plasma obtenu par

centrifugation du sang total recueilli en présence d'héparinate de lithium ou d' EDTA et

immédiatement centrifugé ou placé dans de la glace fondante

L'emploi du citrate acide comme anticoagulant permet de s'affranchir de l'utilisation de glace si la séparation plasma/globules ne peut-être immédiate.

L'utilisation de citrate acide permet une stabilisation des taux plasmatiques d'homocystéine

à température ambiante. Mais selon l'anticoagulant utilisé il existe une variabilité des

résultats qui impose de déterminer dans chaque laboratoire des normes en fonction des

conditions pré analytiques retenues (anticoagulants, délai et température de stockage avant centrifugation).

La conservation : après centrifugation et séparation du culot la conservation du plasma est

excellente quel que soit l'anticoagulant - à température ambiante 4 jours, à +4°C 2 semaines, à -20°C 8 mois (100).

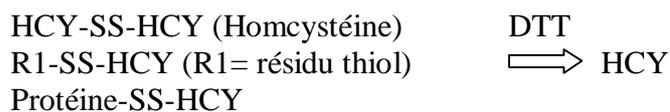
Un grand nombre de méthodes sont actuellement disponibles pour déterminer l'homocystéine plasmatique totale (tHcys). Des trousse pour immunodosages, plus faciles à utiliser, commencent à supplanter les méthodes classiques (101). Dans notre étude, l'homocystéine a été déterminé suivant un dosage immunologique (AxSYM Homocystéine) par polarisation de fluorescence (FPIA) pour la mesure quantitative de la L-homocystéine totale dans le sérum ou le plasma humain sur l'AxSYM (autoanalyseur)

- Principes Biologiques de la méthode

Le dosage AxSYM Homocystéine est basé sur la technologie immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA).

L'homocystéine liée (forme oxydée) est réduite en homocystéine libre, qui est à son tour convertie enzymatiquement en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) comme décrit ci-dessous :

L'homocystéine, ses formes disulfures ainsi que les formes mixtes protéines-HCY présentes dans l'échantillon sont réduites en HCY libre sous l'action du dithiothréitol (DTT).



- Reproductibilité

La reproductibilité du dosage a été déterminée selon la méthode décrite dans le protocole EP5-T2 du National committee for clinical laboratory Standarts (NCCLS) (102).

3) Dosage de la microalbuminurie

La synthèse d'albumine, essentiellement hépatique, est de l'ordre de 12 à 14 g/24 Heure. Une partie du pool intravasculaire (8 à 10 %) est catabolisée chaque jour, principalement au niveau de l'endothélium vasculaire (environ 10 g) et au niveau du tubule rénal après

réabsorption de l'albumine filtrée (environ 2 g). l'albumine filtrée est réabsorbée à 95 % au niveau du tube contourné proximal (103). La microalbuminurie correspond à une élévation modérée de l'excrétion urinaire d'albumine et son dosage nécessite l'utilisation de méthodes immunologiques. Elle témoigne de façon précoce d'une altération fonctionnelle glomérulaire. Il faut noter qu'un exercice physique, de la fièvre, une insuffisance cardiaque congestive, une infection urinaire peuvent transitoirement induire une microalbuminurie. Il existe une variation nyctémérale : ainsi, l'excrétion urinaire d'albumine est de 30 à 50 % plus faible pendant la nuit en raison d'une pression artérielle et d'une filtration glomérulaire plus faible (104).

Pour son recueil différents types de recueil sont répertoriés dans la littérature : urines de 24 heures recueillies dans un récipient propre et stérile pour éviter toute contamination bactérienne (mais difficulté d'un recueil complet de la diurèse), échantillon des première urines du matin (les résultats sont exprimés par rapport à la créatinine), miction sur un temps déterminé ou urines de la nuit (8h). Dans notre étude nous avons opté pour le recueil de la première miction du matin.

Différentes expressions de la microalbuminurie sont utilisées: mg/24h, mg/l, μ g/min ou rapport à la créatinine (μ g albumine/mg de créatinine urinaire).

Il existe une grande variabilité intra-individuelle au cours de la journée et même d'un jour à l'autre. C'est la raison pour laquelle il est préférable de suivre un patient avec le même type de recueil.

On définit trois situations : normoalbuminurie, microalbuminurie, macroalbuminurie (voir tableau 3).

La microalbuminurie sur les premières urines du matin (105) se définit pour des valeurs du rapport microalbumine/créatinine se situant chez l'homme entre 2,5 et 25 mg/mmol de

créatinine et chez la femme entre 3,5 et 25mg/mmol de créatinine (à cause d'une créatininurie plus faible).

Il faut vérifier le caractère permanent de la microalbuminurie ; au moins 2 sur 3 prélèvements sur une période de 3 à 6 mois doivent être positifs avant de confirmer la microalbuminurie (106).

Tableau 3. Valeurs définissant la normoalbuminurie, la microalbuminurie et la macroalbuminurie

Normoalbuminurie	Microalbuminurie	Macroalbuminurie
< 30mg/24h	30 à 300mg/24h	>300 mg/24h
<20mg/l	20 à 200 mg/l	>200 mg/l
<20µg/min	20 à 200µg/min	>200 µg/min
<30µg/mg créatinine	30 à 300 µg/mg créatinine	>300 µg/mg créatinine

Le dosage de la microalbuminurie dans notre étude a été effectué sur une miction du matin par une méthode immunoturbidimétrique sur un auto analyseur de type (Advia IMS System). L'albumine humaine urinaire forme un précipité en présence d'un antisérum spécifique ; ce précipité peut être dosé par méthode turbidimétrique à 340 nm.

- La conservation des urines : 8 jours à + 4°C. La congélation est déconseillée.

4. Manipulations sur le sang total

4.1. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c)

Les hémoglobines glyquées (Hb) correspondent à l'ensemble des molécules d'hémoglobines modifiées par fixation non enzymatique d'oses sur les fonctions aminées libres de la globine. La glycation est un phénomène physiologique lent dont la première étape réversible correspond à la formation d'une base de Schiff ou Hb glyquée labile. Le

nombre de fonctions susceptibles de fixer un ose et le fait que d'autres oses que le glucose peuvent se fixer génèrent une multitude de formes glyquées de l'Hb.

Le site principal de glycation de l'hémoglobine majoritaire de l'adulte, l'HbA constituée de 2 chaînes α et 2 chaînes β de globine, se situe sur la Valine N-terminale de la chaîne β . Les autres sites de glycation correspondent aux lysines non terminales des chaînes α et β et à la valine N-terminale de la chaîne α . La glycation sur l'extrémité N-terminale modifie significativement les propriétés physico-chimiques de la molécule et conduit à la formation d'Hb dites rapides dont l'élution est plus précoce en chromatographie d'échange cationique faible que celle de l'HbA non modifiée ou HbA₀. Ces fractions rapides dont l'élution est plus précoce en chromatographie d'échange cationique faible que celle de l'HbA non modifiée ou HbA₀. Ces fractions rapides sont appelées HbA₁ et ont été désignées, en fonction de leur ordre d'élution, par une lettre minuscule (HbA_{1a}, A_{1b} et HbA_{1c}). la molécule fixée par ces Hb (hémoglobine) est le glucose pour l'HbA_{1c} (4-6 % de l'Hb totale), le pyruvate pour l'HbA_{1b} (0,8% de l'Hb totale) et le fructose 1-6 diphosphate ou le glucose 6 phosphate pour l'HbA_{1a} (0,5% de l'Hb totale). L'HbA_{1c} est elle-même hétérogène et la forme la plus répandue est celle où une seule chaîne β a fixé du glucose sur son extrémité N-terminale.

Il est évident que toutes les formes d'Hb, et pas seulement l'HbA, sont glyquées. Les Hb mineures (HbA₂ et HbF) ainsi que les variants éventuels existent aussi sous forme glyquée.

Le dosage de l'hémoglobine A_{1c} chez les patients diabétiques est reconnu comme marqueur d'évaluation de l'équilibre glycémique au long cours et il est recommandé de le pratiquer tous les 3-4 mois chez les diabétiques de type 2. Les méthodes disponibles pour le dosage de l'HbA_{1c} sont basées sur ses propriétés physicochimiques ou sur la reconnaissance par un anticorps spécifique. Malgré des progrès dans la qualité et la standardisation de ces méthodes, des interférences analytiques dues à des mutants de

l'hémoglobine (Hb) ou à l'existence d'autres dérivés de l'Hb existent. De plus, l'interprétation des seuils de suivi du diabète n'est interprétable que lorsque diverses conditions physiologiques sont respectées. La méconnaissance de ces facteurs peut conduire à l'interprétation erronée des dosages d'HbA1c. Les réactifs commercialisés pour le dosage de l'HbA1c utilisent des méthodes de chromatographie d'échange d'ions, d'immunoagglutination ou d'affinité et mesurent des dérivés glyqués de l'Hb différents. L'existence de variants génétiques de l'Hb et de dérivés modifiés post-traductionnellement de l'Hb affectent différemment ces méthodes. De plus, certaines situations pathologiques affectant la durée de vie des globules rouges rendent ininterprétables les dosages. La connaissance de l'ensemble des facteurs influençant le dosage de l'HbA1c est essentielle pour une prise en charge optimale des patients diabétiques (107).

La valeur de l'hémoglobine glyquée est indépendante des variations journalières de la glycémie et n'est pas affectée par l'exercice ni par l'ingestion récente de sucre. Cependant il existe de nombreuses causes de variation : toute modification du groupement N-terminal de la chaîne bêta de l'hémoglobine par fixation de molécules comme l'acide acétylsalicylique ou des dérivés de l'éthanol sont responsables d'interférences et conduisent à des résultats anormalement élevés ; chez les sujets en état d'insuffisance rénale, la carbamylation de l'hémoglobine peut conduire à des résultats erronés. Les patients non diabétiques en état d'insuffisance rénale présentent des résultats plus élevés que les sujets témoins ; au cours des hémolyses (quelles que soient leurs causes) les résultats sont anormalement abaissées en raison de la destruction prématurée des hématies, quelle que soit la méthode de dosage adoptée. Pour le dosage réservé au suivi du patient diabétique les recommandations pour la pratique clinique de l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé) précisent que : *" Le suivi du contrôle glycémique du patient diabétique de type 2 doit reposer sur le dosage de l'HbA1c tous les 3 ou 4 mois.*

Pour un patient donné, le dosage de l'HbA1c doit être pratiqué dans le même laboratoire, pour permettre de comparer les résultats successifs...»

Les changements de thérapeutique ou les diabètes instables peuvent transitoirement motiver des prescriptions de glycémie dans l'intervalle.

Le jeûne n'a pas d'influence.

La particularité est que les hémoglobinopathies peuvent conduire à des résultats erronés, surtout avec les techniques utilisant des micro colonnes de chromatographies d'échanges d'ions.

Pour l'échantillonnage, du sang veineux recueilli dans un tube contenant de préférence de l'EDTA, ou encore de l'héparine, de l'oxalate/fluorure ou le mélange ACD (voir composition ci-dessous), ou, le cas échéant du sang capillaire. Dans ce dernier cas, le sang capillaire peut être recueilli par l'intermédiaire d'un microcapillaire contenant de l'EDTA ou sur du papier filtre.

En matière de conservation des études ont montrés que la conservation du sang recueilli sur EDTA ou ACD 8 jours à +4°C (cette conservation ne concerne que l'HbA1c qui ne varie pas; l'HbA1a+b augmente en fonction du temps et de la température). Sur héparine, le délai ne doit pas excéder 3 jours à +4°C avant l'analyse. Si le délai doit être supérieur il faut prétraiter le prélèvement qui est alors stable plusieurs mois à -80°C. Le prétraitement de l'échantillon comprend la réalisation de l'hémolyse et l'élimination des fractions labiles d'hémoglobine glyquée par:

- incubation des érythrocytes dans une solution de NaCl 150 mmol/l
- utilisation de réactifs contenant du semi-carbazide-aniline ou de l'acide borique
- ou simplement une hémolyse à pH acide (100).

Dans notre étude le dosage de l'HbA1c a été effectué par un auto analyseur de type

BIO-RAD D-10 dont son programme est basé sur le principe d'HPLC échangeuses d'ions.

- Composition du mélange ACD :
 1. la solution 1: Dissoudre 1.32g de citrate du sodium en 85ml d'eau distillée
 2. la solution 2: Dissoudre 0.48g d'acide citrique dans la solution 1
 3. Dissoudre 1.47g de dextrose dans la solution 2
 4. compléter par l'eau distillée à 100ml
 5. filtrer stérilise à travers un filtre stérile de 0.2um
 6. Utilisez 0.25ml de cette solution pour 1ml de sang

4.2. Extraction de l'ADN

Toutes les études génétiques nécessitent la disposition d'échantillons d'acides nucléiques, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN, les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies (biopsie de villosités choriales...).

Dans la grande majorité de cas la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre de copies et de méthodes de biologie moléculaire utilisée ultérieurement (PCR...)

Les méthodes d'extraction des acides nucléiques sont diverses (108)

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

- Principe :

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

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

-une protéinase K, qui dénature et dégrade les protéines.

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

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

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

4.3. Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN :

4.3.1. Détermination de la pureté :

•Principe :

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

Absorbent à 280 nm.

- l'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée (10 μ l de l'ADN solubilisé dans 990 μ l de l'eau stérile).
- Les DO (densité optique) sont lues à 260 et 280 nm (longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines) dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile).
- Par le moyen du rapport de DO 260 nm/ DO 280 nm, la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

On considère que

- L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si: $DO_{260} / DO_{280} < 1,6$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si: $DO_{260} / DO_{280} > 2$.

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, ce dernier ne laisserait pas

aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée (Annexe 2). Les ADN purs sont conservés à + 4 °C jusqu'à utilisation.

4.3.2. Détermination de la concentration de l'ADN :

• Principe

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

A 260 nm une unité de densité optique correspond à :

- 50 µg / ml pour une solution d'ADN double brin
- 250 µg / ml pour une solution d'ADN simple brin.

1 unité de DO₂₆₀ nm = 50 µg/ml d'ADN double brin.

Exemple :

Pour un ADN solubilisé dans 1000 µl de TE 10 :1 ayant une DO₂₆₀ nm = 0,139

1 unité de DO₂₆₀ nm ———→ 50 µg/ ml d'ADN

0,139 de DO₂₆₀ nm ———→ X

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

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

Donc :

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

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

5. Géotypage de la MTHFR :

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

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

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

1. La PCR (Polymérase Chaîne Réaction)

La PCR est une technique de biologie moléculaire (109) mise au point en 1985 par Kary Mullis et développée par Henri A. Herlich et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA).

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

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

L'ADN est amplifié par PCR avec deux amorces encadrant la région avec les deux codons polymorphes d'acide aminé 222 de la MTHFR (Annexe 3, tableau 18).

