

RECHERCHE PRELIMINAIRE DE MARQUEURS DU DIABETE DANS LA SALIVE HUMAINE.

BELLIL I⁽¹⁾, BARKAT M.L.⁽²⁾, KHELIFI D⁽¹⁾.

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

2) Service de Médecine Interne, CHU de Constantine, Université 3.

RESUME :

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'intérêt. Parmi ces spots, 6 sont spécifiques au diabétique et 6 autres communs aux deux conditions et sont surexprimés chez le patient diabétique.

Mots-clés : Salive, Diabète, Biomarqueur, Electrophorèse.

ABSTRACT : PRELIMINARY RESEARCH OF DIABETES MARKERS IN HUMAN SALIVA.

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, Electrophoresis.

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, des chercheurs et des cliniciens ont proposé le suivi de variations hormonales salivaires comme de véritables marqueurs de certaines maladies [1]. 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 [2, 3, 4]. Ces données devraient nous permettre une approche différente de la physiopathologie des maladies endocrines, en particulier pour la maladie diabétique et ses complications. Ainsi, la concentration en NGF salivaire a-t-elle été corrélée à la présence de neuropathies chez le sujet diabétique [5].

Le diabète est une pathologie qui touche actuellement plus de trente millions d'individus dans le monde et est devenue aujourd'hui un enjeu majeur en termes de santé publique. Il est classiquement décrit deux types de diabète: le diabète de type 1, conséquence d'une carence de l'insulino sécrétion due à la destruction spécifique des cellules bêta des îlots de Langerhans par un processus auto-immun, et le diabète de type 2 syndrome multifactoriel déterminé par des facteurs génétiques et/ou environnementaux [6].

Au niveau de la cavité orale, cette pathologie est bien connue pour ses complications infectieuses locales et pour son influence sur le flux salivaire ou encore sur la composition protéique de la salive [7, 8, 9]. Nous nous sommes intéressés aux éventuelles variations des protéines salivaires au cours du diabète, grâce à l'utilisation des techniques d'électrophorèse mono et bidimensionnelle permettant une analyse exhaustive des protéines salivaires.

Utilisant le même principe de séparation, le protéome salivaire humain a récemment fait l'objet d'études visant à mettre en évidence sa complexité tant au niveau de la composition en protéine [10] que de la multiplicité des isoformes de l'alpha amylase salivaire [11].

Notre démarche consiste à explorer de manière aléatoire les protéines salivaires d'un sujet sain et de patients diabétiques. Les protéines salivaires variantes pourront être secondairement caractérisées par spectrométrie de masse et étudiées, afin de déterminer si elles sont susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de la pathologie étudiée.

MATERIEL ET METHODE

1. Recrutement des patients

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 1 (n=4), âgés de 16 à 38 ans et de type 2 (n=8), âgés de 51 à 81 ans dont la pathologie datait de plus de 5 ans, et présentant une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l. Ont été exclus de l'étude les patients diabétiques ayant une pathologie non régulée et ne présentant pas une bonne hygiène buccale. Cette population a été comparée à un sujet sain, sans pathologies connues et possédant une bonne hygiène buccale.

2. Recueil de la salive

Pour le recueil de la salive, nous avons adopté la méthode décrite par Hirtz & al. [6], avec quelques modifications. La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner (environ 10 heures du matin) après que le patient se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice. Afin de favoriser la salivation, le patient doit boire un verre d'eau 15 minutes avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de pa-

rafilm (environ 3 cm²), pendant quelques minutes. Trois ml de salive totale sont ainsi prélevés dans des tubes Falcon stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 x g pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines et les débris cellulaires et alimentaires encore présents dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé (-20°C).

3. Extraction des protéines

Plusieurs méthodes d'extraction ont été testées (tableau I). Les protéines sont solubilisées dans une solution d'extraction à base de Tris-HCl 0,062M pH 6,8, 2% SDS (p/v), 10% glycérol (v/v), 0,01% bleu de bromophenol (p/v) et 2,5% β-mercaptoethanol (v/v). Une incubation de 30 min à 65°C est réalisée.

4. Séparation des protéines par électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE

Les protéines sont fractionnées sur un gel de polyacrylamide à 12% selon la méthode de Laemmli [12], modifiée par Singh et al [13].

5. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle modifiée PAGE 8.8/SDS-PAGE

Les protéines sont préalablement séparées sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (sans SDS) lors d'une première dimension en fonction de leurs charge électrique et poids moléculaire. Après équilibration, les bandelettes sont déposées sur un gel à 12 % d'acrylamide en présence de SDS. Les protéines sont alors séparées en fonction de leur poids moléculaire à voltage constant (150 V). Les gels sont colorés au bleu de coomassie.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude préliminaire

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 I) et différentes techniques d'électrophorèse monodimensionnelles ont été testées. 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 β-mercaptoéthanol (méthode 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 [12] et modifiée par Singh & al. [13], 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 électro-

Tableau I. 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 & al. [6].
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 : évaporer 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.Ndimethylfo-rmamide, 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 [12] et Singh & al. [13].

phorèse SDS-PAGE sont présentés sur la 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.

