

RECHERCHE PRELIMINAIRE DE MARQUEURS DU DIABETE DANS LA SALIVE HUMAINE

Reçu le 21/04/2011 – Accepté le 16/08/2013

I. BELLIL, D. KHELIFI

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1.

Résumé

Le diabète est devenu un vrai problème de santé publique. Il est bien connu pour son influence sur le flux salivaire ou encore sur la composition protéique de la salive. Afin de détecter un biomarqueur salivaire de cette pathologie, nous avons comparé les profils obtenus par électrophorèse mono et bidimensionnelle des protéines salivaires de sujet sain et de patients diabétiques présentant une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l. L'analyse des gels a permis de dénombrer 6 spots pour le sujet sain et 12 pour le diabétique. Cette étude nous a permis de mettre en évidence des spots d'intérêts. Parmi ces spots, 6 sont spécifiques au diabétique et 6 spots communs aux deux conditions sont surexprimés chez le patient diabétique.

Mots clé : salive, diabète, biomarqueur, électrophorèse bidimensionnelle

Abstract

The diabetes became a true problem of public health. It is well-known for its influence on salivary flow or on the protein composition of saliva. In order to detect a salivary marker of this pathology, we compared the profiles obtained by mono and two-dimensional electrophoresis of salivary proteins of healthy subject and patients diabetics presenting a glycemia with jeun higher than 1,26 g/l. Analysis of the gel allowed to count 6 spots for the healthy subject and 12 for the diabetic. This study enabled us to highlight spots of interests. Among these spots, 6 are specific to the diabetic and 6 spots common to both conditions are on-expressed at the patient diabetic.

Key words: saliva, diabetes, markers, two dimensional electrophoresis

ملخص

أصبح داء السكري مشكلة حقيقية في مجال الصحة العامة. إذ يعرف هذا المرض بتأثيره على التدفق اللعابي و التركيب البروتينية لللعاب. فمن أجل الكشف عن مؤشر حيوي لداء السكري في اللعاب, قمنا بمقارنة نتائج الرحلان الكهربائي أحادي و ثنائي البعد للبروتينات اللعابية لشخص سليم و لأشخاص مصابين بالمرض مع نسبة الجلوكوز في الدم 1,26 غ/ل خلال الصيام. فأبرزت نتائج الرحلان الكهربائي ثنائي البعد وجود 6 بقع بروتينية عند الشخص السليم و 12 بقعة عند الشخص المريض. سمحت لنا هذه الدراسة بتسليط الضوء علي البقع المهمة من جهة و من جهة أخرى أوضحت هذه النتائج وجود فوارق كمية في البقع البروتينية المشتركة بين الشخصين حيث أنها أكثر كمية عند الشخص المريض.

الكلمات المفتاحية: لعاب, داء السكري, مؤشر حيوي, الرحلان الكهربائي ثنائي البعد.

Le diabète touche actuellement plus de trente millions d'individus dans le monde et est devenu aujourd'hui un enjeu majeur en termes de santé publique. Au niveau de la cavité buccale, le diabète est bien connu pour ses complications infectieuses locales et pour son influence sur le flux salivaire ou encore sur la composition protéique de la salive [1, 2, 3].

Depuis de nombreuses années des chercheurs et des cliniciens ont proposé le suivi de variations hormonales salivaires comme de véritables marqueurs de certaines maladies. En effet, bien que l'on ait décrit des protéines de transport dans la salive, la concentration salivaire de certaines substances hormonales refléterait celle de la fraction hormonale libre plasmatique, considérée comme la fraction responsable de l'action biologique. C'est le cas chez la femme, dans le domaine de la gynécologie, avec le suivi des pics sériques pré ovulatoires dont les équivalents salivaires semblent apporter à la clinique un moyen de diagnostic d'une simplicité évidente [4]. Dans ce contexte, la salive peut être considérée comme un milieu privilégié de diagnostic et/ou de suivi de l'évolution de certaines maladies et de leurs complications par la recherche de marqueurs salivaires [5, 6, 7]. Ces données devraient nous permettre une approche différente de la physiopathologie des maladies endocrines, en particulier pour la maladie diabétique et ses complications [8].