1.2. Déroulement des cycles de la PCR

Chaque cycle de la PCR repose sur trois étapes indispensables : Dénaturation, hybridation et élongation (Annexe 3 : Tableau 19)

1.3. Contrôle des produits de la PCR

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % additionné à 10 µl de BET (Bromure d'éthidium), ce dernier est un réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double

hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition aux UV (le gel est ensuite coulé sur plaque d'une cuve horizontale).

Dans chaque puits du gel, il est déposé :

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

-3 μ l de marqueur de taille (PM 100pb LADDER, ref.018209) +10 μ l H₂O +2 μ l BBP

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

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de bromure d'éthidium fixées aux ADN émettent une lumière visible et photographiable et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille (figure : 7). Ce control permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR grâce au puit contenant le blanc (témoin négatif : T).

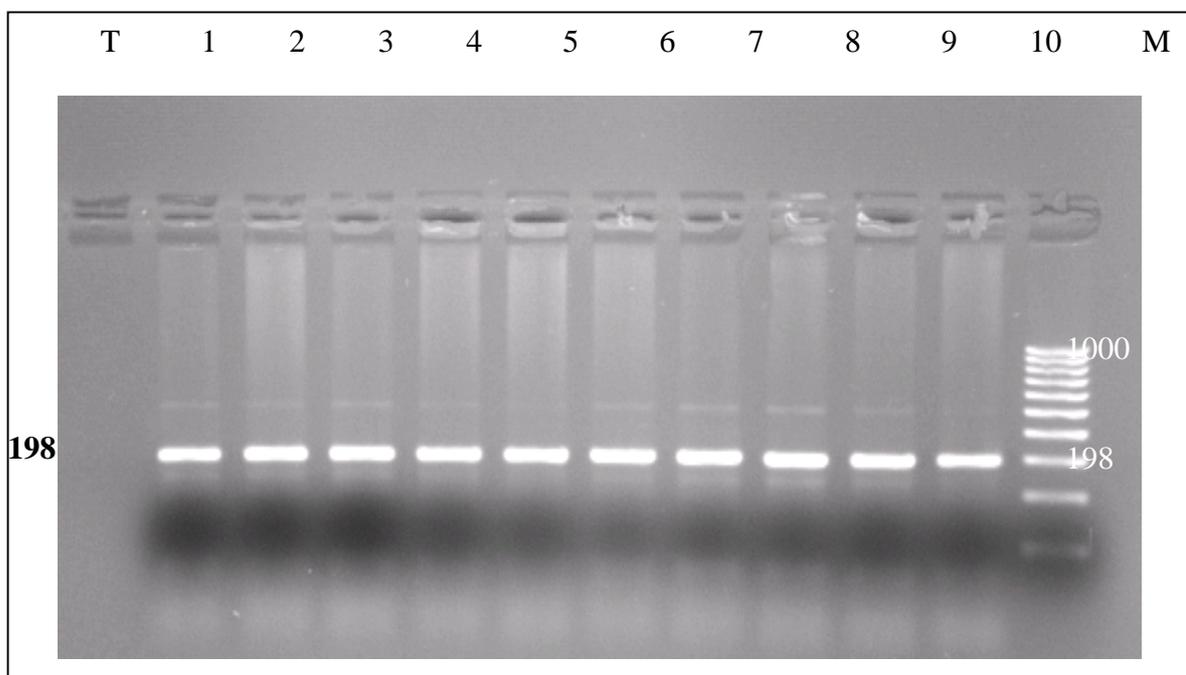


Figure 7 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés (198 pb) par PCR du gène MTHFR.

2. Digestion des produits de PCR

Préparer le milieu de digestion de l'enzyme Hinf I pour de tubes voulu + 1 témoin (Annexe 4 : tableau 20).

1. Digestion par l'enzyme de restriction Hinf I :

L'HinfI est une enzyme de restriction produite par la bactérie *Haemophilus influenzae*

Elle reconnaît et clive la séquence G/ANTC codant pour l'Alanine en position 222 (figure8).



Figure 8: site de restriction par l'enzyme Hinf I

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

Après incubation ils sont concentrés au speed-vac (system ISS 40-SAranta) pendant quelques minutes.

2. Conditions de migration

- Préparation d'un gel d'agarose (Annexe 4 Tableau 21) :

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

Monter le support du gel.

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

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

- Dépôts des échantillons :

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

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

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

- Migration :

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

3. Révélation du profil électrophorétique

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

Lorsqu'on obtient une séparation nette des différents fragments du marqueur (après 2h 30 mn, le gel est photographié après translumination aux UV (figure 9).

3. Profils RFLP obtenus

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

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

175 pb, 198 pb et 23 pb, le premier apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté (TT), le deuxième apparaît aussi sous forme d'une seule bande, il s'agit du type homozygote sauvage (CC). Les deux

bandes ensemble, correspondent au type hétérozygote (CT) (voire la figure 9 ci dessous).

Le troisième n'est pas visible à cause de son intensité trop faible.

Donc les conditions d'amplification étaient comme suit : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 65 °C pendant 30 secondes et une élongation à 72 °C pendant 40 secondes, et enfin une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes. L'amplification a été suivie d'une digestion enzymatique par l'enzyme HinfI. Les produits de digestion ont été analysés sur un gel d'agarose à 3 % parallèlement à un marqueur de poids moléculaire. La révélation a été réalisée sous lumière ultraviolette (UV) après coloration au bromure d'éthidium. La présence du polymorphisme se traduisait par la visualisation d'une bande de 175 pb.

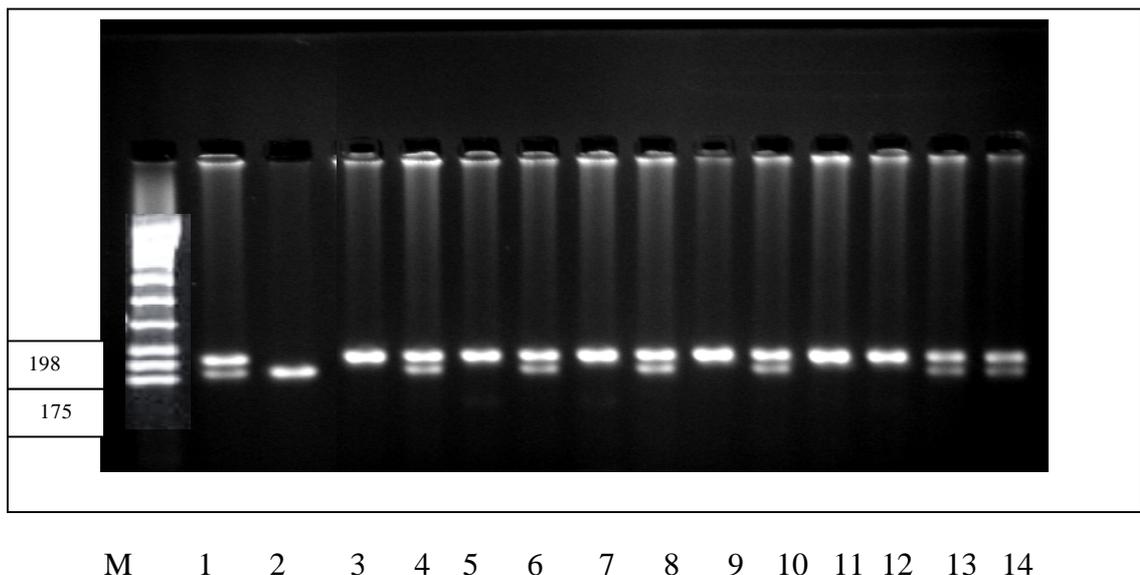


Figure 9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage de HinfI présentant différents génotypes d'MTHFR.

6. Analyse statistique

Les résultats statistiques de tous les échantillons obtenus ainsi que tous les paramètres considérés ont été traités par le logiciel Epi info version 6.0

Différentes méthodes, ainsi que différents tests ont été utilisés dans cette étude.

6.1. Statistique descriptive :

Dans cette étude descriptive nous avons utilisé:

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

$\bar{X}_a = \frac{\sum x}{n_a}$	$S_a^2 = \frac{\sum (x - \bar{x}_a)^2}{n_a - 1}$
----------------------------------	--

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

- Des comparaisons de moyenne avec formulation de l'hypothèse nulle, la comparaison de deux proportions observées.

n_a et n_b sont les tailles de deux échantillons

ε = écart réduit

$\varepsilon = \frac{(\bar{X}_a - \bar{X}_b)}{\sqrt{\frac{s_a^2}{n_a} + \frac{s_b^2}{n_b}}}$
--

s_a^2 et s_b^2 variances de la moyenne dans le groupe A et B
 n_a n_b

La valeur ε calculée est comparée à la valeur lue dans la table de l'écart réduit.

Si $\varepsilon < 1.96$, la différence n'est pas significative au seuil de 5% et on ne peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre X_a et X_b (où p_1 et p_2 pour des proportions).

Si $\varepsilon \geq 1.96$ la différence est significative au risque $\alpha = 0.05$, on peut conclure que X_1 (ou p_1) est statistiquement différent de X_2 (où p_2).

Tests de comparaison de variances :

L'égalité des variances est la condition de base pour les tests de comparaisons de moyennes. C'est le test de L'ANOVA.

Nous avons utilisé donc L'ANOVA en cas de distribution normale. Dans le cas où les variances différent, objectivées grâce au test d'homogénéité des variances de Bartlett, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney.

6.2. L'enquête analytique :

Dans l'enquête analytique: pour étudier la relation entre un facteur d'exposition et la maladie, et en plus des tests déjà cités nous avons :

- Comparé la moyenne de la variable mesurant l'exposition chez les malades et les non malades.
- Nous avons créé des classes et utilisé des méthodes qualitatives. Ces méthodes permettent de décrire la relation entre le facteur d'exposition et la maladie de manière plus concrète et permet l'utilisation de méthodes statistiques plus simples (110).

Le test utilisé dans ces conditions est le χ^2 .

6.3. Calcul de l'odds ratio :

Pour calculer l'odds ratio nous avons établi un tableau de contingence :

Il est présenté sous forme de tableau croisé 2x2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

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

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

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

Cependant on peut calculer :

- La cote d'être exposé (Exposure Odds ;EO) pour les cas EO malades = a/c
Pour les témoins EO témoins = b/d
- Le rapport des cotes d'exposition qui est l'Odds ratio (Exposure Odds ratio)

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

L'Odds ratio représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population

(Prévalence <5%). Dans ce cas l'Odds ratio peut être une bonne approximation du risque relatif que donnerait une enquête de cohorte pour la population.

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

On a utilisé la méthode de Mantel Haenszel pour calculer un Odds lié à un facteur en ajustant simultanément sur plusieurs autres :

Trois valeurs de χ^2 sont données : les valeurs de p sont données pour un degré de liberté.

- Le test du χ^2 sans correction :

$$N = [(a*d) - (b*c)]^2 / [(a+b)*(c+d)*(a+c)*(b+d)]$$

- Le test du χ^2 de Mantel- Haenszel :

$$N = (N-1) [(a*d)-(b*c)]^2 / [(a+b)*(c+d)*(a+c)*(b+d)]$$

- La correction de Yates :

$$N = [| (a*d)-(b*c) | - 0.5 * N]^2 / [(a+b)*(c+d)*(a+c)*(b+d)]$$

Le test de Fisher est calculé pour le tableau, et les résultats des deux tests unilatéral et bilatéral sont donnés dans les cas où une case du tableau est inférieure à 5.

6.4. Les intervalles de confiance:

Les intervalles de confiance : ont été calculés par la méthode de Cornfield.

L'approche estimative de l'analyse statistique vise à quantifier l'effet étudié et le degré de certitude de cette estimation grâce à un intervalle de confiance , qui identifie généralement

une fourchette de valeurs situées de part et d'autre de l'estimation et l'on peut être sûr à 95% de trouver la valeur réelle .

La notion d'un intervalle de confiance repose sur l'idée suivante : Si la même étude était réalisée sur un échantillon différent de patients, les résultats ne seraient pas identiques, mais seraient proches du résultat véritable qui reste inconnu .l'intervalle de confiance estime cette variation due à l'échantillon (111).

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

6.5. Choix de la "p value ":

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

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

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

Résultats

Notre étude a porté sur 227 sujets dont 110 témoins sains recrutés au niveau du service de médecine du travail, et 117 patients atteints d'un DNID recrutés au niveau de service d'endocrinologie au CHUC parmi eux 14 patients présentent une rétinopathie diabétique(RD).

1. Aspect clinique des patients atteints d'un DNID

Nos patients sont de diabétiques soit sans complications, ou présentent une rétinopathie diabétique comme complication avec des degrés de sévérité différentes, et présentant des pathologies associées comme les Rhumatismes articulaires, HTA, hyperthyroïdisme, des maladies gastriques non précisées, sclérose en plaque, des hernies discales étagées, et beaucoup d'autres.

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

- la première cause est le diabète de type 2 lui-même du fait qu'il est asymptomatique pendant des périodes prolongées, la maladie s'installe de manière insidieuse, pendant des années, sans créer d'inconfort, de douleurs, ou même la sensation que « quelque chose ne va pas ». Le diabète de type 2 est souvent découvert par hasard, et en moyenne sept ans entre la découverte du diabète et son début réel, période suffisante pour le développement des lésions des petits et des gros vaisseaux sanguins, d'où l'installation des complications invalidantes.

- les diabétiques Algériens, ne sont pas disciplinés en matière d'hygiène de vie, on a remarqué ainsi chez nos patients le manque d'acceptation de réaliser de manière répétée un ensemble d'actions recommandées dans un objectif de santé à long terme.

- le refus de la maladie elle-même chez la majorité d'entre eux. Il s'agit d'une constatation d'un état de fait qui demande à être amélioré par une promotion de

l'éducation thérapeutique et par un effort visant à remplacer une médecine centrée autour de la maladie par une médecine centrée autour du patient, en s'intéressant à toutes les dimensions bio-psycho-sociale et éducationnelle, et surtout, de passer de la théorie à la pratique.

2. Age et Sexe Ratio

L'âge de nos patients est entre 20 et 70 ans.

-Les sujets témoins sont au nombre de 110 répartis en 77,27 % de sexe masculin, et 22,73% de sexe féminin.

-Les DNID sont au nombre de 117 représentent 51,54 % de total de sujets, répartis en 61,54 % de sexe masculin, et 38.46 % de sexe féminin. Parmi ces diabétiques 11,96 % présentent comme complication une rétinopathie, répartis en 64,30 % femmes et 35,7 % hommes.

Les diabétiques sans complications représentent 88,03 % par rapport au total de malades. Ils sont répartis en 34,95 % de sexe féminin, et 65,05 % de sexe masculin.

Cet échantillonnage est réalisé au hasard (Tableau 4, Figure 10). Selon certaines études le DNID montre un effet prononcé d'excès de femmes dans toutes les populations avec cependant des évidences d'une prépondérance masculine dans l'âge moyen. Les femmes ont une probabilité accrue de transmettre le DNID à leur descendance (10).

