

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB, BLIDA -1-
FACULTE DES SCIENCESDE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE**



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

En Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : SCIENCES BIOLOGUES

Option : Génétique

THÈME

**Etude in Silico du polymorphisme du gène NLRP3
(inflammasome) et son association au diabète**

Présenté par :

M^{elle} Belaidi Yasmina

M^{elle} Moualfi Soraya

Soutenu le : 23/09/2020

Devant le jury composé de :

Mme CHAKHMA A.

MAA

USDB 1

Présidente.

Mme RAHIM I.

MCB

USDB 1

Examinatrice.

Mme EDDAIKRA A.

MCB

USDB 1

Promotrice.

Promotion : 2019 – 2020

Remerciements

Nous tendons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience, la volonté, le courage d'accomplir ce modeste travail.

Nous exprimons notre profond remerciement et gratitude à notre promotrice

Mme Eddaikra A ; Maître de conférences au département de BPC de l'université de Blida 1, pour bien vouloir de diriger ce travail, et pour ses conseils et ses remarques constructive. nous la remerciant particulièrement pour sa disponibilité, ses encouragements. Que dieu la protège.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à Mme CHAKHMA A, d'avoir accepté de présider notre jury de soutenance.

Nous tenons à remercier Mme RAHIM I pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner notre travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Mme le chef de département d'avoir

Je tiens à remercier tous mes enseignants actuels et passés du département des sciences biologique de l'université Saad Dahlab de Blida.

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

Particulièrement à mon oncle Mahmoud et sa petite famille, pour le goût à l'effort qu'il a suscité en moi.

A ma grand-mère côté maternel, ceci est ma profonde gratitude pour leur éternel amour, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

A mes frères Khaled et Omar et ma sœur fatima qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Et ma copine Meriem ahded qui été toujours avec moi, et à mon binôme Soraya .

Yasmina

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes chers parents,

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude .

A ma chère sœur et mes chers frères ainsi et surtout à ma chère et belle famille

*Et je dédie spécialement à ma très chère amie et collègue de ce travail
Yasmina*

Soraya

Résumé

Le polymorphisme du gène NLRP3 a été associé à diverses maladies, notamment le diabète, une maladie complexe et chronique, et ses complications associées entraînent une morbidité, une mortalité et une invalidité élevées dans le monde entier. Les variations géniques trouvées au sein du gène NLRP3 peuvent mener à une activation aberrante de l'inflammasome NLRP3, ce qui conduit à un défaut dans la production des cytokines pro-inflammatoires et leur maturation, ainsi que celle de la caspase -1. Dans l'objectif d'étudier les différentes variations géniques du gène NLRP3 et son association avec le diabète chez l'être humain, on a mené une enquête par une approche bio-informatique sur ce sujet. Et cela en utilisant des données des publications récoltées dans les sites bibliographiques et les différents outils bio-informatiques. Ce qui nous a permis d'identifier les différentes variations génétiques. Notamment les SNP (Single Nucleotide polymorphism), au sein du gène NLRP3. Par contre, les résultats obtenus par les plateformes DISGENET et LIT VAR nous ont montré qu'il avait effectivement une association significative entre rs 10759558 et la pathologie du diabète.

Mots Clés : inflammasome, NLRP3, bio-informatique, diabète, polymorphisme, SNP.

Abstract

The polymorphism of the NLRP3 gene has been associated with various diseases, including diabetes, a complex and chronic disease, and its associated complications lead to high morbidity, mortality and disability worldwide. The gene variations found within the NLRP3 gene can lead to an aberrant activation of the NLRP3 inflammasome, which leads to a defect in the production of pro-inflammatory cytokines and their maturation, as well as caspase -1. In the objectives of studying the different gene variations of the NLRP3 gene and its association with diabetes in humans. we conducted an investigation using a bioinformatics approach on this subject. And this by using data from publications collected in bibliographic sites and various bioinformatics tools. This allowed us to identify the different genetic variations. Notably SNP (Single Nucleotide polymorphism), within the NLRP3 gene. On the other hand, the results obtained by the DISGENET and LIT VAR platforms showed that it did indeed have a significant association between rs 10759558 and the pathology of diabetes.

Keywords: NLRP3, inflammasome, bioinformatics, diabete, polymorphism, SNP.