Dans cette optique, nous avons initié ce travail visant à utiliser les différentes techniques d'électrophorèse pour rechercher les biomarqueurs du diabète dans la salive.

MATERIEL ET METHODES

Notre étude a porté sur une population de patients diabétiques (hommes et femmes) du service de médecine interne du CHU de Constantine. Les patients diabétiques sont de type I (n=4), âgés de 16 à 38 ans et de type II (n = 8), âgés de 51 à 81ans dont la pathologie datait de plus de 5 ans, et présentant une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l. Les patients diabétiques ayant une pathologie non régulée et ne présentant pas une bonne hygiène buccale ont été exclus de l'étude. Cette population a été comparée à un sujet sain sans pathologie connue et possédant une bonne hygiène buccale. Pour le recueil de la salive nous avons adopté la méthode décrite par Hirtz *et al.* [9].

Les protéines salivaires ont été extraites dans une solution d'extraction à base de SDS à 10% et de DTT à 1%. Ensuite le fractionnement de ces protéines a été effectué sur gel de polyacrylamide en utilisant les techniques d'électrophorèse monodimensionnelle (Acid-PAGE, PAGE 8,8 et SDS-PAGE) et bidimensionnelle (PAGE 8,8/SDS-PAGE).

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation .Afin

de déterminer le poids moléculaire de chaque protéine, un marqueur de taille a été utilisé.

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre première préoccupation a été de mettre au point une méthode d'extraction efficace et reproductible de toutes les protéines de la salive. Pour cela, plusieurs extractions (Tableau 1) et différentes techniques d'électrophorèse monodimensionnelles ont été testées.

Tableau 1 : Les différentes méthodes d'extraction testées.

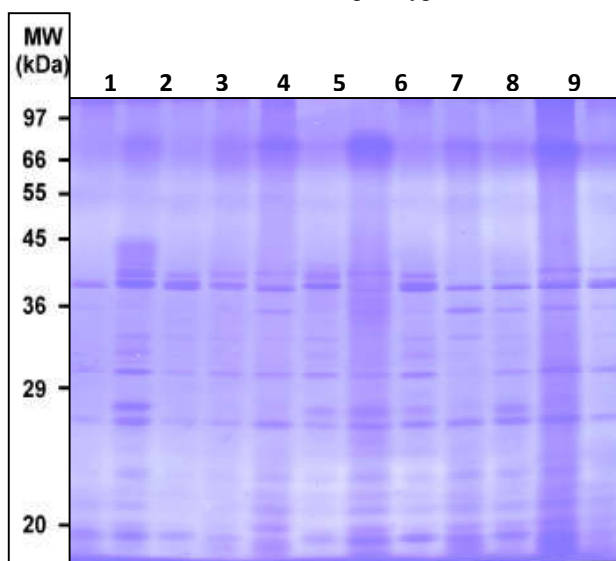
Extractions	Protocoles
1	1- précipitation : 90% acétone, 10 % TCA 6,1 N et 0.07% mercaptoethanol, 2-incubation : Deux heures, 3-centrifugation : 37000xg/30', 4-lavage culot : Acétone pure et 0.07% 2 mercaptoethanol, 5-séchage, 6-solubilisation : Urée 9M, 0.05% triton et 65mM DTT. Hirtz « <i>et al.</i> » [9].
2	1-extraction : 9M urée, 65mM DTT, 50% Tris HCl pH 6.8, 20% glycérol, 0.05% triton et 0.1% bleu de bromophenol , 2-mélange : 100µl (1)+100µl salive, 3-vortex, 4-incubation : 60°C/15'.
3	1- précipitation : 90% acétone et 0.07% mercaptoethanol, 2-mélange : 900µl(1)+200µl salive, 3-incubation : 60°C/12h, 4-centrifugation : 14000xg/15', 5-séchage culot, 6-solubilisation : 9M urée, 65mM DTT, 50% lactate d'Al pH 3.2, 20% glycérol, 0.05% triton et 0.1% vert de méthyle
4	1-précipitation : Evaporer à 40°C/24h, 2-solubilisation : 9M urée, 65mM DTT, 50% lactate d'Al pH 3.2, 20% glycérol, 0.05% triton et 0.1% vert de méthyle, 3-incubation : 60°C/15'.
5	1- extraction : 9M urée, 65mM DTT, 50% lactate d'Al pH 3.2, 20% glycérol, 0.05% triton et 0.1% vert de méthyle, 2-mélange : 100µl (1)+100µl salive, 3- vortex, 4-incubation : 60°C/15'.
6	1-extraction :10.96% N.Ndimethylformamide, 20% saccharose, 2-mélange : 100µl (1)+200µl salive,3-vortex.
7	1-stock : 12.5%Tris HCl pH 6.8, 24.1% eau dis, 4% SDS, 0.2%bleu de bromophenol et 20% glycérol, 2-extraction : 42.50% (1) ,1% DTT, 3-vortex, 4-incubation : 60°C/15'. Laemelli [10] et Singh <i>et al.</i> [11].