Dans notre échantillon des diabétiques le nombre des hommes été supérieur par rapport à celui de femmes avec une proportion de 1,6 %, ceci est due peut être :

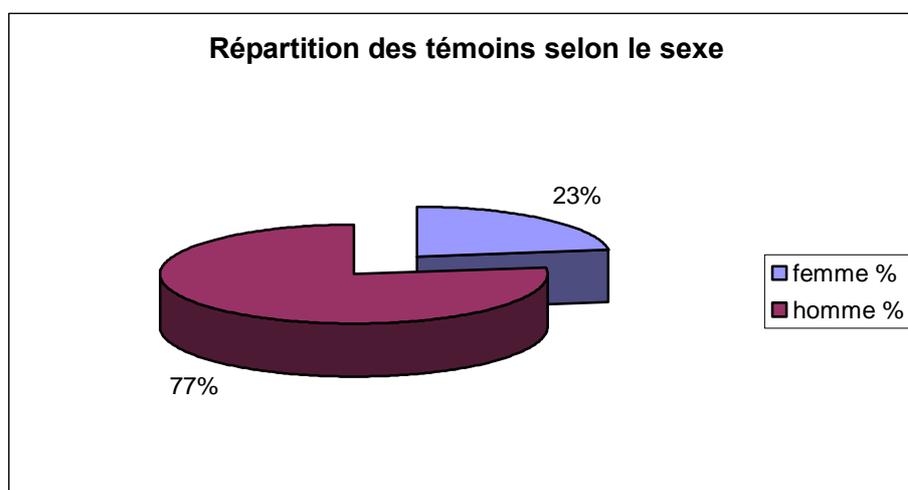
- 1- au tabagisme : le tabagisme provoque une insulino-résistance (10) chez les sujets sains comme chez les diabétiques, avec pour conséquences une augmentation du risque de diabète de type 2 chez les fumeurs et une aggravation des complications macrovasculaires chez les diabétiques. Le tabagisme aggrave également les complications microangiopathiques, notamment néphrologiques, et neuropathiques,

du fait d'une augmentation du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c), mais surtout par un effet propre du tabac (effet rénaux vasculaires, rôle de l'hypoxie et du stress oxydatif) (10). Tous nos patients de sexe masculin étaient de tabagique ou des anciens tabagique ayant commencé à un bas âge. Il serait nécessaire d'inciter les diabétiques fumeurs à arrêter de fumer.

Tableau 4: répartition des sujets (témoins, et malades) selon le sexe.

	F	M	Total
Témoins	25	85	110
DNID	36	67	103
RD.	9	5	14

RD : sujets présentent une rétinopathie diabétique.



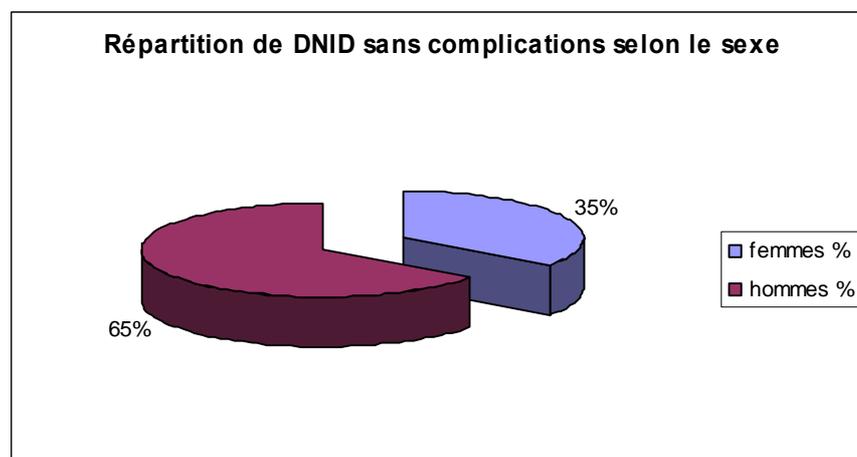
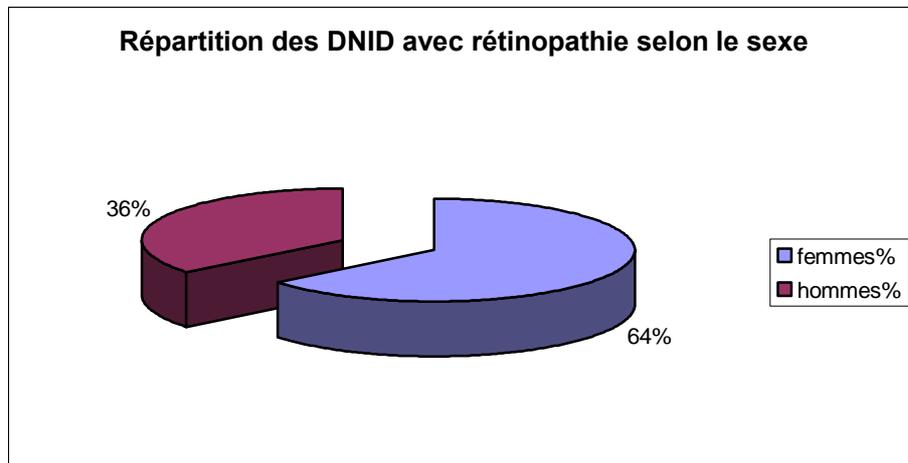
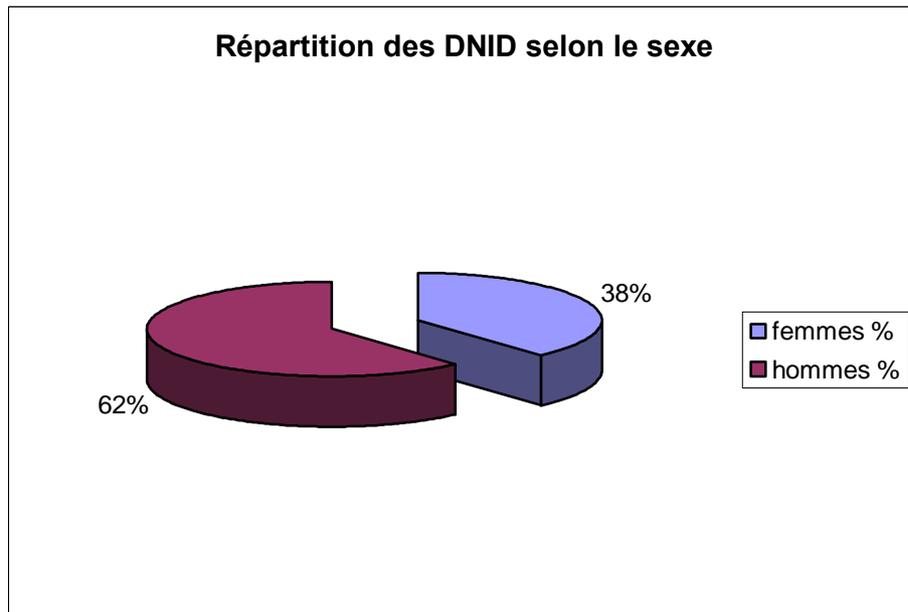


Figure 10 : la Répartition selon la pathologie et le sexe

3. Répartition en tranche d'âge

Tableau 5 : répartition de témoins (T) et de diabétiques (avec et sans RD) en tranche d'âge.

	DNID		T	
	N	%	N	%
20-29	3	2,6	2	1,8
30-39	11	9,7	26	23,6
40-49	28	23,4	27	24,9
50-59	37	31,8	33	29,8
>=60	38	32,5	22	19,9
TOTAL	117	100%	110	100%

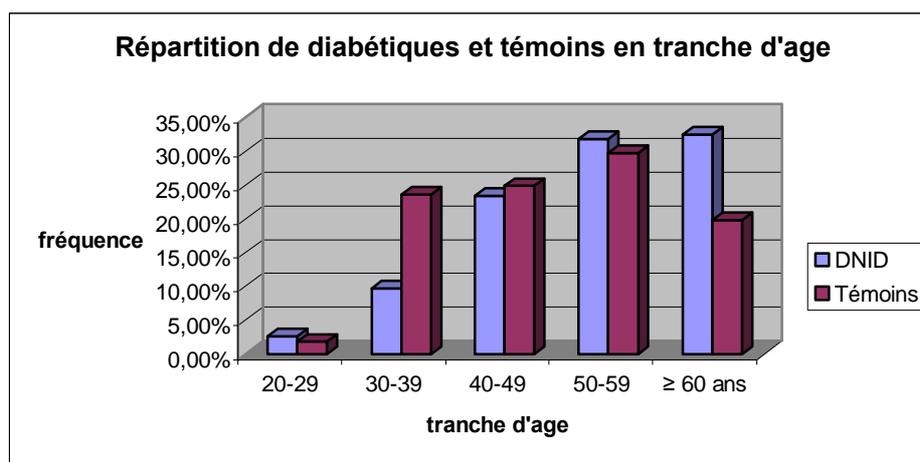


Figure 11 : Répartition en tranche d'âge des témoins et de diabétiques (avec ou sans complications)

Pour ce qui est de la répartition en tranche d'âge le Tableau 5 et la Figure 11 ci-dessus montrent que l'apparition du DNID, augmentent avec l'âge, et c'est ce qui a été démontré par de nombreuses études (112).

4. Moyennes d'âge :

Tableau 6 : moyennes d'âge dans les deux groupes

	F	M	Moyennes
Témoins	45,56 ± 10,9	43,92 ± 9,57	44,26 ± 9,85
DNID	53,56 ± 12,4	53 ± 12,44	53,8 ± 12,44
RD.	58,89 ± 1,6	61,41 ± 4,74	61,43 ± 10,11

La moyenne d'âge de diabétiques qui ne présentent pas des complications est de 53,8 ± 12,44 par opposition aux témoins dont la moyenne d'âge est de 44,26 ± 9,85. Ce que concorde avec des nombreuses études qui montrent que le DNID s'observe indépendamment de sexe dans la plupart des cas après l'âge de 50 ans, et ne suit aucune répartition géographique ou ethnique particulière (113).

Les diabétiques présentant une rétinopathie avaient une moyenne d'âge de 61,43 ± 10,11 ce que concorde avec la littérature où la prévalence de rétinopathie est de 40 % après 10 ans de diabète (84) (85).

La moyenne d'âge de femmes avec rétinopathie été de 58,89 ± 1,6. Celle des hommes été de 61,41 ± 4,74.

5. Complications :

Les infections représentent la première cause d'hospitalisation des patients diabétiques.

La raison d'hospitalisation pour les femmes était un DNID non équilibré, une seule femme présentait une amputation, par contre la majorité des hommes présentent une artériopathie chronique des membres inférieurs, et un certain nombre d'entre eux avaient un pied diabétique ou une amputation. Et ceci concorde avec les données internationales, où le sexe ratio pour l'artériopathie diabétique est de deux hommes pour une femme, alors que chez le patient non diabétique le rapport est de 10 hommes pour une femme (10).

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

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

La prévalence de la RD dans notre échantillon des diabétiques est de 11,96% répartis en 64,30 % femmes et 35,7 % hommes, résultat ne diffère pas beaucoup avec les données de la littérature où la prévalence de la RD chez les DNID ou chez les diabétiques dont le diabète a été diagnostiqué après l'âge de 30 ans, traités par hypoglycémifiants oraux, varie de 17 à 65 %, et celle de la rétinopathie diabétique proliférante (RDP) de 1,4 % à 8,8 %. Chez les diabétiques de type 2 traités par insuline, la prévalence de la RD et de la RDP est plus élevée et avoisine les taux de prévalence observés chez les diabétiques de type 1 où la prévalence de la RD chez les sujets dont le diabète a été diagnostiqué avant 30 ans varie de 47 à 75 % (10).

La rétinopathie semble toucher beaucoup plus les femmes (64,30 %) par rapport aux hommes (35,7 %), plusieurs paramètres peuvent entrer en considération:

1- L'hypertension artérielle (HTA), Dans notre population de diabétiques, le nombre des femmes présentant une HTA est plus grand que le nombre d'hommes, selon les données de la littérature, dans la population générale, le sexe masculin est plus atteint par l'HTA que les femmes à travers le monde. Et l'HTA chez les diabétiques de type 2 est responsable de rétinopathie exsudative (10).

2- les diabétiques de sexe masculin dans notre étude sont des tabagique, c'est peut être la raison pour laquelle ils sont moins atteints de rétinopathie par rapport au femme, les différentes études recherchant un lien entre la RD et tabagisme sont le plus souvent négatives. Le peu d'études publiées ne montrent pas d'association entre tabac et RD chez les sujets diabétiques de type 2, voire une diminution du risque de RD avec le tabagisme (10). En effet, il n'est pas rare que le DNID évolue silencieusement pendant plusieurs années avant d'être découvert, et qu'une RD soit présente à la découverte du diabète. Dans l'UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) chez 2964 patients diabétiques de type2 dont le diabète venait d'être découvert, la prévalence de la RD était de 39 % chez les hommes et de 35 % chez les femmes au moment du diagnostic du diabète (114) résultat qui ne concorde pas avec le notre.

6. Marqueurs Biologiques

1-la glycémie :

Même si l'HbA1c reste « l'étalon or », la mesure de la glycémie à jeun et en période prandiale est un outil préliminaire pour l'estimation de la qualité et de la sécurité de l'équilibre du diabète (115) Tous nos patients présentent une glycémie supérieure aux normes lors du dosage à chaque prélèvement sanguin bien qu'ils soient sous traitement.

L'équilibration trop rapide de la glycémie par des injections multiples d'insuline chez les diabétiques de type 1 ou par la mise à l'insuline chez des diabétiques de type 2 peut entraîner une aggravation de la rétinopathie. Le traitement médical de la RD est essentiellement celui du diabète. En effet l'utilité d'un bon contrôle glycémique sur l'incidence et la progression de la RD a été suggéré par de nombreuses études (10).

2- Micro albuminurie :

La protéinurie est la plus fréquente des anomalies urinaires, voire le seul signe d'une atteinte rénale. La protéinurie physiologique varie de 20 à 100mg/24h ; elle est composée pour 30 % d'albumine et 70% de globulines. La micro albuminurie se définit comme l'excrétion accrue d'albumine comprise entre 30 et 300mg / 24 heures ou entre 20 et 200ug/min. C'est un marqueur prédictif de l'apparition de certaines néphropathies, notamment chez le diabétique et en cas d'hypertension. La variabilité individuelle de l'excrétion urinaire de la micro albumine est importante (40 à 60%) ce qui justifie la répétition de l'examen avant d'affirmer une micro albuminurie permanente.