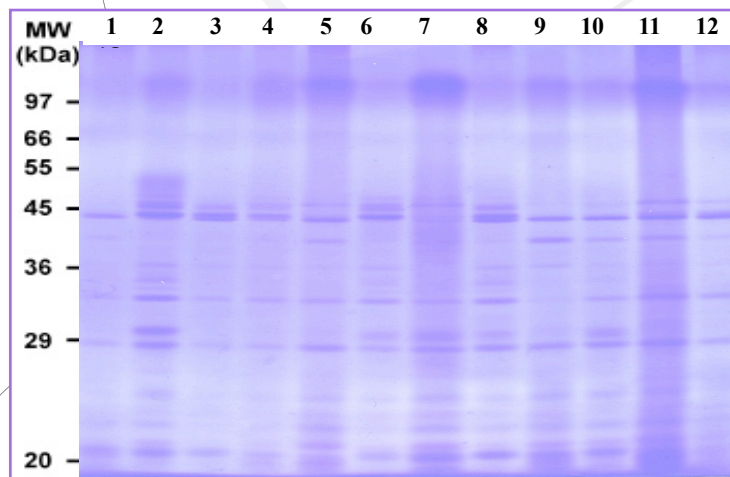


Figure 1. Diagrammes des protéines non réduites obtenus par SDS-PAGE.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 : Diabétiques type II ; 8 : Témoin ; 9, 10, 11, 12 : Diabétiques type I.

2. Analyse des profils électrophorétiques

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 de la masse moléculaire entre 15 et 128 kDa sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Les profils électrophorétiques obtenus sont présentés pour le sujet sain sur la figure 2A, et pour le patient diabétique sur la figure 2B. On peut noter que pour le sujet sain, le profil est caractéristique des profils salivaires retrouvés lors de précédentes études [9, 14].

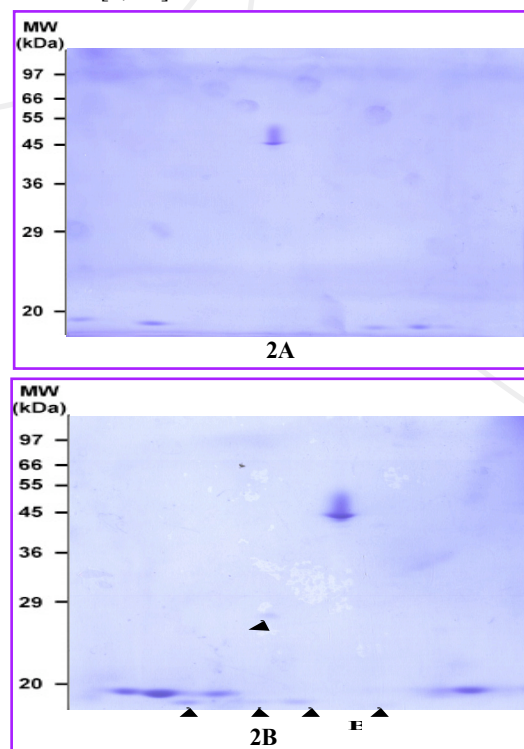


Figure 2. Profils obtenus par électrophorèse bidimensionnelle ; A : sujet sain, B : patient diabétique.

La protéine majoritaire retrouvée sur les gels est l'alpha amylase salivaire. Cette protéine est située aux environs de 55 kDa. Cette protéine présente de nombreuses modifications post-traductionnelles [15] qui conduisent à une hétérogénéité de son point isoélectrique et donc surcharge électrique. De nombreux spots bien résolus sont observés en dessous de la zone correspondant à l'alpha-amylase native. L'analyse des images permet de mettre en évidence 6 spots pour le gel du sujet sain et 12 spots pour le gel du patient diabétique type II (figure 3).

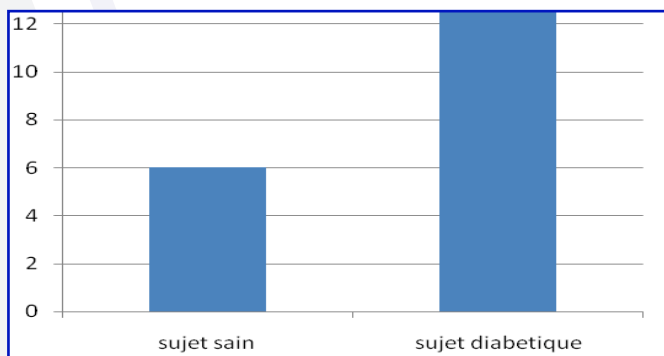


Figure 3. Comparaison du nombre de spots entre les deux gels.

Après la détection des spots sur les images, l'analyse des gels consiste aussi à appairer les spots identiques (même masse moléculaire) entre les deux gels dans les mêmes conditions. Ces liens virtuels entre spots permettent de déterminer des variations qualitatives (présence/absence) et/ou quantitatives (intensité des spots) des protéines entre les deux sujets. L'analyse comparative des gels a montré un total de 6 spots différents pour les deux patients où ils sont absents sur le gel du sujet sain (figure 4).