L'extraction des protéines a été faite à partir de la salive totale. Le choix du solvant d'extraction est guidé par le souci d'assurer une reproductibilité optimale de l'extraction. Dans un premier temps, nous avons précipité les protéines à l'Acétone et le 2 mercaptoéthanol (méthodes 1 et 3) et par évaporation (méthode 4) avant de les solubiliser dans la solution d'extraction. Cependant cette procédure ne nous a pas fourni des résultats satisfaisants. Il en est de même pour les méthodes d'extraction 5 et 6 où les protéines sont extraites dans un milieu acide. Par la suite nous avons jugé que les extractions 2 et 7 effectuées sur la salive directement et à pH 6.8 extraient mieux les protéines de la salive et donnent des profils protéiques clairs et reproductibles. L'influence de la température et la durée de solubilisation des protéines sur la concentration apparente des bandes protéiques ont été aussi testées. Il apparaît qu'un temps minimum de 15 minutes à 60°C avec deux agitations au vortex sont nécessaires pour obtenir des bandes aisément décelables par la coloration au Bleu de Coomassie.

Notre choix a porté sur la méthode d'extraction n° 2 suivie d'une électrophorèse PAGE 8.8 et l'extraction n° 7 décrite par Laemmli [10] et modifiée par Singh *et al.* [11] suivie d'une électrophorèse SDS-PAGE à pH 8.8 avec un T=12.52% et un C=0.97%. Ces deux procédures nous ont permis d'obtenir des profils très clairs et reproductibles.

Les diagrammes des protéines non réduites obtenus par électrophorèse SDS-PAGE sont présentés en figure 1. Nous constatons que chacun des échantillons présente un profil unique qui lui est propre et qui peut ressembler ou pas à celui d'un autre échantillon par la présence ou l'absence d'une ou plusieurs bandes. Cette bande peut être utilisée ultérieurement comme biomarqueur pour l'identification du diabète.

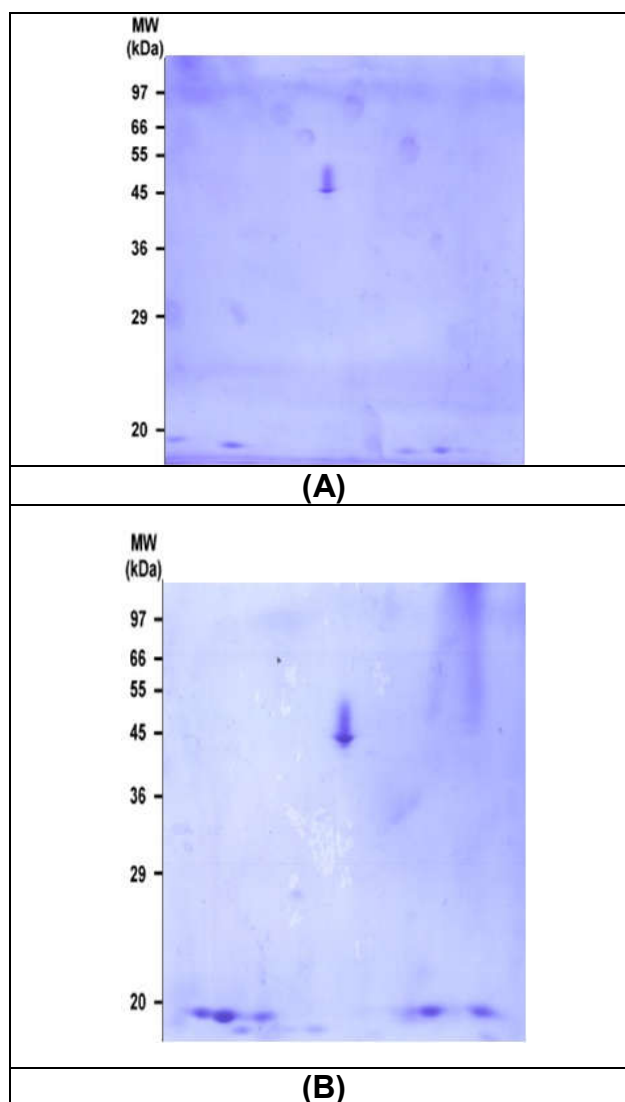
Figure 1 : Diagrammes des protéines non réduites obtenus par SDS-PAGE. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 : Diabétiques type II ; 8 : Témoin ; 9, 10,11, 12 : Diabétiques type I.