La micro albuminurie sert de marqueur précoce de néphropathie débutante dans le diabète insulino-dépendant de type 1 et de marqueur de risque cardiovasculaire dans le diabète de type 2, et elle est associée à la présence d'une insulino-résistance (116). Ainsi Gerstein HC a montré que la présence d'une microalbuminurie était associée à un risque relatif d'événements cardiovasculaires majeurs doublé chez le patient diabétique, et que par ailleurs, pour chaque augmentation du rapport albumine/créatinine urinaire de 0,4mg/mmol, ce risque augmentait de 5,9 % (117); chez nos patients la présence ou l'absence d'albumine, ont été observé. Ainsi nous passons des valeurs normo albuminuriques (< 30µg/mg créatinine), à une microalbuminurie (30 à 300 µg/mg créatinine) et à un état de macroalbuminurie (> 300 µg/mg créatinine). Il est important de vérifier la normalité de l'excrétion urinaire d'albumine après le diagnostic de diabète, afin de s'assurer de l'absence d'une glomérulopathie. Ultérieurement, le dépistage d'une excrétion urinaire anormale se fera par la mesure de l'albuminurie annuellement au minimum, en cas de positivité (30 à 300µg/mg créatinine), une vérification doit être effectuée à chaque consultation, par exemple à 4 ou 6 mois d'intervalle.

Tableau 7 : fréquence des valeurs d'albumine chez nos DNID (avec et sans RD)

	% Homme	% Femme
Normo albuminurie (< 30µg/mg créatininurie)	49.6 %	52.6 %
<u>Micro albuminurie (30-300µg/mg créatininurie)</u>	24.4 %	32.4 %
Macro albuminurie (>300µg/mg créatininurie)	12 %	10.2 %
> 1000 µg/mg créatininurie	14 %	4.8 %

Tableau 8 : Comparaison des Moyennes des micro albuminurie dans les diabétiques et chez les témoins.

	Hommes		Femmes	
	Témoins	DNID	Témoins	DNID
µalbuminurie	3,76 ± 5,93	20,72 ± 23,39***	4,71 ± 5,13	22,44 ± 26,37***

	Témoins	DNID	DNID-C
µalbuminurie	4,03 ± 5,68	21,52 ± 24,74***	31,78 ± 28,57***

P<0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001, DNID-C: RD.

On remarque une nette augmentation globale des taux des microalbuminuries chez les deux groupes de diabétiques. La valeur moyenne de l'albuminurie chez les témoins n'est pas indicatrice de microalbuminurie. Le tableau 8 montre que la différence des moyennes des microalbuminuries entre l'ensemble des diabétiques et les témoins, est très significative à tous les ages et indépendamment du sexe (p< 0.001).

Ces variations sont identiques à toutes les études épidémiologiques effectuées à travers le monde (118), (119).

Une excrétion urinaire d'albumine élevée est un marqueur de risque pour la mortalité cardiovasculaire prématurée. Ceci est constaté chez les diabétiques de type 1, les diabétiques de type 2, mais aussi dans la population générale, que ce soit pour la microalbuminurie ou pour la protéinurie; ainsi la cohorte française DESIR (Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance) a montré que la

microalbuminurie est étroitement associée au risque de développement d'une glycémie élevée dans la population générale, indépendamment des paramètres métaboliques conventionnels. Ceci suggère l'intérêt pronostique de la microalbuminurie comme marqueur précoce d'insulino-résistance, pouvant permettre de mieux cibler la population à risque de diabète (10).

La moyenne de la microalbuminurie chez les diabétiques avec rétinopathie est franchement élevée par rapport au diabétique sans rétinopathie. Ceci concorde avec différentes études réalisées à travers le monde qui démontrent que l'association de la microalbuminurie à la rétinopathie est possible puisque la néphropathie comme la rétinopathie sont des manifestations de la microangiopathie diabétique. Ainsi devant une glomérulopathie chez un diabétique, on retient le diagnostic étiologique de néphropathie diabétique, par argument de fréquence, s'il existe une rétinopathie diabétique.

En effet, si une rétinopathie diabétique coexiste avec une protéinurie clinique, la probabilité de découvrir à la biopsie rénale des nodules de Kimmestiel-Wilson dépasse 95% (10). Donc la présence d'albumine (miro ou modérée ou même macro) et associée à la rétinopathie diabétique (pré/proliférative).

3-HbA1C

Les hémoglobines (Hb) glyquées et plus spécifiquement l'HbA1c sont utilisées pour l'évaluation rétrospective de l'équilibre glycémique au long cours (3 mois avant la date du prélèvement) (120)

Nos patients présentent des valeurs d'HbA1c ≥ 6 %.

Tableau 9 : Comparaison des Moyennes d'HbA1c dans les DNID (avec et sans RD) et chez les témoins

	Hommes		Femmes	
	Témoins	DNID	Témoins	DNID
HbA1C	5,46 ± 1,19	8,33 ± 2,58***	5,64 ± 0,67	8,10 ± 2,81***

	Témoins	DNID	DNID-C
HbA1C	5,51 ± 1,07	8,22 ± 2,69**	9,51 ± 3,50**

* p< 0.05, ** p<0.01, *** p< 0.001

Pour les patients diabétiques de type 2, le contrôle de l'hyperglycémie a pour objectif de préserver la qualité de vie, notamment en évitant les symptômes lié à l'hyperglycémie et aux complications microangiopathiques du diabète. Le contrôle glycémique moyen est généralement apprécié en termes d'hémoglobine glyquée, ou plus précisément d'HbA1c.

Dans le diabète de type 2, les seules données comparatives dont on disposait jusqu'alors pour fixer les valeurs d'HbA1c à atteindre provenaient de l'essai dit "UKPDS". Dans cet essai, les complications cliniques du diabète ont été plus rares dans le groupe où le traitement était le plus strict, aboutissant à une HbA1c médiane de 7,0 %, que dans le groupe traitement moins strict, qui a eu une HbA1c médiane de 7,9 % . Mais il n'y a pas eu de différence statistiquement significative entre ces deux groupes en termes de mortalité totale ni de complications cardiovasculaires.

Les informations disponibles en février 2008 incitent à ne pas viser une HbA1c inférieure à 6 % chez les patients diabétiques de type 2.

Viser une HbA1c autour de 7 % reste raisonnable pour prévenir la microangiopathie. Pour prévenir les accidents cardiovasculaires et réduire la mortalité des patients diabétiques de type 2 (121).

Le tableau 9 montre une différence très significative (P <0.001) entre les deux groupes DNID et les témoins, et dans les deux sexes. Ceci concorde avec toutes les études

épidémiologiques effectuées, parce que cette population de diabétique est considérée très hétérogène et déséquilibrée par rapport aux témoins.

Cette moyenne de HbA1c dans notre population de diabétique sans complications est supérieure à celle trouvée par Jiazhong Sun et al (122).

L'étude de Jiazhong Sun et al a été effectuée sur 220 diabétiques de type 2 et 130 sujets contrôles présumés sains, la moyenne de l'HbA1c chez les diabétiques sans complications été de : 7.3 ± 2.8 .

Cependant ces valeurs concorde aussi avec l'étude de Rebecca L. Pollex et al, réalisée sur un échantillon de 189 diabétiques de type 2, la moyenne de l'HbA1c trouvée dans le groupe ne présentant pas des complications été de 8.44 ± 2.29 (123).

Dans notre étude la moyenne de l'HbA1c chez les diabétiques sans complications été inférieur à celle de diabétiques présentent une RD. Un résultat qui concorde avec la littérature. Différentes études à travers le monde montrent l'association entre les complications microvasculaires et l'HbA1c, Fong et al démontrent qu'il y'a une réduction de 35 % dans le risque de complications microvasculaire, chaque fois que l'HbA1c baisse par 1 % (124). Basé sur cette description, le mauvais contrôle de glucose du sang peut masqué que l'origine de la rétinopathie a dérivé de polymorphisme du gène MTHFR. C'est pour cette raison que Makiko M et al proposent que le polymorphisme de gène MTHFR contribue à la progression de la RD, d'une manière synergique avec le mauvais contrôle du glucose du sang (125).

L'HbA1c reste un marqueur prédictif du DNID de façon moins discriminante que la glycémie à jeun, dans la population entière. Par contre, chez les sujets ayant une hyperglycémie modérée à jeun, l'HbA1c permet de mieux déterminer le risque d'évoluer vers un diabète (121).

comme un facteur de risque cardiovasculaire, indépendant des autres facteurs de risque. Cependant, la valeur consensuelle du seuil pathologique n'est pas définie ; une des raisons pourrait être le manque de standardisation des conditions pré-analytiques et analytiques(96). Plusieurs facteurs déterminent le taux d'homocystéine dans le sang. Le métabolisme normal de l'homocystéine est contrôlé en partie par les vitamines B6, B12 et l'acide folique dans l'alimentation. Même de très légères déficiences de ces vitamines, qui peuvent être dues à une consommation alimentaire insuffisante ou à l'incapacité de l'organisme à les absorber, peuvent entraîner une augmentation des taux d'homocystéine. Parmi les autres facteurs, on retrouve l'âge, le sexe (taux plus élevé chez les hommes), la prédisposition génétique (exemple la mutation C677T de la MTHFR), la fonction rénale(127), et le style de vie tel que la prise de café. La consommation de café est franchement associée à la concentration de l'homocystéine dans la plupart des études. La caféine pourrait être le facteur qui augmente la concentration de l'homocystéine. En plus de l'acide chlorogénique, un polyphénol qui est présent dans le café dans la même quantité que la caféine, peut être également en partie responsable de cette augmentation (128), alors que d'autres études montrent que la réponse au café peut aussi être modulée par les facteurs génétiques. (129).

On trouve aussi parmi les autres facteurs le tabagisme qui est associés à l'augmentation de la concentration de l'homocystéine. Le mécanisme exact derrière ce phénomène n'est pas identifié (130).

On remarque que nos résultats sont significatifs, et que l'hyperhomocystéinémie est liée à la rétinopathie diabétique sans différence significative entre les degrés de la prolifération. Et ceci concorde avec le résultat trouvée par le Dr Amrane M. dans une étude réalisée à Sétif (83), mais nos moyennes d'homocystéinémie et chez nos trois groupes (témoins, diabétiques sans complications et diabétiques avec RD) sont supérieurs aux moyennes

trouvées dans cette études, ceci est due peut être aux conditions préanalytiques et analytiques. Notre résultat concorde aussi avec d'autres résultats réalisés par d'autres études cliniques, épidémiologiques et expérimentales, suggèrent que l'hyperhomocystéinémie est associé au diabète de type2 ainsi qu'aux ses complications micro et macroangiopathiques (131) (132).

Dans notre échantillon la moyenne de l'homocystéinémie est élevée chez les femmes par rapport au sexe masculin et dans les deux groupes témoins et diabétiques ; chez les diabétiques, ceci peut être expliqué par la présence marqué d'une HTA dans le sexe féminin, de rhumatisme articulaire, et d'hyperthyroïdisme, selon différentes études l'élévation de la concentration de l'homocystéine est associée à ces facteurs.

Dans la population témoin la recherche des causes est nécessaire pour élucider des relations avec cette élévation de l'homocystéine.

Cette différence de répartition entre femmes et hommes ne concorde pas avec l'ensemble de la littérature. Habituellement à age égal, l'homocystéinémie est plus élevée de 1 $\mu\text{mol/l}$ chez l'homme que chez la femme, au moins jusqu'à 70 ans. Les causes possibles pourraient être une interférence des hormones féminines avec le métabolisme de l'homocystéine, une fonction rénale meilleure, et une masse musculaire moins importante chez les femmes (133). Lors de la grossesse, l'homocystéinémie diminue de plus d'un tiers.

Si l'on compare la moyenne de l'homocystéinémie des diabétiques par rapport aux témoins, celle de diabétiques sans complications est élevée par rapport aux témoins, ceci concorde avec l'étude réalisée par Rudy A (134).

- Homocystéine et Rétinopathie :

Les diabétiques présentent une RD ont une homocystéine plus élevée que les témoins et les diabétiques sans complications, et la différence est significative (voir tableau 9). Les travaux portant sur l'homocystéine et la rétinopathie sont contradictoires.

Nos résultats concordent avec certaines études telles que l'étude de Hoogeveen EK (135), et l'étude de Ellen K (136) qui montrent, qu'un taux d'homocystéinémie supérieure à 16 $\mu\text{mol/l}$ est significativement associé à la rétinopathie diabétique.

D'autres études ont démontré que l'homocystéine était un facteur de risque de la maladie occlusive rétinienne, qui est de plus en plus fréquente chez les diabétiques à partir d'un seuil de 12 $\mu\text{mol/l}$ (137) (138).

Par contre la plupart ne trouvent aucune association entre l'hyperhomocystéinémie et la rétinopathie diabétique (139).

L'association ne signifie pas une causalité. Si l'hyperhomocystéinémie est une des causes de la complication, elle doit pouvoir permettre de pronostiquer la complication de la rétinopathie diabétique, et sa correction doit permettre de prévenir ces lésions.

D'autres travaux ont rapporté l'association de l'hyperhomocystéinémie à la rétinopathie diabétique en fonction de la durée de la maladie (140). La relation de l'homocystéine, le type de traitement chez le diabétique et la survenu de rétinopathie, a été aussi un sujet de controverse entre plusieurs études ; ceci fourni une base pour approfondir les recherches dans l'objectif d'élucider la relation entre l'homocystéine et les complications de diabète de type 2, après ajustement sur tous les autres facteurs de risque (sexe, age, cholestérol, triglycérides, cholestérol-HDL cholestérol-LDL, microalbuminurie, HbA1c, HTA, Tabagisme...).

5-Profil lipidique

Du fait de la perturbation du métabolisme lipidique associé au diabète, le bilan lipidique est devenu un examen clinique obligatoire.

Tableau 11: Comparaison des Moyennes des paramètres lipidiques dans le diabète et Chez les témoins.

<i>Lipides</i>	Hommes		Femmes	
	Témoins	DNID	Témoins	DNID
Chol	1,77 ± 0,36	1,94 ± 0,39	1,93 ± 0,42	2,01 ± 0,43
TG	1,10 ± 0,49	1,39 ± 1,01*	1,08 ± 0,60	1,33 ± 1,19*
C-HDL	0,44 ± 0,11	0,39 ± 0,10*	0,52 ± 0,18	0,42 ± 0,08**
C-LDL	1,16 ± 0,29	1,21 ± 0,35	1,23 ± 0,42	1,30 ± 0,35

* p< 0.05, ** p<0.01, *** p< 0.001

	Témoins	DNID	DNID-C
Chol	1,77 ± 0,36	1,94 ± 0,39	2,07 ± 0,41*
TG	1,10 ± 0,49	1,36 ± 1,01*	1,48 ± 0,60*
C-HDL	0,44 ± 0,11	0,40 ± 0,10*	0,37 ± 0,18**
C-LDL	1,16 ± 0,29	1,26 ± 0,35*	1,27 ± 0,41*

La comparaison des moyennes des lipides entre les patients diabétiques (avec ou sans RD) et les témoins montre qu'il y a des différences significatives entre les deux populations et dans les deux sexes.

5.1.le cholestérol :

Pour la cholestérolémie, il n'existe pas des différences significatives entre les deux sexes, et dans les deux populations, ainsi elle varie indépendamment de l'âge et du sexe, et dans les deux populations.