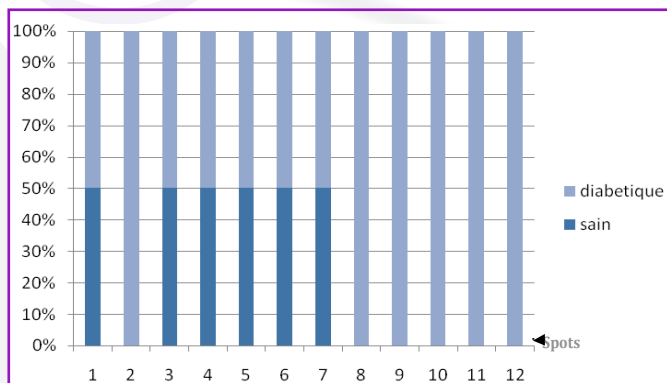
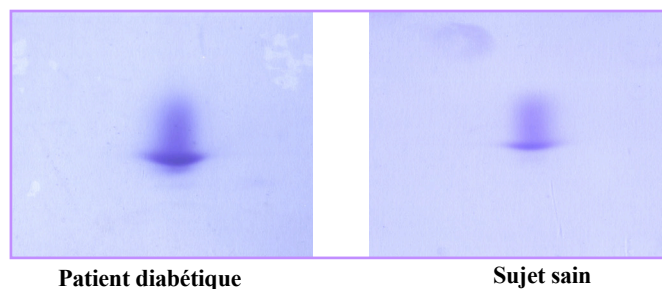


Figure 4. Evaluation du nombre de spots appariés pour les deux gels.

3. Conséquence du diabète sur le protéome salivaire

La comparaison des deux gels montre qu'environ 6 spots sont observés uniquement sur le gel du patient diabétique et qui sont absents sur le gel du sujet sain (figure 2). L'analyse comparative des deux conditions montre que les 6 spots communs présentent une variation quantitative, où ils sont retrouvés surexprimés chez le patient diabétique 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 5 et 6 ; l'alpha amylase située aux environs de 55 KDa et d'autres protéines aux environs de 20 KDa.

Ces différences d'expression sont autant de facteurs d'intérêt (biomarqueur) 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.



Patient diabétique

Sujet sain

Figure 5. Surexpression de l'alpha amylase au cours du diabète.

Figure 6. Surexpression des protéines salivaires au cours du diabète.

La prochaine étape de ce travail consistera à caractériser et identifier par spectrométrie de masse l'ensemble de spots d'intérêt afin de déterminer si ces protéines salivaires sont susceptibles d'être considérées comme des marqueurs du diabète.

CONCLUSION

Ce travail de recherche avait pour objectif d'une part d'explorer de manière aléatoire le protéome salivaire et d'autre part de rechercher les biomarqueurs protéiques du diabète dans la salive. Cette mise en évidence de spots spécifiques et/ou variants au cours d'une pathologie endocrinienne, tel que le diabète, ouvre des champs d'investigations nouveaux tant dans le domaine du diagnostic (mise en évidence éventuelle de marqueurs) que dans le suivi de ces pathologies.

REFERENCES

1. Cedard L. Radioimmunoassay of plasma and salivary progesterone during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem.* 1984; 20, 1: 487-490.
2. Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med.* 1990; 19, 3: 119-125.
3. Kefalides PT. Saliva research leads to new diagnostic tools and therapeutic options. *Ann Intern Med.* 1999; 131, 12: 991-992.
4. 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.* 1990; 26, 2: 258-267.
5. Ferguson DB. Current diagnostic uses of saliva. *J Dent Res.* 1987; 66, 2: 420-424.
6. Hirtz C, Chevalier F, Raingeard I, Egea JC, Bringer J, Rossignol M, Deville De Périère D. Preliminary research for human salivary markers in type 1 diabetes. *Les cahiers de l'ADF.* 2005; 18-19: 4-9.
7. Finestone AJ, Boorujy SR. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Diabetes.* 1967; 16, 5: 336-340.
8. Aren G. Periodontal health, salivary status, and metabolic control in children with type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2003; 74, 12: 1789-1795.
9. Deville De Periere D. Implication potentielle des peptides d'origine salivaire dans la physiopathologie du diabète. *Méd Buccale Chir Buccale.* 1997; 3, 1: 33-42.

10. **Ghafouri B.** Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics*. 2003 ; 3, 6: 1003-1015.
11. **Hirtz C.** MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics*. 2004 ; sous presse.
12. **Laemelli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
13. **Singh N-K, Shepherd K-W, Cornish G-B.** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin. *J. Cereal. Sci.* 1991; 14: 203-208.
14. **Vitorino R.** Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics*. 2004; 4, 4: 1109-1115.
15. **Bank R.** Electrophoretic characterization of posttranscriptional modifications of human parotid salivary alpha-amylase. *Electrophoresis*. 1991; 12, 1: 74-79.