L'application de ces techniques d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants où les profils protéiques sont clairs et reproductibles mais ces méthodes ne nous ont pas permis de diagnostiquer le diabète par la détection quantitative ou qualitative d'un biomarqueur. Pour cela, nous avons jugé utile d'appliquer l'électrophorèse bidimensionnelle PAGE 8.8 / SDS-PAGE où les protéines sont séparées en deux dimensions. Elles sont tout d'abord séparées en première dimension en fonction de leur charge électrique et leur poids moléculaire puis lors de la seconde dimension la séparation se fait en fonction la masse moléculaire entre 15 et 128 kDa sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). La figure 2 représente les profils électrophorétiques du sujet sain et du patient diabétique type II.

Figure 2: Profils obtenus par électrophorèse bidimensionnelle.

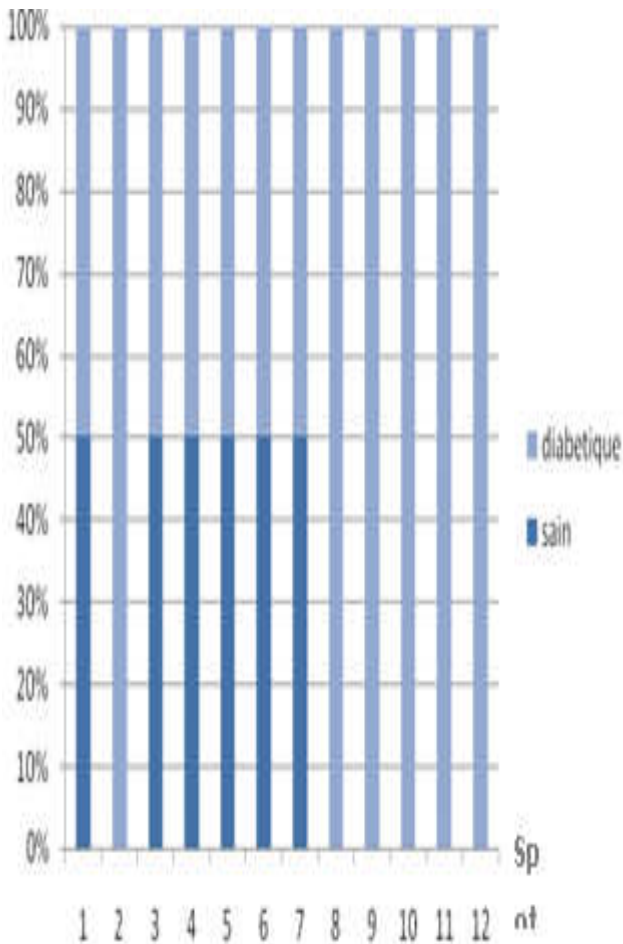
A : sujet sain, B : patient diabétique.



La protéine majoritaire retrouvée sur les gels est l'alpha amylase salivaire. Cette protéine est située aux environs de 55 kDa. De nombreux spots bien résolus sont observés en dessous de la zone correspondant à l'alpha-amylase native. L'analyse de ces gels nous a permis de mettre en évidence 6 spots pour le gel du sujet sain et 12 spots pour le gel du patient diabétique type II .