Pour l'ensemble de la population des témoins, la moyenne est de 1.77 ± 0.36 (Tableau 11).

Cette moyenne est plus basse que celle trouvée par Ghannem et col. (141) en Tunisie dans une population du sahel (1.88 g/l) et plus élevée que celle trouvée par une autre équipe de Tunisie du Cap-Bon. (142) qui retrouve un taux de 1.74 g/l.

La cholestérolémie est légèrement augmentée chez les diabétiques, mais sans écart significatif entre témoins et diabétiques sans complications. La moyenne d'âge chez les témoins et les diabétiques, dans notre étude est de 50 ans, nos résultats concorde avec les études effectuées sur la cholestérolémie. En fonction du sexe, de l'âge, des antécédents familiaux ou de l'hygiène de vie, des différences existent d'un individu à un autre. Un taux de cholestérol élevé peut aussi avoir des origines génétiques puisque, en fonction de leur alimentation triée, de leur hygiène de vie et de leur activité physique, les pratiquants de sports d'endurances, hormis les héritages génétiques défavorables, se montrent peu exposés à l'hypercholestérolémie (143).

Tous les études épidémiologique effectuées montrent que les femmes présentent un profil lipidique beaucoup plus favorable, grâce à une protection hormonale, par rapport aux hommes et en l'absence de toute pathologie, les hommes âgés de plus de 45 ans, et les femmes après la ménopause, sont exposés à un risque d'hypercholestérolémie (144).

La comparaison de moyenne de cholestérolémie entre les trois populations : témoins, DNID et DNID-c montre une augmentation significative chez les DNID-c par rapport aux témoins, et la différence est statistiquement non significative entre les diabétiques avec rétinopathie et les diabétiques non compliqués. Différentes études divergent sur ce point, plusieurs retrouvent des taux normaux de cholestérol chez les diabétiques de type2, alors que d'autres trouvent des augmentations. Par comparaison aux témoins dans notre étude, l'hypercholestérolémie constitue un autre facteur de risque sur la rétinopathie diabétique.

5.2. Triglycérides (TG):

Différentes études ont montrés que les triglycérides présentent des variations avec l'âge et le sexe. Chez l'homme la triglycéridémie s'élève régulièrement jusqu'à l'âge de 40 ans et se stabilise ensuite, alors que chez la femme elle reste stable et augmente après la ménopause. La grossesse est marquée par une élévation progressive de la triglycéridémie, nette dès la 28^{eme} semaine d'aménorrhée. Une alimentation riche en glucides à absorption rapide, les boissons alcoolisées, la surcharge pondérale favorisent l'augmentation des triglycérides, de même une alimentation riche en graisse saturée. L'utilisation d'huile avec des acides gras mono ou polyinsaturés diminue la triglycéridémie. L'alcoolisme chronique s'accompagne d'hypertriglycéridémie d'intensité très variable (100).

Dans notre étude on remarque que les moyennes des valeurs des TG sont significativement augmentées dans l'ensemble des patients diabétiques, et sans différences distinctes entre les deux sexes. Des nombreuses études montre que l'hypertriglycéridémie est particulièrement fréquente chez le diabétique de type 2, et essentiellement due à une augmentation des VLDL et à un moindre degré des IDL (145).

Ainsi plusieurs études ont montrés que la sécrétion de VLDL est un facteur clé dans la survenue d'une résistance à l'insuline. En revanche, la sécrétion de VLDL ne contribue pas à l'augmentation de masse grasse, plus particulièrement dans le tissu adipeux (10).

L'augmentation des triglycérides dans notre échantillon est retrouvée dans les deux populations des diabétiques mais un peu plus élevée chez les diabétiques avec rétinopathie. Notre étude ne montre aucune différence significative de moyenne entre les diabétiques avec rétinopathie et les diabétiques sans complications. Alors que la différence est significative entre chaque population de diabétique et les témoins. Différentes études montrent qu'après ajustement sur l'homocystéine, les triglycérides constituent un facteur de risque de la rétinopathie diabétique, le résultat est le même dans les études monovariée.

L'augmentation des triglycérides chez les diabétiques concorde avec plusieurs travaux, essentiellement ceux effectués à Constantine-Algérie par Benlatrèche Moufida et al. En 2000 concernant l'étude des variations lipidiques chez le diabétique (80).

5.3.HDL-Cholestérol ;

Selon les données de la littérature le taux de cholestérol-HDL est supérieur chez la femme et sa concentration diminue après la ménopause. Lors de la grossesse on note des modifications des HDL. Il faut attendre 3 mois après l'accouchement pour effectuer une exploration d'une anomalie lipidique. Pour l'influence des facteurs environnementaux, le tabac, l'obésité, et les progestatifs provoquent la diminution du cholestérol-HDL. Alors que l'exercice physique, l'alcool, les oestrogènes et la corticothérapie augmentent le taux du cholestérol-HDL.

Il est connu que les HDL des patients diabétiques de type 2 présentent un enrichissement en triglycérides et une augmentation de la glycation. Cet enrichissement en triglycérides des HDL est associé à une incapacité à contrecarrer l'effet inhibiteur des LDL oxydées sur la vasorelaxation, ce qui suggère une diminution de l'effet antiathérogène de ces particules(10).

On remarque une diminution globale des concentrations des HDL-C chez les diabétiques par rapport aux témoins, et dans les deux sexes.

Le Tableau 11 montre que la différence des moyennes du C-HDL est plus marquée chez les femmes diabétiques, et la différence des moyennes est significative entre les témoins et les diabétiques avec rétinopathie. Alors qu'il n'existe pas de différence significative entre les diabétiques sans complications et les diabétiques avec rétinopathie.

Toutes les études effectuées sur les dyslipoprotéinémie et le diabète, montrent que le diabète de type 2 est associé à une diminution du taux plasmatique d'HDL-cholestérol,

prédominant sur la sous-fraction HDL₂, qui apparaît étroitement corrélée à l'hypertriglycéridémie d'une part, et à l'obésité d'autre part (146). C'est probablement par cette relation inverse avec le cholestérol HDL que les triglycérides jouent le rôle principal dans la genèse de l'athérosclérose et donc de la rétinopathie.

La réduction du HDL-cholestérole est liée à l'accroissement de son catabolisme en partie favorisé par une augmentation de l'activité de la lipase hépatique, enzyme en cause dans le catabolisme des HDL (147).

Dans notre échantillon la différence de moyennes de cholestérol-HDL entre les femmes diabétiques et les femmes témoins, été significative ceci peut être dû à l'obésité du fait que la majorité des femmes diabétiques dans notre études étaient plus ou moins obèses, et l'obésité est connu comme un facteur de diminution des HDL-cholestérols.

Même si l'impact du cholestérol diminue avec l'âge, sa valeur prédictive est retrouvée lors du fractionnement en HDL et LDL.

5.4. LDL-cholestérol :

La comparaison des moyennes des LDL entre chaque population de diabétiques (avec rétinopathie et diabétiques sans complications) et témoins, et dans les deux sexe, montre qu'il n'y a pas des différences significatives. Alors que sans prendre le sexe en considération, la différence est légèrement significative entre les diabétiques sans complications et les témoins, ainsi qu'entre les diabétiques avec rétinopathie et témoins. On remarque une légère augmentation.

Ce résultat concorde avec certaines études effectuées sur le LDL-cholestérol au cours de diabète de type 2, qui montre qu'en présence d'un syndrome métabolique ou d'un diabète déclaré, les concentrations plasmatiques des particules de LDL-cholestérol oxydés sont souvent élevées ; tel que l'étude de Abderrahmani A, où il a conclu que la perte de

l'expression de l'insuline est induite par l'augmentation de concentrations plasmatiques des LDL-cholestérol (148).

Selon d'autres études la différence ne pas significative entre témoins et diabétiques de type2 dans les valeurs de LDL- cholestérol. Si le taux plasmatiques de LDL-cholestérol est normal au cours de diabète de type 2, il est observé en revanche des modifications importantes de son métabolisme. En effet, il a été montré in vivo, chez les patients diabétiques de type 2 ayant un taux de LDL-cholestérol identique à celui d'une population normale, une diminution de 28 % du catabolisme des LDL compensée par une réduction de leur production (149).

C'est ainsi que malgré un taux plasmatique normal, le LDL des patients diabétiques présentent un ralentissement de leur métabolisme, c'est-à-dire une augmentation de leur temps de résidence plasmatique, susceptible de les rendre plus athérogènes.

Ce ralentissement du catabolisme des LDL selon DUVILLARD est en partie lié à une réduction du nombre des récepteurs LDL, comme cela a été montré in vivo (150).

D'après WADE cette diminution du nombre des récepteurs LDL apparaît secondaire à la carence « relative » en insuline (151).

La légère augmentation trouvée dans le taux de LDL-cholestérol chez nos diabétiques, dans notre étude peut être expliquer par l'insulinothérapie, selon certains études (les résultats de différentes études restent controversé à ce sujet) la mise sous insuline provoque une augmentation de taille des LDL-cholestérol chez le diabétique de type2 (152).

Cependant, les valeurs retrouvées chez nos diabétiques sont moins élevées que celle trouvées dans les pays occidentaux. Cette différence est probablement due au régime alimentaire.

7. Répartition des fréquences génotypiques dans les trois groupes:

Le tableau 12 montre la comparaison des fréquences génotypiques entre les témoins et les diabétiques. Nous avons déterminé le génotype des témoins et des malades par la méthode PCR suivi d'une digestion enzymatique (Tableau 12).

Tableau 12 : fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR

	Témoins		DNID		DNID-C	
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)		
CC	45	45.5	42	41.6	6	42.8
CT	46	45.5	51	50.5	7	50
TT	10	10	8	7.9	1	7.2
Total	<i>101</i>	100	<i>101</i>	100	14	100

Le tableau 12 montre la comparaison des fréquences génotypiques entre les témoins et les diabétiques. Nous avons déterminé le génotype de 101 témoins et 101 DNID et 14 DNID-C (RD).

Le génotype C/T présente la même fréquence que le génotype C/C dans notre population témoin, il représente 45.5 % ceci diffère avec certains études réalisées à travers le monde, et concorde avec d'autres (Tableau 13).

Tableau 13: Fréquence génotypique de la population Constantinoise comparées à d'autres groupes ethnique (153).

	N	TT	CT	CC
G. Bretagne	199	12.1	47.2	40.7
Cne	101	10	45.5	45.5
France	133	9.8	52.6	37.6
Allemagne	153	7.2	26.1	32.0
Italie	2053	18.0	51.5	30.5
Suède	126	10.3	39.7	50
Afrique du sud	301	0	12.6	87.4
Yémen	46	2.2	30.4	67.4
Turquie	93	7.5	42.0	50.5
Japon	310	13.5	51	35.5

La distribution des génotypes du polymorphisme de la C677T du MTHFR ne diffère pas beaucoup entre les témoins et les diabétiques, et elle présente le même ordre décroissant en fréquences correspondant aux génotypes CT, CC, TT respectivement (Tableau 12).

Selon les résultats obtenus (Figure 12), on peut observer que le génotype CT est plus fréquent chez les malades atteints d'un DNID (compliqué ou non), son pourcentage est presque le même entre les trois groupes (témoins, DNID, DNID-C)

Le phénotype homozygote muté TT, correspond à une fréquence de 7.9 % chez les DNID de 7.2 % chez les DNID-C, et de 10 % chez les témoins montrant que la présence de cette mutation n'est pas corrélée ni à la maladie ni à la présence d'une rétinopathie diabétique. Ce résultat concorde avec certain nombre d'études (154) (138). En revanche d'autres études démontrent que la mutation TT 677 de la MTHFR est associée à la rétinopathie diabétique tel que l'étude de Maeda M et al (155) cette étude a démontrée que la présence de la mutation C677T dans le gène de la MTHFR chez les diabétiques, peut être prédictive pour la rétinopathie diabétique et spécialement, la non proliférative diabétique rétinopathie (NPDR). La discordance entre notre étude et l'étude de Maeda et al peut être expliquer par les autres facteurs de risque de la RD, tel que la néphropathie diabétique, parce que les auteurs n'ont pas précisés qu'ils ont exclu l'insuffisance rénale, alors que dans notre étude on a pris les diabétiques qui ont uniquement une RD comme complication.

Une autre étude effectuée sur une population Israélienne d'âge moyen a révélée une association entre la présence de génotype TT de la mutation et la RD (156), la positivité de résultat de cette étude, peut-être dû à la non uniformité d'origine ethnique de la population Israélienne, surtout du fait qu'elle n'a pas une histoire génétique (origine) constante, ou peut être que leur découverte reflète la chance du fait que le budget de la recherche scientifique chez les Israéliens est de 2,35 % et il est de 0,2 % dans l'ensemble de pays Arabes.

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

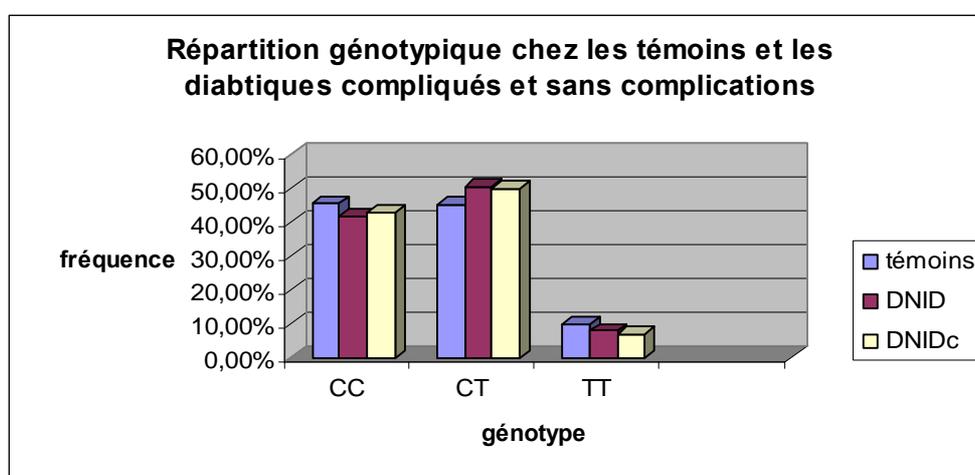


Figure 12 : Répartition des fréquences génotypiques dans la population de Témoins et dans les Diabétiques.

8. Répartition des fréquences alléliques dans les trois groupes

Le tableau 14 montre que la répartition des allèles de la MTHFR est inégale sur l'ensemble de trois groupes. Cependant on trouve que l'allèle T présente la même fréquence dans les trois groupes (Figure 13), chez les témoins il est de 32.7 % par rapport à 33.2 % chez les DNID, et 32.2 % chez les DNID-C ; ce que confirme la non implication de l'allèle T dans l'apparition d'un DNID ni dans la survenue d'une rétinopathie diabétique.

Tableau 14: Fréquences alléliques de la MTHFR dans la population malade et témoins.