المخلص

تعدد الأشكال لجين NLRP3 مرتبط بأمراض مختلفة، بما في ذلك السكري، وهو مرض معقد ومزمن، وما يرتبط به من مضاعفات تؤدي إلى ارتفاع معدلات الإصابة بالمرض والوفيات والعجز في مختلف أنحاء العالم. يمكن أن تؤدي الاختلافات الجينية الموجودة في الجين NLRP3 إلى تنشيط الجسيم الالتهابي NLRP3، مما يؤدي إلى خلل في إنتاج السيتوكينات المؤيدة للالتهابات ومعالجتها، بالإضافة إلى خلل في كاسباس - 1. من أجل دراسة الاختلافات الجينية المختلفة للجين NLRP3 وارتباطه بمرض السكري، تم البحث نهج المعلوماتية الحيوية في هذا الموضوع. وذلك باستخدام البيانات من المنشورات التي تم جمعها في المواقع الببليوغرافية وأدوات المعلوماتية الحيوية المختلفة. ولقد سمح لنا هذا بتحديد الاختلافات الجينية المختلفة، ولا سيما SNP (Single Nucleotide polymorphism)، داخل جين NLRP3. من ناحية أخرى، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بواسطة منصات DISGENET و LIT VAR أن بالفعل هناك ارتباطاً بين rs 10759558 و مرض السكري.

الكلمات المفتاحية: جسيم التهابي NLRP3، الأدوات المعلوماتية الحيوية، داء السكري، تعدد الجينات، SNP.

Sommaire

Introduction.....	1
1. Rappels bibliographique	
1.1. Gène NLRP3.....	4
1.1.1. Structure et localisation	4
1.1.2. Fonction	4
1.1.3. Régulation	5
1.1.4. Protéines du gène de la NLRP3.....	8
1.2. Polymorphisme.....	9
1.2.1. Marqueurs polymorphiques.....	10
1.2.2. Variations de nucléotides uniques (SNP).....	10
SNP codants	
SNP non codant	
1.2.3. Polymorphisme du gèneNLRP3.....	11
1.3. Association diabète et polymorphisme du gène NLRP3.....	12
1.4. Conséquences physiopathologiques du polymorphisme de NLRP3.....	13
2. Matériel et Méthodes	
2.1. Matériel.....	15
2.1.1. Matériel biologique.....	15
2.1.2. Outils bio-informatiques.....	15
2.2. Méthodes	16
2.2.1. Outils bio-informatiques.....	17
Outil NCBI	17
Outil ENSEMBL genome browser.....	18
Outil UCSC.....	20
Outil GALAXY.....	21
Outil DISGENET	22
Outil LIT VAR.....	23
3. Résultats et Discussions	
3.1. Résultats	
3.2. Discussion	
Conclusion	
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARICH2	l'homologue 2 d'ariadne
ARN	Acide ribonucléique
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
ATP	L'adénosine triphosphate
BRCC	complex containing BRCA1 and BRCA2
DAMP	Damage associated molecular pattern
DT1	diabète de type 1
DT2	diabète de type 2
IL-1R	Récepteur IL-1
INF	Interféron
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
GSDMD	Gasdermin D
LT	lymphocytes T
JNK1	kinase N-terminale JUN 1
MAPL	protéine ligase à ancrage mitochondrial
MARCH7	protéine de doigt RING associée à la membrane 7
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PKD	Protéine kinase A
PRR	Pattern recognition receptor
PTPN22	non-récepteur 22 de la protéine tyrosine phosphatase
TLR	Toll-like receptors

Listes des figures

	Titre	Page
Figure1	position du gène NLRP3 dans le génome	04
Figure2	Sites de liaison UTR de NLRP3 pour les miARN responsables de la régulation de l'inflammasome.	06
Figure3	Modifications post-transcriptionnelle et régulation de l'NLRP3	08
Figure4	schéma explicatif de l'assemblage de la protéine NLRP3	09
Figure 5	Représentation schématique des polymorphismes du gène NLRP3 étudiés en relation avec les maladies inflammatoires	12
Figure 6	Méthode de recherche des SNP du gène NLRP3.	16
Figure 7	Plateforme NCBI et recherche sur le gène	17
Figure 8	Résultats de recherche et choix d'ID du gène selon l'espèce	18
Figure 9	Plateforme Ensembl et lancement de la recherche du gène	19
Figure 10	Choix de sélection du gène d'intérêt dans Ensembl	19
Figure 11	accès au séquences du gène	20
Figure 12	Accès a la configuration de marquage du gène NLRP3	20
Figure 13	Recherche et trie des SNPs du gène NLRP3	21
Figure 14	Plateforme GALAXY et accès vers les SNPs	21
Figure 15	Plateforme DISGENET et lancement de la recherche gène-maladie	22
Figure 16	Plateforme de LITVAR et lacement de la recherche	23
Figure 17	Résultat du marquage de la séquence nucléotidique du gène NLRP3	25
Figure 18	Ensembl , tableau des transcrits	26
Figure 19	Resultat de la Localisation du gène dans le chromosome 1	26
Figure 20	Localisation des polymorphismes snp « rs » sur la séquence nucléotidique du gène NLRP3	27
Figure 21	UCSC , résultats des différents rs du gène NLRP3	28
Figure 22	Résultats de recherche des SNPs par GALAXY	29
Figure 23	résultats des SNP et leur association au diabète	32

