



Implication de 8 SNPs des gènes de la voie intrinsèque d'apoptose chez des patients Tunisiens atteints de diabète mitochondrial

Mouna TABEBI^{1*}, Ikhlasse HADJ SALLEM¹, Najla MEZGHANI¹, Faiza FAKHFAKH¹ et Leila Keskes¹

¹: Laboratoire de Génétique Moléculaire et Humaine. Faculté de Médecine de Sfax, 3030, Université de Sfax, Tunisie



Introduction

Le diabète mitochondrial constitue une entité clinique de connaissance récente caractérisée par une transmission maternelle et une atteinte multiorgane associée aux troubles de l'audition, altérations de l'épithélium pigmentaire rétinien et même des troubles neurologiques. Les diabètes mitochondriaux sont causés génétiquement par des mutations et des délétions touchant aussi bien l'ADN mitochondrial que nucléaire. Cette atteinte mitochondriale représente une des principales caractéristiques morpho-fonctionnelles de l'apoptose.

Méthodologie

Recrutement de 43 patients chez qui les examens cliniques et génétiques ont confirmé leur atteinte par le diabète mitochondrial et 100 patients sains.

1- Des analyses histochimiques et immunohistochimiques sont effectuées sur des coupes de biopsies musculaires issues des patients diabétiques en vue de mettre en évidence le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (SDH et COX) et l'aspect apoptotique (TUNEL, détection de l'expression des protéines Bax, Bcl2 et p53).

2- Une étude de l'impact potentiel de 8 polymorphismes potentiellement fonctionnels repartis sur 5 gènes, est effectuée moyennant des techniques de PCR-RFLP, PCR-PIRA et le séquençage automatique (Tableau 1).

3- Un génotypage et une construction des haplotypes sont faites moyennant le logiciel SPSS (version 17.0) et Haploview respectivement.

Résultats

Etude immuno et histochimique

▪L'étude histochimique: une perte d'activité cytochrome c oxydase (COX) mais avec une préservation de l'activité succinate déshydrogénase (SDH), suggérant la présence d'un dysfonctionnement dans la chaîne respiratoire et la présence d'une pathologie mitochondriale.

▪L'étude immunohistochimique: le mauvais fonctionnement de la mitochondrie a provoqué un déséquilibre membranaire entre les protéines apoptotiques localisées au niveau de la membrane, en faveur des proapoptotiques (Protéines Bax), conduit à un phénomène d'apoptose caractérisé par une dégradation caractéristique de l'ADN confirmé par la technique TUNEL (Tableau 1).

Tableau 1: Observation microscopique des résultats des études immuno et histochimiques

Etude	Résultats	Observation microscopique
Activité SDH	+++	
Activité COX	++	
Expression Bax	+++	
Expression Bcl2	++	
Expression p53	++	
TUNEL	+++	

Etude moléculaire

▪Génotypages des SNPs potentiellement fonctionnels dans des gènes impliqués dans la voie mitochondriale (interne) de l'apoptose (P53, Bcl2 et Bax) associés à une étude statistique (Tableau2)

▪Construction des haplotypes sévères à partir des résultats de génotypages (Tableau3) .

Tableau 2: Fréquences génotypique des différents SNPs sélectionnés

Gene	Position, Base changée et rs #	PP	Fréquences génotypiques			
			Patients	controls	Chi2	pvalue
p53	Exon 4: R72P G>C rs1042522	PP	27(0.628)	12(0.176)	23.556	0.0009
	Intron3; 16pb ins/del rs17878362	16pb ins/ins	27(0.628)	12(0.176)	23.556	0.0009
	Intron6 G>A rs162589	AA	25(0.581)	24(0.247)	14.607	0.0019
BCL2	-938C>A: rs2279115	CC	19(0.442)	24(0.240)	19.404	0.0009
	3'UTR A>G: rs4987853	GG	6(0.14)	0(0.000)	9.461	0.0069
BAX	-298G>A: rs4645878	AA	7(0.163)	10(0.106)	0.993	0.3189
	Exon2,3 G>A: rs1805419	GG	33(0.767)	61(0.610)	3.309	0.0929
	Exon7 G>A: rs704243	AA	35(0.814)	32(0.640)	3.473	0.0669

Tableau 3: Haplotypes sévères des patients tirés à partir des différents SNPs étudiés

Gène	Haplotype	Controls (%)	Patients (%)	OR [95% CI]	p value
p53*	GinsA	17.0	53.5	5.632 [3.040-10.433]	1.07×10 ⁻⁸
BCL2**	CG	13.9	31.0	2.784 [1.413-5.484]	0.002
BAX***	AGA	11.50	24.30	2.356 [1.071-5.182]	0.030

*Order of SNPs comprising the p53 haplotypes : rs1042522, rs17878362, rs1625895

**Order of SNPs comprising the Bcl2 haplotypes : rs2279115, rs4987853

***Order of SNPs comprising the Bcl2 haplotypes : rs2279115, rs4987853

Conclusion

▪La perte d'activité (COX) et la préservation de l'activité (SDH), associées à une augmentation de l'expression Bax et une faible expression Bcl2 et p53 et un aspect apoptotique suggèrent la présence d'une pathologie mitochondriale évoluant vers une apoptose.

▪La présence du génotype AA pour le SNP (Bcl2-938) et le génotype GG pour le SNP (Bax-298) suggère l'augmentation de l'expression des protéines proapoptotiques (Bax) en faveur des protéines antiapoptotiques (Bcl2) responsable de l'accentuation du phénomène d'apoptose associé au diabète mitochondrial.

▪Ces haplotypes sont associés à un état syndromique du diabète observé chez nos patients qui peut être du à la présence de l'apoptose.