	Témoins		DNID		DNID-C	
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)		
C	136	67.3	135	66.8	19	67.8
T	66	32.7	67	33.2	9	32.2
Total	202	100	202	100	28	100

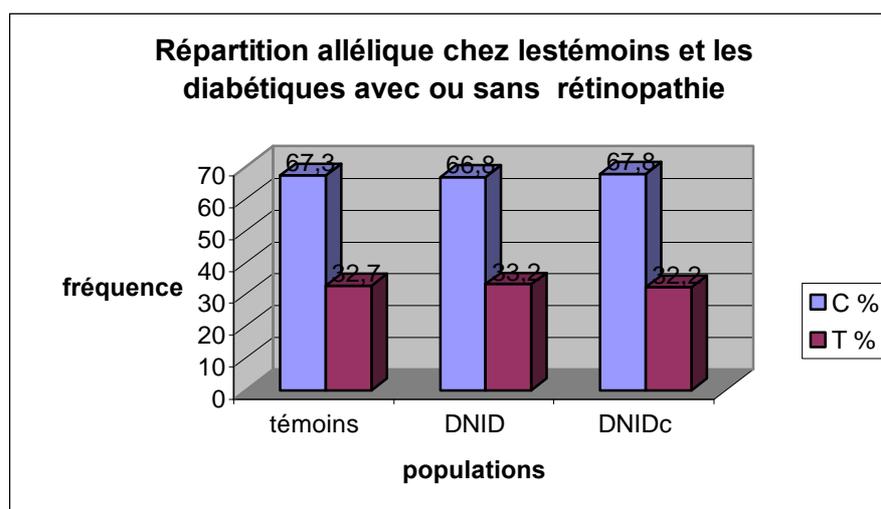


Figure 13 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin et dans les DNID avec ou sans rétinopathie

A ce stade de notre travail nous ne pouvons tirer des conclusions en ce qui concerne la relation entre la présence de l'allèle T et les autres complications dégénératives (mis à part la rétinopathie). Comme rapporté dans la littérature.

Tableau 15 : Fréquence alléliques de la population Constantinoise comparées à d'autres groupes ethniques

Population	Fréquence de l'allèle T
Grande Bretagne	35.7
France	36.1
Allemagne	20.3
Italie	43.8
Suède	30.2
Afrique du sud	6.3
Yamin	17.4
Turquie	28.5
Japon	39.0
Constantine	32.7

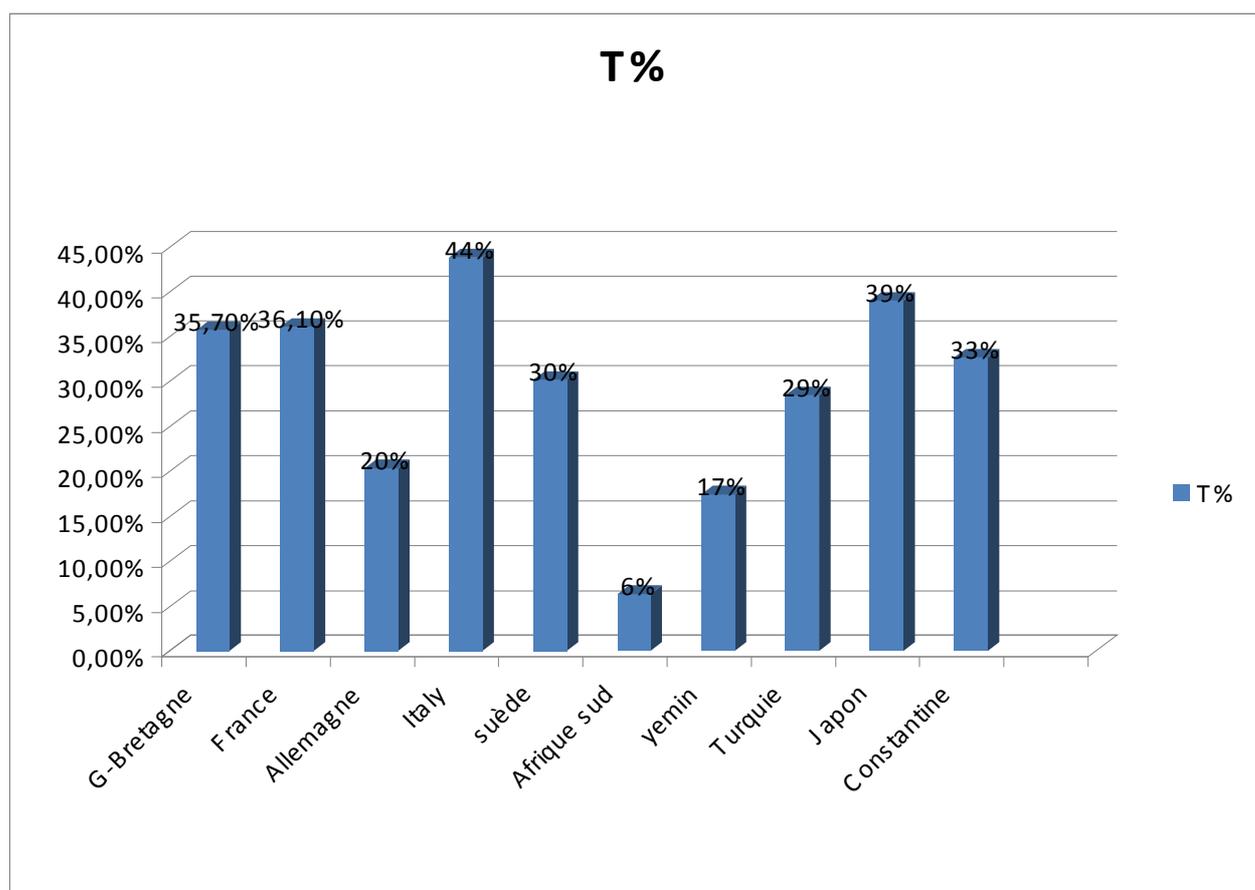


Figure 14 : Fréquence de l'allèle T du polymorphisme C677T de la MTHFR dans différentes populations.

L'observation de la fréquence de l'allèle T dans différentes populations (Tableau 15, Figure 14), montre un gradient nord-sud de sa distribution ; la mutation est plus fréquente dans le pays du nord que celles du sud du globe terrestre, l'explication peut être un effet fondateur de la mutation.

Tableau 16 : Calcul des odds ratio des sujets malades ayant un allèle T par rapport aux témoins ayant un génotype CC.

	Odds ratio	P
TT vs CC	0.88 (0.53 < OR < 1.63)	ns
TT+CT vs CC	1.13 (0.80 < OR < 1.41)	ns

* : Limites de confiance selon Cornfield à 95%

Tableau 17 : Calcul des odds ratio des DNID-C ayant un allèle T par rapport aux témoins ayant un génotype CC.

	Odds ratio	P
TT vs CC	0.80 (0.11 < OR < 6.02)	ns
TT+CT vs CC	1.10 (0.31 < OR < 3.88)	ns

* : Limites de confiance selon Cornfield à 95%

Le calcul de l'odds ratio montre que :

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

Ceci ne concorde pas avec les nombreuses études qui démontrent l'implication de l'allèle T dans la survenue de complications microangiopathiques chez les DNID, tel que l'étude réalisée par SUN Jiazhong dans la population chinoise, où la fréquence de l'allèle T chez les diabétiques de type 2 avec rétinopathie a été de 49,09 %, et elle a été de 33,16 % chez les diabétiques de type 2 sans complications, par rapport aux témoins où la fréquence de l'allèle T a été de 31,58 %, l'Odds ratio a été de 1,94 à 95 %, avec un intervalle de confiance de (1,31-2,88), il a conclu que l'allèle T est étroitement liée à la rétinopathie chez le diabétique de type 2 (157). La discordance de notre étude avec cette étude peut être expliquée par la présence (dans cette étude) de 56 diabétiques avec néphropathie, parmi les 110 diabétiques avec rétinopathie ; et selon les données de la littérature, l'allèle T est associé à la présence de néphropathie diabétique chez le diabétique de type 2 ; alors que

dans notre étude on a exclu les diabétiques qui ont une néphropathie diabétique. Ou, peut être la disparité avec notre résultat est due aux facteurs environnementaux ou au nombre restreint des sujets diabétiques qui présentent une rétinopathie.

Conclusions et perspectives

Notre étude sur des diabétiques de type 2 poly compliqués a révélé une association d'une hyperglycémie, d'une dyslipédémie, d'une albuminurie, tous ces facteurs sont significativement corrélé au degré de gravité des complications diabétiques mais surtout responsable de l'augmentation du taux de mortalité.

Toutes ces données soulignent l'importance d'un dépistage précoce, systématique et plus efficace par un dosage de la glycémie à jeun, afin de prévenir la survenue du diabète chez les personnes à risque, soit celles qui constituent la fratrie, la descendance de chaque patient atteint d'un diabète de type 2 déjà connu et traité. Pour les personnes atteintes un suivi permet de contrôler le risque de complications micro et macroangiopathiques. De plus il est nécessaire de mettre en place une campagne de sensibilisation des populations à risque et une prise en charge plus efficiente de lutte contre les facteurs de risque des complications potentielles.

Nos résultats montrent que le DNID continue a poser un problème majeur de santé publique, aux conséquences socio-économiques très lourdes, c'est un véritable gouffre financier. Avec tous les moyens mobilisés pour sa prise en charge notamment aux USA et en EUROPE, les résultats sont décevant alors qu'en est-il pour les pays en voie de développement et spécialement pour l'Algérie, ou cette affection représente 20% du total des maladies chroniques, on compte approximativement 1.800.000 diabétiques recensés dans l'année 2007, ce chiffre ne cesse d'augmenter en matière de prévalence et de fréquence ; ceci nous laisse toujours penser : par qui et comment sont suivis nos diabétiques ? Alors que c'est a toutes les structures de prise en charge qu'incombe la tache d'assurer au diabétique une longévité dans les meilleures conditions et si possible sans complications.

Sachant que le diabète constitue un véritable fléau en Algérie, le nombre d'études en matière de dépistage, reste très limité.

Nous avons pour la première fois, étudiés la mutation C677T de la MTHFR, afin de mettre en évidence son implication dans la survenue de complications dégénératives du diabète de type 2. Nos résultats n'indiquent aucune association entre cette mutation et la survenue du diabète de type 2, ou la survenue d'une rétinopathie dans notre échantillon pris globalement.

Cependant, la détermination d'une association entre cette mutation et l'élévation du taux d'homocysteine plasmatique en tant que risque des polycomplications, pouvait contribuer à une meilleure connaissance du rôle du gène dans ces complications, et par voie de conséquence l'implication de l'homocysteine et de la supplémentation en vitamines dans leur prévention.

Les travaux doivent se poursuivre afin de mieux identifier les régions régulatrices du gène MTHFR et de comprendre leur modulation, ainsi que les facteurs qui influencent l'épissage alternatif de ses ARNm et la synthèse de ses deux isoformes protéiques, et d'évaluer les répercussions cliniques du polymorphisme sur d'autres maladies. Il est certes possible que 677C → T ne contribue que modestement à l'émergence de certaines pathologies, mais il est également possible qu'en étudiant l'interaction du polymorphisme avec d'autres facteurs génétiques, ainsi qu'avec des facteurs non génétiques, on puisse élucider la cause de pathologies complexes.

Nos perspectives de travail concernent également la possibilité de prévenir voir atténuer les formes de diabètes par l'utilisation des vitamines telles que la vitamine E, B6, B12, et les folates. Dans ce but il nous apparaît intéressant d'étudier les interactions de ces éléments au niveau moléculaires et leurs répercussions.

Abréviations

BET: Bromure d'éthidium
CBS: Cystathionine- β - synthase
CETP : protéine de transfert des esters de cholestérol
CL : cholestérol libre
EC : esters de cholestérol
DNID : diabète non insulino dépendant
DT2 : Diabète type 2
DTT: dithiothréitol
EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid
GOD: glucose oxydase
GLUT2 : glucose transporteur 2
H2O2: peroxide hydrogène
Hb: hémoglobine
HbA1c : hémoglobine glyquée A1c.
Hcy: Homocystéine
HDL: high density lipoprotein
HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale
HPLC: High performance liquid chromatography
IDL : intermediate density lipoprotein
IG : intolérance au glyose
IL6 : Interleukine 6
IMC : indice de masse corporelle
IRS: insulin receptor specific
LCAT: lécithine:cholestérol acyltransférase
LDL: low density lipoprotein
Lp : lipoprotéine.
MODY2: Maturity Onset Diabetes of the young
MS: méthionine synthase
NO: nitric oxyde
PI-3 Kinase: phosphatidyl-inositol-3 Kinase
PKC: protéine Kinase C
POD: peroxydase
RFLP: restriction fragments long polymorphism
R-LDL : récepteur des LDL
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SAH: S-adenosyl-L-homocystéine
SAM: S-adenosyl-L-méthionine.
SR-A: scavenger receptor, class A
SR-B1: scavenger receptor, class B1;
TG: triglycéride
TNF: Tumor Necrosing Factor
TS: thymidylate synthase
VLDL: very low density lipoprotein

- 1- **Philippe. Froguel.** *Les gènes du diabète*, (1999)
- 2- **Abadi. N et al.** *Diabètes & Métabolism*, (2003)
- 3- **Poulsen,** *Diabetologia* (1999)
- 4- **Brüning.** *Cell* (1997).
- 5- **Terauchi.** *J Clin Invest* (1997).
- 6- *Nephrol Dial Transplant* (2003);
- 7- *Molecular and cellular Endocrinology* 229, (2005).
- 8- **Pierre jean GUILLAUSSEAU et al.** *Vivre & comprendre le diabète de type 2*, (2003) : 9-13.
- 9-**Khiati M.** *le Diabète de l'enfant.* Office des publications universitaires. Alger (1986.)
- 10- **André Grimaldi et al.** *Traité de Diabétologie.* (Ed) Flammarion. (2005): 1-522.
- 11- **KING H., AUBERT RE., HERMAN WH.** Global burden of diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, (1998); 21:1414-1431.
- 12- **KING H, REWERS M AND THE WHO ad hoc diabetes reporting Group.** Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. *Diabetes care*, (1993); 16: 157-177.
- 13- **Rouabhia S. et al.** Une prévalence du diabète type 2 dans la région de Batna par une méthode simple. *Diabetes Metabolism*, (March 2006) ; 32, 1S 66-1S 67.
- 14- **ERIKSON J. et al.** Early metabolic defects in persons at risk of developing diabetes mellitus. *N Engl J med*, (1989); 321: 337-343.
- 15- **VAAG A., HENRIKSEN JE., BECK-NIELSEN H.** Decreased insulin activation of glycogen synthase in skeletal muscles in young nonobese Caucasian first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, (1992); 89: 782-788.
- 16- **DE FRONZO RA., FERRANNINI E., SIMONSEN DC.** Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism*, (1989); 38: 387-395.
- 17-**Jacques DELATTRE., Geneviève DURAND., Jean-Claude JARDILLIER.** *Biochimie pathologique*, (2003): 186-199.