Liste des tableaux

	Titre	Page
Tableau I	description du gène NLRP3	15
Tableau II	description des diffèrent outil de bio-informatique	15-16
Tableau III	résultats de recherche de SNP associer au diabète	30-32

Introduction

Introduction

L'inflammasome NLRP3 fournit une plateforme de signalisation, qui est assemblée en réponse à des signaux de danger. Afin de libérer la caspase-1 mature et produire de puissantes cytokines pro-inflammatoires, telle que IL-1 β et IL-18, qui se sont avérées ayant un rôle important dans la résistance à l'insuline ainsi que la progression du diabète ; une maladie métabolique caractérisée par un niveau de sucre trop élevé dans le sang et l'altération de la production d'insuline. Compte tenu des énormes effets négatifs du diabète sur la personne et la société, due aux complications majeures de la maladie. Les maladies cardiovasculaires, la neuropathie, les maladies rénales, l'amputation des membres inférieurs et la cécité sont quelques-unes des conséquences graves du diabète et donc de nouvelles options de traitement sont nécessaires d'urgence (Ding et al., 2019).

Notre étude est faite sur le polymorphisme du gène NLRP3, un gène qui code pour une protéine NLRP3, celle-ci s'assemble avec la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) et la pro-caspase-1, afin de former un inflammasome ; inflammasome NLRP3 dont ses produits semblent faire partie du système immunitaire inné du corps, en ce sens qu'ils peuvent être déclenchés pour aider à la défense contre les agents pathogènes envahissants (Gross et al., 2011), mais aussi il semble être un élément déclencheur du diabète. Notre objectif est d'étudier les différents variants du gène NLRP3 et leur association avec le diabète chez l'être humain. En utilisant des données des publications récoltées dans les sites bibliographiques et les différents outils bio-informatiques.

La recherche des mutations polymorphiques du gène NLRP3 par l'utilisation des données des publications récoltées dans les plateformes NCBI, ENSEMBL, UCSC, GALAXY, DISGENET et LIT VAR. Nous avons permis d'identifier les différents polymorphismes du gène NLRP3, ainsi que les différents variants majeurs susceptibles d'être associés au diabète comme les rs12048215, rs35829419, rs2027432, rs10754558, rs7512998 et rs1307114721. Et en effet, plusieurs études ont montré qu'il existe bien une association entre le polymorphisme rs10754558 et le développement du diabète contrairement ou autre variant dont l'association n'est pas significative (Kelley et al., 2019).

Nous avons émis l'hypothèse que les variations génétiques du gène *NLRP3* pourraient affecter l'ampleur des réponses immunitaires inflammatoires dans le cas du diabète de type 1 et le diabète de type 2.

Rappels

bibliographique

1. Gene NLRP3

1.1. Structure et localisation

La séquence complète du gène *NLRP3* humain comprend 3 kb en amont du site de début de transcription, tous les exons et introns, et 2 kb en aval du codon stop (37,953 kb au total), et qui a été localisé sur le chromosome 1, positions 247576458 à 247614410 (**Zhang et al., 2011**).

Ce gène code pour une protéine de type pyrine, localisé sur le chromosome 1q44, et qui est un membre de l'ensemble humain CCDS (consensus coding sequence).

De multiples variantes de transcription épissées alternativement codant pour des isoformes distinctes ont été identifiées pour ce gène.