Après la détection des spots, l'analyse des gels consiste aussi à apparier les spots identiques (même masse moléculaire) entre les deux gels ayant les mêmes conditions. Ces liens entre spots permettent de déterminer des variations qualitatives (présence/absence) et/ou quantitatives (intensité des spots) des protéines entre les deux sujet (figure 3).

Figure 3 : Evaluation du nombre de spots appariés pour les deux gels.



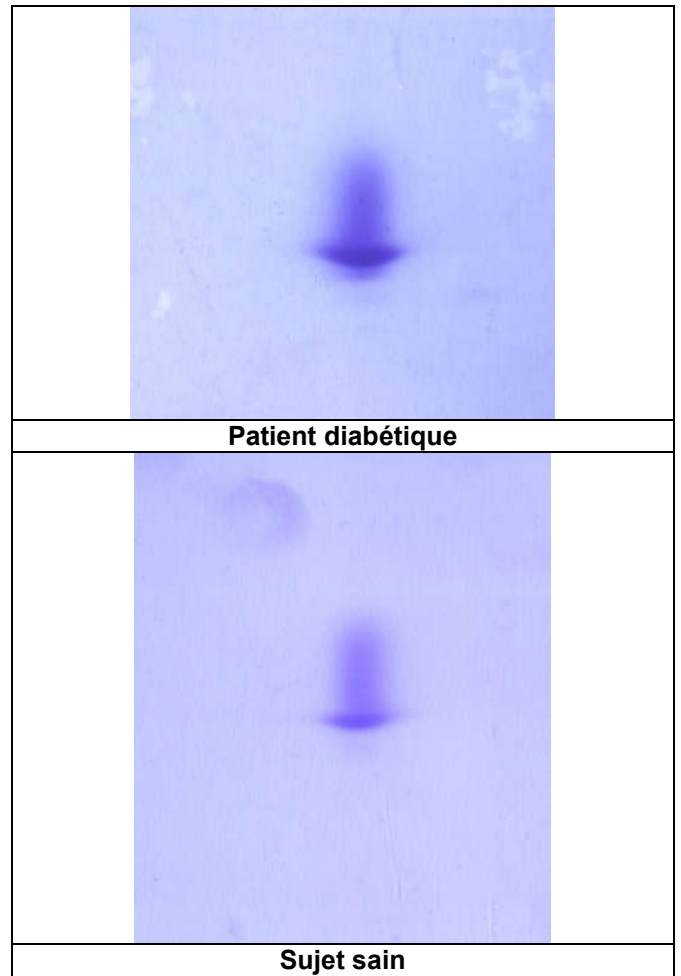
Conséquence du diabète sur le protéome salivaire

La comparaison des deux gels montre qu'environ six spots sont observés uniquement sur le gel du patient diabétique et qui sont absents sur le gel du sujet sain (figure 2). Nous constatons également que l'analyse comparative des deux conditions montre que six spots communs

présentent une variation quantitative et sont surexprimés par rapport à ceux obtenus sur le gel du sujet sain.

Deux exemples de protéines surexprimées sur le gel du patient diabétique sont présentés sur les figures 4 et 5 ; l'alpha amylase située aux environs de 55 KDa et d'autres protéines situées aux environs de 20KDa .

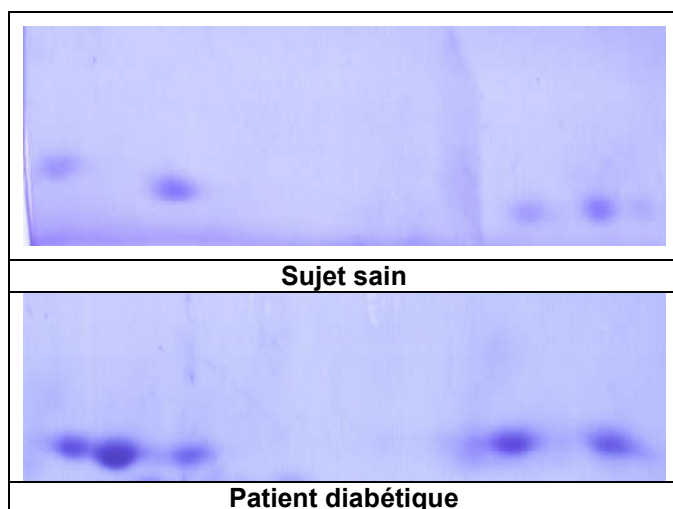
Figure 4 : La surexpression de l'alpha amylase au cours du diabète.