- 18- KAHN SE. et al.** Proinsulin as a marker for the development of NIDDM in Japanese-American men. *Diabetes*, (1995); *44*: 173 -179.
- 19- KAHN SE., HALBAN PA.** Release of incompletely processed pro-insulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes*, (1997); *46*: 1725-1732.
- 20- RODER ME. et al.** Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired β cell secretory capacity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, (1998); *83*: 604-608.
- 21- Evry Nathalie Vionnet**, Inserm U. 525, *CHU Pitié-Salpêtrière- Paris- centre national du génotypage (CNG), Développement*, (2004).
- 22- UKPDS GROUP.** OVERVIEW of 6 years' therapy of type 2 diabetes: a progressive disease (UKPDS 16). *Diabetes*, (1995); *44*: 1249-1258.
- 23- ASHCROFT FM., GRIBBLE FM.** ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia*, (1999); *42*: 903-919.
- 24- UNGER RH., ZHOU YT.** Lipotoxicity of beta-cells in obesity and other cause of fatty acid spillover. *Diabetes*, (2000); *50*: S118-S121.
- 25- MAEDLER K. et al.** Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes*, (2001); *50*: 69-76.
- 26- LUPI R. et al.** Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets. *Diabetes*, (2002); *51*: 1437-1442.
- 27- DE FRONZO RA.,** Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev*, (1997); *5*:177-269.
- 28- ZIERATH JR., KROOK A., WALLBERG-HENRIKSSON H.** Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia*, (2000); *43*: 821-835
- 29- LILLIOJA S. et al.** Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus: prospective studies of Pima Indian. *N Engl J Med*, (1993); *329*: 1988-1992.
- 30- RYDER JW. et al.** Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin and hypoxiastimulated cell surface GLUT 4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, (2000); *49*: 647-654.
- 31- ZIERATH JR. et al.** Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NDDM. *Diabetologia*, (1996); *39*: 1180-1189
- 32- DAMSBO P. et al.** Reduced glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese patients with and without type 2(non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, (1991); *34*: 239-245.

- 33- KROOK A. et al.** Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, (2000); *49*: 284-292.
- 34- STORGAAD H. et al.** Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant relatives with type 2 diabetes. *Diabetes*, (2001); *50*: 2770-2778.
- 35- MAJER M. et al.** Association of the glycogen synthase locus on 19q13 with NIDDM in Pima Indians. *Diabetologia*, (1996); *39*: 314-321.
- 36-SHIMOMURA H. et al.** A missense mutation of the muscle glycogen synthase gene (M416V) is associated with insulin resistance in the Japanese population. *Diabetologia*, (1997); *40*: 947-952.
- 37- WHORWOOD C. et al.** Increased glucocorticoid receptor expression in human skeletal muscle cells may contribute to the pathogenesis of the metabolic syndrome. (*Diabetes*, 2002); *51*: 1066-1075.
- 38- BLAAK EE. et al.** Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type2 diabetic muscle, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, (2000); *279*: E146-E154.
- 39- KELLEY DE., GOODPASTER BH.** Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes care*, (2001); *24*: 933-941.
- 40- LEVIN K. et al.** Morphometric documentation of abnormal intramyocellular fat storage and reduced glycogen in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, (2001); *44*: 824-833.
- 41- SEIP RL., SEMENKOVICH CF.** Skeletal muscle lipoprotein lipase: molecular regulation and physiological effects in relation to exercise. *Exerc Sport Sci Rev*, (1998); *26*: 191-218.
- 42- FERREIRA L. et al.** Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance. *Diabetes*, (2001); *50*: 1064-1068.
- 43- MANCO M. et al.** Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. *Metabolism*, (2000); *49*: 220-224
- 44- BLAAK EE., WAGENMAERS A.** The fate of (U-13C) palmitate extracted by skeletal muscle in subjects with type 2 diabetes and control subjects. *Diabetes and control subjects*. *Diabetes*, (2002); *51*: 784-789.
- 45- GOODPASTER BH., KATSIARAS A., KELLEY DE.** Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity. *Diabetes*, (2003); *52*: 2191-2197.
- 46- CLERK L., RATTIGAN S., CLARK M.** Lipid infusion impairs physiologic insulin-mediated capillary recruitment and muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes*, (2002); *51*: 1138-1145.

- 47- MINOKOSHI Y. et al.** Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, (2002); *415*: 268-269.
- 48- ORAL EA. et al.** Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med*, (2002); *346*: 570-578.
- 49- Yazigi A., Andreelli F.,** l'adiponectine, *Médecine des maladies Métaboliques* (Mars 2007)-vol. 1-№1 : 51.
- 50- Bouatia-Naji N et al,** les variants génétiques du gène de l'adiponectine (ACDC) sont associés avec l'obésité infantile et l'obésité morbide de l'adulte, *Diabetes Metabolism*, (March 2006) :1S9.
- 51- Moldes-Garnaud M et al.** L'expression du gène de l'adiponectine est contrôlée par l'insuline et le glucose dans le tissu adipeux ; *Diabetes Metabolism* (2006), *32*, 1S35.
- 52- Steppan C.M., et al. 2001.** The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* *409*: 307-312.
- 53- Nathalie Zengaffinen et Françoise Assimacopoulos-Jeannet.** Les modifications de l'expression et de la sécrétion d'adiponectine et de la résistine peuvent-elles contribuer à la résistance à l'insuline induite par les stéroïdes? *U 465 INSERM, Paris, France, 2003.*
- 54- FERNANDEZ-REAL JM., RICART W.** Insulin resistance and inflammation in evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia*, (1999); *42*: 1367-1374.
- 55- VOZARONA B. et al.** High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2000; *51*:455-451.
- 56- FESTA A. et al.** Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type2 diabetes. The insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* (2002); *51*: 1131-1137.
- 57- BARZILAY J. et al.** The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly. The cardiovascular health study. *Diabetes*, (2001); *50*: 2384-2389.
- 58- TERUEL T., HERNANDEZ R., LORENZO M.** Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes by maintaining akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes*, (2001); *50*: 2563-2571.
- 59- RODEN M. et al.** Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes*, (1999); *48*: 358-364.
- 60- KINGWELL B. et al.** Nitric oxide synthase inhibition reduces glucose uptake during exercise in individuals with type2 diabetes more than in control subjects. *Diabetes*, (2002); *51*: 2572-2580.

- 61- SJOSTRAND M., HOLMANG A., LONNROTH P.** Measurement of interstitial insulin in human muscle. *Am J physiol*, (1999); *276*: E151-E154.
- 62- YOUND J., RATTIGAN S., CLARK M.** Acute impairment of insulin-mediated capillary recruitment and glucose uptake in rat skeletal muscle in vivo by TNF- α . *Diabetes*, (2000); *49*: 1904-1909.
- 63- LINDSAY JR. et al.** Demonstration of increased concentration of circulating glycosylated insulin in human type2 diabetes using a novel and specific radioimmunoassay. *Diabetologia*, (2003); *46*: 475-478.
- 64- MITTELMAN S., BERGMAN RN.** Liver glucose production in health and diabetes, *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, (1998); *5*: 126-135.
- 65- MULLER C. et al.** Endogenous glucose production, gluconeogenesis and liver glycogen concentration in obese non-diabetic patients. *Diabetologia*, (1997); *40*: 463-468.
- 66-BECK-NIELSEN H. et al.** Pathogenesis of type2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the role of skeletal muscle glucose uptake and hepatic glucose production in the development of hyperglycemia. A critical comment. *Diabetologia*, (1994); *37*: 217-221.
- 67- RADZIUK J., PYE S.** Production and metabolic clearance of glucose under basal conditions in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, (2001); *41*: 983-991.
- 68- STAEHR P. et al.** Assessment of hepatic insulin action in obese type2 diabetic patients. *Diabetes*, (2001); *50*: 1363-1370.
- 69- PIGON J. et al.** Normal hepatic insulin sensitivity in lean, mild non insulin-dependent diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, (1996); *81*: 3702-3708.
- 70- OSEI K.** Increased basal glucose production and utilization in non diabetic first-degree relatives of patients with NIDDM. *Diabetes*, (1990); *39*: 597-601.
- 71- BASU A. et al.** Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding. Additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes*, (2001); *50*: 1351-1362.)
- 72- LUDVIK B. et al.** A non invasive method to measure splanchnic glucose uptake after oral glucose administration. *J Clin Invest*, (1995); *95*: 2232-2238.
- 73- CARO JF. et al.** Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes. *Horm Metab Res*, (1995); *27*: 19-22.
- 74- BROUSOLE C. et al.** Effects of different lipid substrates on glucose metabolism in normal postabsorptive human. *Metabolism*, (1992); *41*: 1276-1283.
- 75- STINGL H. et al.** Lipid-dependent control of hepatic glycogen stores in healthy humans. *Diabetologia*, (2001); *44*: 48-54.

- 76- CROSET M. et al.** Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes*, (2001); *50*: 740-746.
- 77- RIGALLEAU V. et al.** In normal men, free fatty acids reduce peripheral, but not splanchnic glucose uptake. *Diabetes*, (2001); *50*: 727-732.
- 78- LEWIS GF. et al.** Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in human. *Diabetes*, (1997); *46*: 1111-1119.
- 79- STUMVOLL M. et al.** Renal glucose production and utilization: new aspects in humans. *Diabetologia*, (1997); *40*: 749-757.
- 80- Benlatrèche Moufida.,** Étude des variations lipidiques chez les diabétiques, mémoire des études supérieures en Biologie moléculaire et cellulaire (D.E.S), Option : Biochimie (2000), Université Mentouri Constantine, Algérie.
- 81- SIMON. D., TCHOBROUTSKY. G et ESCHWEGE E.,** 2-1986 Epidémiologie du diabète sucré, *Encycl. Méd. Chir (Paris, France), Endocrinologie-Nutrition*, tome (3), 10-366-B-10, PP 4-6
- 82- TOURNIAIRE. J.,** *Endocrinologie, diabète nutrition pour le praticien*, ed : SIMEP, (1994) : 323-341.
- 83- AMRANE Mounira.,** l'homocystéine chez les diabétiques de type 2 avec rétinopathie, thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Médicales, (2008), Université Mentouri Constantine, Algérie.
- 84- HENRICSSON M. et al.** The incidence of retinopathy 10 years after diagnosis in young adult people with diabetes: results from the nationwide population-based Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetes Care*, (2003); *26*: 349-354.)
- 85- Microvascular and acute complications in IDDM patients: the EURODIAB IDDM complications Study.** *Diabetologia*, (1994); *37*:278-285.
- 86- US National library of Medicine, National Institutes of health, MTHFR,** (28 October 2005).
- 87- Frosst P., Blom HJ., Milos R., et al.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; *10*: 111-3.
- 88- Tran P., Leclerc D., Chan M., et al.** Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome* 2002 ; *13* : 483-92.
- 89- Medina M. A. et al.** Roles of homocysteine in cell metabolism Old and new functions (FEBS 2001) (*Eur. J. Biochem.* 268)

- 90- Ueland PM., Rozen R (eds).** *MTHFR polymorphisms and disease*. Georgetown: Landes Bioscience/Eurekah.com, 2005: 210 p.
- 91- Monika GOS, Agnieszka SZPECHT-POTOCKA.,** Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism; *J. Appl. Genet.* 43(4), 2002, pp. 511-524.
- 92-Morel CF., Scott P., Christensen E., et al.** Prenatal diagnosis for severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency by linkage analysis and enzymatic assay. *Mol Genet Metab* 2005 ; 85 : 115-20.
- 93- Selzer RR., Rosenblatt DS., Laxova R., Hogan K.** Adverse effect of nitrous oxide in a child with 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *N Engl J Med* 2003; 349: 45-50.)
- 94- Médecine/Science Mars 2007 Volume 23 n° 3.**
- 95- Rasmussen K., Moller J., Lyngbak M.** Within-person-variation of plasma homocysteine and effects of posture and tourniquet application. *Clin Chem* 1999 ; 45 :1850-5.
- 96- Ducros V. et al.** Dosage de l'homocystéine plasmatique : étude des facteurs de variation préanalytiques sur la concentration en homocystéine plasmatique totale, *Ann Biol Clin* 2001, 59 :33-9.
- 97- KAPLAN A et al.** Glucose. *Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984 ; 1032-1036.
- 98- TRINDER P .**Ann. Clin Biochem 1996 ; 6 :24-33.
- 99-LL, and al.** Apolipoprotein E: laboratory determination and clinical significance. In *Laboratory measurement of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins*. N Rifai and GR Warnick, eds. Washington AACC press, (1994) 279-304.
- 100- Diop S et al.** Evaluation du risque thrombotique dans le diabète de type2, *Dakar Médical* (2002), 47 ,2 ; 247-251.).
- 101- Ducros V. et al.** Comparaison du dosage de l'homocystéine plasmatique totale dans neuf laboratoires par six techniques différentes ; *Ann Biol Clin* 2002 vols 60 : 412-418.
- 102-National Committee for Clinical laboratory Standarts.** Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices-Second Edition; Tentative Guideline. NCCLS Document EP5-T2. Villanova, PA: NCCLS, March 1992.
- 103- Raynaud E et al.** La microalbuminurie, marqueur précoce d'atteinte rénale, est elle aussi un facteur de risque cardiovasculaire ? *Ann Biol Clin* (1998) ; 56 : 671-9.

- 104- Mongensen CE et al.** Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet* (1995); 346: 1080-4.
- 105- Jensen JS et al.** Detecting microalbuminuria by urinary albumin/creatinine concentration ration. *Nephrol Dial Transplant* 1997 ; 12 : 6-9.
- 106- American Diabetes Association.** Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1997: 20:S24-7.
- 107- NATHALIE MARIO., ELISABETH LASNIER.** Revue Francophone des laboratoires, mai 2006, N° 382.
- 108-VALDIGUIE. P.** Biochimie clinique. Médicales internationales. 2^{ème} édition (1995). Paris.
- 109- DELPECH M.** les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Ann Biol Clin.* (1997) 57 :77-84.
- 110- RUMEAU-ROUQUETTE C., BLONDEL B., KAMINSKI M.** Epidémiologie : Méthode et pratique.
- 111- FRANOIS D., DRUCKER J., MOREN A.** Epidémiologie d'intervention. Editions Arnette (1992) :589.
- 112- Serge HALIMI,** le diabète de type 2 ou DNID (Avril 2005) <http://www-sante.uif-grenoble.fr/sante/>).
- 113- Delahantly L M et al.** For the DPP Reseach Group, Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin, *N Engl J Med* 2002 ;346 :393-403.
- 114- KOHNER E. et al.** United Kingdom Prospective Diabetes Study, 30. Diabetic retinopathy at diagnosis of non-insulin dependent diabetes mellitus and associated risk factors. *Arch Ophthalmol*, 1998; 116: 297-303.
- 115- Monnier L et al.** An overview of the rationale for pharmacological strategies in type 2 diabetes: from the evidence to new perspectives; *Diabetes Metabolism* (2005), 31, 101-109.).
- 116- Bonneau C.** Valeur séméiologique de paramètres biochimiques urinaires, *Ann Bio Clin*, vol. 59, N°1, janvier-février2001, 13-25
- 117- Gerstein HC et al.** Albuminuria and risk of coronary events, deaths and heart failure in diabetics and non diabetics individuals. *JAMA*, 2001; 286:421-426.
- 118- UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM (USRDS).** 1999 Annual Data Report. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and

Kidney Diseases, Division of Kidney, Urologic, and Hematologic Diseases. Bethesda, MD NIH Publication, (1999).

119- VAN DUK P., JAGER KJ., DE CHARRO F et al. ERA-EDTA REGISTRY: Renal replacement therapy in Europe: the results of a collaborative effort by the ERA-EDTA registry and six national or regional registries. *Nephrol Dial Transplant*, 2001; *16*:1120-1129.

120- Nathalie Mario, Elisabeth Lasnier. LES DIFFICULTÉS D'INTERPRÉTATION DU DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE A1C, *Revue francophone des laboratoires*, mai 2006, N° 382, 1-5.

121- Rev Prescrire, Diabète de type 2 : surmortalité quand l'HbA1c est trop basse (2008) ; 28 (294) : 285-286.

122- Jiazhong Sun. et al. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase as risk factor for diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients ; *Diabetes Research and Clinical Practice* 64 (2004) 185–190.

123- Rebecca L. Pollex et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes, *Cardiovascular Diabetology* (2005), 4:17.

124- Fong DS et al. Diabetic retinopathy (Position Statement). *Diabetes care* (2003) 26 : 226-229.

125- MAKIKO M et al. Diabetic Retinopathy possibly Results From Poor Blood Sugar Control Associated with MTHFR Gene Polymorphism in Type 2 Diabetic Patients. (2003) *Diabetes Care*, Volume 26, 1948

126- Vijan S et al. Cost-utility analysis of screening intervals for diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 2000; *283*: 889-895.

127-DAVID Cole et al. L'homocystéine et les maladies cardiovasculaires, Santé Canada, (juin 2000).

128- Nygard O et al. Coffee consumption and plasma total homocysteine: the Hordaland Homocysteine study. (1997) *Am J Clin Nutr* 65: 136-143

129- Stein Emil Vollset et al. Coffee and homocysteine; *Am J Clin Nutr* 2000; *71*:403–4

130- Bergmark C et al. Redox status of plasma homocysteine and related aminothiols in smoking and nonsmoking young adults. (1997); *Clin Chem* 43: 147-157.

131- OUDI M., AOUNI Z., MAZIGH C. et al. Homocystéinémie et polymorphisme C677T du gène de la MTHFR chez les diabétiques de type 2, *Feuillets de biologie* ISSN 0428-2779, 2006, vol. 47, n°271, pp. 37-41.

- 132- Benmerabet S., Candito M., Staccini P., Sadoul J-L.,** L'homocystéine chez le DNID : déterminants et corrélations avec les complications micro/macroangiopathiques, *Annales de biologie clinique*, volume 58 Number 2, (mars-avril2000) : 212-26.
- 133- de BREE A et al.** Lifestyle factors and plasma homocystéine concentrations in a general population sample. *Am J Epidemiol* 154:150-154.
- 134- Rudy A et al.** Homocysteine concentrations and vascular complications in patients with type2 diabetes ; *Diabetes Metabolism* (2005), 31, 112-117).
- 135- Hoogeveen EK et al.** Hyperhomocysteinemia is associated with the presence of retinopathy in type 2 diabetes mellitus: The Hoorn study. *Arch Inter Med*, (2000).160: 2984-2990.
- 136- Ellen K et al.** Hyperhomocysteinemia Is Associated With the Presence of Retinopathy in Type2 Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med.* 2000 ; 160 : 2984-2990.
- 137- Graham IM et al.** Plasma homocystéine as a risk factor for vascular disease. The European concerted Action projet. *JAMA*, (1997), 277: 1775-81.
- 138- Cahill M et al.** Thermolabile MTHFR genotype and retinal vascular occlusive disease *Br. J. Ophthalmol.* 2001; 85; 88-90.
- 139- Smulders YM et al.** Fasting and post methionine homocystéine levels in NIDDM. Determinants and correlations with retinopathy, albuminuria and cardiovascular disease. *Diabetes care*, 1999, 22 : 125-132.
- 140- Erh-Jung Huang et al.** Association de l'hyperhomocystéinémie à la rétinopathie diabétique en fonction de la durée de la maladie. [Article in Press], 2005.
- 141- GHANNEM H. et al.** Facteurs de risque des maladies cardiovasculaire dans une communauté semi urbaine du sahel Tunisien, *Rév. Epidém. et Santé Publ.* (1992) 40 :108-12.
- 142- GHARBI M., et al.** Niveau des facteurs de risque cardiovasculaire dans la population urbaine et rurale du Cap-Bon : Tunisie, *Rév. Epidém. et Santé Publ.* (1996) 44 :125-132.
- 143- Les lipides.** (2003) Nutrisite, « diététique sport & vie ».
- 144- BENFANTE R., REED D.,** Is elevated serum cholesterol levels a risk factor for coronary heart disease in the elderly? *JAMA* (1990) 19 : 393-396.
- 145-VERGÈS B.** Physiopathologie des dyslipidémies des diabétiques. *In : Dyslipidémies du diabétique.* Paris, John Libbey Eurotext ed, 2002 :17-39.
- 146- VERGÈS B., BRUN JM., VAILLANT G et al.** Influence of obesity and hypertriglyceridemia on low HDL₂-cholestérol level and its relationship with prevalence of atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, 1992; 18:289-297.

147- DUVILLARD L., PONT F., FLORENTIN E et al. Inefficiency of insulin therapy to correct apolipoprotein A-I metabolic abnormalities in non insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 2000; *152*: 229-237.

148- ABDERAHMANI A et al. Les particules de LDL-cholestérol oxydés entraînent une perte de l'expression de l'insuline en induisant la signalisation des JNKs ; *Diabetes Metabolism* (2006), *32*, 1S9-1S38

149- DUVILLARD L., PONT F., FLORENTIN E et al. Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur J Clin Invest*, (2000); *30*: 685-694.

150- DUVILLARD L., FLORENTIN E., LIZARD G et al. Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. *Diabetes Care*, (2003); *26*: 1540-1544.

151- WADE DP., KNIGHT BL., SOUTAR AK. Regulation of low-density-lipoprotein-receptor mRNA by insulin in human hepatoma Hep G2 cells. *Eur J Biochem*, 1989; *181*: 727-731.

152- Algava J et al. Modifications qualitatives des LDL au décours de la mise à l'insuline du patient diabétique de type 2, *Diabetes Metabolism* (2006), *32*, 1S73.

153- Lorenzo D., Botto, Quanhe Yang. National Office of Public Health Genomics, HuGENet™, November 2, 2007.

154- KEIJI YOSHIOKA et al. No Association Between the MTHFR Gene Polymorphism and Diabetic Retinopathy in type2 Diabetic Patients Without Overt Nephropathy. (2003) *Diabetes Care*, Volume 26, 1947.

155- Maeda M et al. MTHFR gene polymorphism as a risk for diabetic retinopathy in type2 diabetic patients without serum creatinine elevation. (letter). *Diabetes care* *26* : 547-548, 2003

156- Loewenstein A et al. Retinal vein occlusion associated with methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Ophthalmology* 1999 ; *106* : 1817-20.

157- SUN Jiazhong et al. The relationship between MTHFR gene polymorphisms, plasma homocysteine levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus, *Chinese Medical Journal*, (2003), Vol.116 № 1: 145-147.

Annexe 1 : Le questionnaire:

Etude DNIDMTHFR

Date :

Nom : Prénom..... Sexe : N°

Age : Poids : Taille : Tour de taille :

Situation familiale Marié (e) : Célibataire : Autre :

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

Fonction :

Origine ethnique : A C K M
Autres :

Fumeur : Oui Non Nbre/J : Café : Nbre/J :
Chique : Alcool :

Tension artérielle : Oui Non Systolique : Diastolique :

Contraceptifs : Oui Non Types de contraceptifs :

Age de diabète :
Pathologies associées :

Antécédents Personnels	Antécédents Familiaux

Diagnostic :

Examens complémentaires :

Traitements :

Chol : ...TG : ...HbA1c : μ Alb : ... Hcy : ...Glycémie : ...Autre :

Annexe 2:

-Les valeurs normales du bilan lipidique

Cholestérol	1.50-2.10 g/l
Triglycérides	0.70-1.50 g/l
C-HDL	> 0.38 g/l
C-LDL	< 1.30 g/l

-les valeurs normales de l'Homocysteine: 5 – 15 µmol/L.

-les valeurs normales de la glycémie : 0,75-0,85 g/l

-les valeurs normales de la microalbuminurie : normoalbuminurie < 30µg/mg de Créatinine.

-valeurs normales de l'HbA1c : <6%

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

1- Préparation des leucocytes

- Dans un tube Falcon de 50 ml ; mettre le sang total (7-10 ml) et compléter à 45ml avec du TE 20 :5. Laisser 10 min dans la glace.

- Centrifuger 15 min à 3900 g (3900 rpm).

- Déverser le surnageant prudemment afin de garder le culot leucocytaire précipité au fond de tube.

- Rajouter le TE 20:5 au culot jusqu'à 25-30 ml, agiter pour le remettre en suspension et laisser 10 min dans la glace.

- Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.

- Déverser le surnageant : obtention d'un culot de leucocytes.

(Si on s'arrête à ce niveau, les mettre dans un tube nunc de 15 ml avec du TE 10 :1 et les conserver à -20°C dans un congélateur).

2- Extraction de l'ADN

- Décongeler les leucocytes.

- Centrifuger pendant 15 min à 3900 rpm

- dilacérer le culot de leucocytes soigneusement afin de les prendre complètement et les mettre dans un tube Falcon conique de 15 ml.

- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (Na Cl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2)

- Ajouter 200 µL de SDS à 10% (100 g SDS + 1000 ml H₂O)

- Ajouter 100 µL de protéinase K (PK) à 10 mg / ml.

- dans l'étuve, Agiter le tube sur une roue rotative à 37°C pendant une nuit.

- Le lendemain ; refroidir dans la glace.

- Ajouter 1 ml de Na Cl 4 M et agiter rigoureusement à la main.
- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
- Centrifuger 15 min à 2500 rpm.
- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu (100%) préalablement refroidi et agiter en tournant le tube plusieurs fois : **la formation de la méduse** visible à l'œil nu. (Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote d'ADN ne se forme pas).
- Récupérer la pelote d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube nunc (ependorf) stérile.

3-Solubilisation de l'ADN :

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

Annexe 3

Tableau 18: Préparation du milieu réactionnel du PCR pour MTHFR

PCR	MIX	X Nombre D'ADN	quantité
H2O	35,2µl		
Tampon 10 X sans mg cl2	5µl		
Dntp 2mM	5µl		
MgCl2 25 mM (1,5 mM)	3µl		
Oligo F (100 pmol/ µl)	0,2µl		
Oligo R (100pmol/µl)	0 ,2µl		
Taq polymérase	0,4µl		

Dans l'épendorft : 2µl ADN + 49 µl Mix ; puis dans le thermocycleur et appliquer le programme de l'MTHFR.

- Oligo nucléotides utilisés :

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

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

- Dilutions des solutions mères utilisées

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

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

- Oligo R solution mère 333µl

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

- dNTP solution mère

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

- MgCl₂ solution mère

50µl MgCl₂ + 50µl H₂O distillé

Tableau 19: Déroulement des cycles de la PCR dans le thermocycleur (ref :

TECHNE GENIUS)

Nombre de cycles	Étape	Température (°C)	Durée
X 1	Dénaturation	94	5 min
X 30	Dénaturation	94	30s
	Hybridation	65	30s
	Elongation	72	40s
		72	10 min
		4	5min-24 h

Annexe 4

Tableau 20: préparation du milieu de digestion par l'enzyme Hinf I

Milieu de digestion	Quantité en ml
Tampon de Hinf I	5
Hinf I	1
H2O	4
BSA (Bovine sérum albumine)	0,2

X (nombre de produit de PCR)

30 ml produit PCR +10 ml de Mix

- le BSA est un activateur.

Tableau 21 : Préparation d'un gel d'agarose

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

Dépôts des échantillons :

- 15 µl de produits de digestion + 2 à 3 µl de Bleu de bromophénol
- 3 µl de marqueur (PM 20pb LADDER ref.018206) + 2 à 3 µl de Bleu Bromophénol.

Tableau 22 : Préparation de Bleu de Bromophénol (BBP) : BBP 20mg

[(Tris 0.5M: 2ml + Glycérol: 5ml) PH 7.5] Qsp 10 ml H₂O

Tableau 23 : Préparation de TBE 10X: Tris 108g

- Acide borique 55g
- Ajuster le PH à 8.3 avec l'acide acétique glacial
- EDTA 9.3g
- QSP 1L H₂O

Annexe 5 : Position de la mutation C677T dans le gène MTHFR

```
aattcoggagccatggtgaacgaagccagagjjaaacagc  
tgagagetecaaagatagttcagagatgttccaccccggg  
ggcGgcGattggaatctggtgacaagtggttctctctgg  
atctcaaGctttgaccggatgGcagcaggtggccccctc  
agacaaggagacctctccatgatgatcgccagcaccGc  
gotgocgtcagcgcctggaggagatcacgggoccatctgc  
cGgggagaccraataggtgaccagtgggaagaggaggag  
aagtgagtttggtgactactttgacatctgtgtggaag  
acctgaagcacttgaaggagaaggtgtctgcccgggGc  
ttccgctttgtgaaggcatgcaccgacatgggcatact  
ctcccttcggcagctttgtgaagctgtccaagctggaggt  
acgatgctgccatccgcaactatggcctcagagctggccg  
ggcctccacttetacaccTcaAcCjcgagatggctacc  
cagggctccctaccctgggctctcagTgcccaccccac  
gaccaaagagttaCattctacCgtaccacaggagtgaggacg  
tttggggagctgaaggactactacctcttetacctgaag  
ggagctgaccagtgaaGaaagtgtctttgaaagtcttTgt  
tgaacttgcctgccttggaaacgatgagccctggcggtg  
cagggcctctcaccatcaactcacagcccaacatcaac  
cgggggctatgtcttcagaaggcctacttagagtttt  
agaagtaagagctccgggttaattaccaccttgtcaatg  
aatgctgtcaacttggggcatcttccctgggCjagagatc  
gAaggacGaggcctttgcctctgtggattgagcgggtggg  
agtacatccacgacaactacttcttggccaacctggtgg  
gaagacacattggagcttctcaacaggcccacccagaat  
ctgcgttggagccactctgtccrgccttctctctccac  
tcccaccccggcctccactcccccaectgacaatggcag  
tcggccccacatgggaacctagtactctctgctcta
```



C677T