Ces différences d'expression sont autant de facteurs d'intérêt (biomarqueurs) pour l'analyse de l'influence du diabète sur la composition en protéines salivaires, celles ci étant susceptibles d'être spécifiquement exprimées ou inhibées au cours de cette pathologie.

Ces protéines salivaires variantes pouvant être secondairement caractérisées par spectroscopie de masse et étudiées, afin de déterminer si elles sont susceptibles d'être considérées comme des marqueurs du diabète.

Figure 5 : La surexpression des protéines salivaires dans le diabète.



CONCLUSION

Ce travail de recherche avait pour objectif d'une part d'explorer de manière aléatoire le protéome salivaire par application des techniques d'électrophorèses mono et bidimensionnelle, d'autre part de rechercher les biomarqueurs protéiques du diabète dans la salive.

L'application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais ces méthodes ne nous ont pas permis de diagnostiquer le diabète par la détection quantitative ou qualitative d'un biomarqueur

La technique PAGE 8.8 suivie par une SDS-PAGE a révélé une nette différence entre les gels du sujet sain et du patient diabétique type II. L'analyse de ces gels a permis de mettre en évidence six spots pour le gel du sujet sain et 12 spots pour le gel du patient diabétique type II.

La comparaison des deux gels a montré qu'environ six spots sont observés uniquement sur le gel du patient diabétique et qui sont absents sur le gel du sujet sain. Nous avons constaté également que les spots communs présentent une variation quantitative et sont surexprimés sur le gel du patient diabétique par rapport à ceux obtenus sur le gel du sujet sain.

Ce travail sera poursuivi par la caractérisation de ces spots par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines susceptibles d'être considérées comme des marqueurs potentiels de cette pathologie.

REFERENCES

[1]- Finestone AJ., Boorujy SR., "Diabetes mellitus and periodontal disease", *Diabetes.*, Vol. 16; N° 5 (1967), pp. 336-340.

[2]- Aren G., "Periodontal health, salivary status, and metabolic control in children with type 1 diabetes mellitus", *J Periodontol.*, Vol. 74, N° 12 (2003), pp. 1789-1795.

[3]- Deville De Periere D., « Implication potentielle des peptides d'origine salivaire dans la physiopathologie du diabète », *Méd Buccale Chir Buccale .*, Vol. 3 ; N° 1 (1997), pp. 33-42.

[4]- Cedard L., "Radioimmunoassay of plasma and salivary progesterone during the menstrual cycle", *J Steroid Biochem.*, ; Vol. 20, N°1 (1984), pp. 487-490.

[5]- Mandel ID., "The diagnostic uses of saliva", *J Oral Pathol Med.*, Vol. 19, N° 3 (1990), pp. 119-125.

[6]- Kefalides PT., "Saliva research leads to new diagnostic tools and therapeutic options", *Ann Intern Med.*, Vol. 131, N° 12 (1999), pp. 991-992.

[7]- Hellweg R., Hartung HD., "Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy", *J Neurosci Res.*, Vol. 26, N° 2 (1990), pp. 258-267.

[8]- Ferguson DB., "Current diagnostic uses of saliva", *J Dent Res.*, Vol. 66, N° 2 (1987), pp. 420-424.

[9]- Hirtz C., Chevalier F., Raingeard I., Egea J-C., Bringer J., Rossignol M., Deville De Périère D., "Preliminary research for human salivary markers in type 1 diabetes", *les cahiers de l'ADF.*, N° 18-19 (2005), pp. 4-9.

[10]- Laemmli U-K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, Vol. 227 (1970), pp. 680-685.

[11]- Singh N-K., Shepherd K-W., Cornish G-B., "A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin", *J.Cereal.Sci.*, Vol.14 (1991), pp. 203-208.