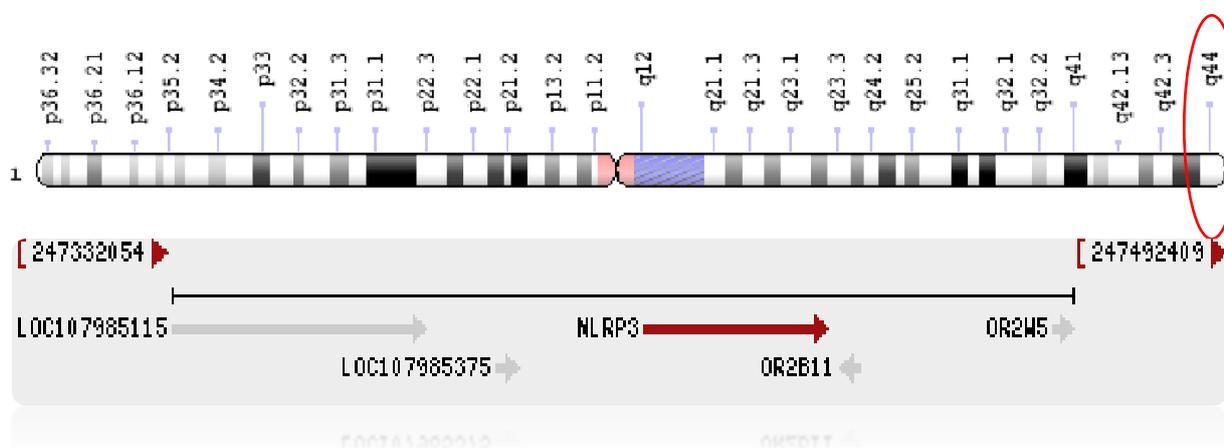


Figure 1: Position du gène NLRP3 dans le génome

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114548>

1.2. Fonction

L'inflammasome NLRP3 est un lien entre la résistance à l'insuline, l'obésité, les marqueurs moléculaires circulants, la sensibilité immunogénétique, la fonction des macrophages, et l'inflammation chronique (**Klen et al., 2015**). Il induit la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1b et IL-18, et l'initiation de la mort cellulaire pyroptotique (**Christgen et al., 2020**).

L'inflammasome NLRP3 induit aussi le clivage de la gasdermine par la caspase 1 pour qu'elle soit active et forme des pores au niveau de la membrane.

Des expériences faites sur des souris NOD prouvent que l'inflammasome NLRP3 est très essentiel pour l'activation des cellules présentatrice d'Antigène, l'activation LT, la différenciation des LTh1 et la migration des LT auto-réactif vers les ilots pancréatiques via les récepteurs des chimiokines CCR5 et CXCR3 (**Ribeiro et al., 2017**).

1.3. Régulation

Il existe un nombre croissant de preuves suggérant qu'il existe un seuil d'activité NLRP3, qui agit comme un mécanisme de sauvegarde pour empêcher la sur-activation de l'inflammasome. Il semble qu'une activation aberrante de la protéine NLRP3, pourrait avoir un effet néfaste sur l'homéostasie des tissus et compromettre l'intégrité de la barrière.

1.3.1. Régulation au niveau transcriptionnelle

L'activité d'un inflammasome est étroitement régulée au niveau transcriptionnelle. un certain nombre de facteurs ont été proposé pour réguler l'expression des composant de l'inflammasome. Des molécules nécessaires en amont de l'activation et des molécules effectrices en aval (**Christgen et al., 2020**).

La fixation du TNF sur son récepteur active la transcription du facteur nucléaire NF- κ B. L'activation de la voie NF- κ B va induire la transcription de gènes codant pour des chimiokines et des molécules d'adhérence. Ce qui va permettre le recrutement de macrophages et des cellules dendritiques. Cette voie va également induire l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-6, la pro-IL-1 β , la pro-IL-18 et des protéines inflammatoires comme NLRP3 (**Gicquel, 2014**).

1.3.2. Régulation post-transcriptionnelle

Le terme « épigénétique » a été initialement présenté pour décrire la régulation de l'expression génique, est une modulation héréditaire stable de l'expression génique, sans altérer la séquence d'ADN. Le contrôle épigénétique à été démontré dans le développement normal et la

différenciation. Cependant, son rôle dans la pathogénèse de l'inflammation aiguë et chronique est de plus en plus reconnue (**Tezcan et al., 2019**).

- **La méthylation d'ADN** : la méthylation est l'ajout d'un groupement méthyle aux nucléotides cytosines situés dans des îlots CpG (séquences riches en nucléotide C et G) de l'ADN. Elle fait taire les gènes pour assurer l'expression mono-allélique, empêchant l'expression endogène des rétrovirus et les actions des transposons. La dé-méthylation de l'ADN est souvent détectée à proximité des promoteurs que la surexpression des gènes pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de nombreuses pathologies.

L'expression de l'NLRP3 peut être réglée par des changements dans l'état de méthylation du gène (**Tezcan et al., 2019**).

- **La modification des histones** : il semble que l'expression de l'inflammasome peut également être régulée en affectant le statut d'acétylation des histones ; qui joue un rôle essentiel dans l'initiation de la phase d'activation de l'inflammasome NLRP3 ou bien la phase transcriptionnelle.

L'expression du gène NLRP3 s'est révélée être aussi régulée post-transcriptionnellement par plusieurs **miARN** (**Tezcan et al., 2019**).

Les ARN non codants sont également impliqués dans la régulation du gène NLRP3. Au cours de la phase transcriptionnellement active de l'NLRP3, l'ARNm de NLRP3 pourrait être régulé par les miARN. Plusieurs miARN pourraient réguler l'expression d'un seul transcrite, en plus du miR-223, d'autres miARN puissent modifier la transcription de NLRP3 tels que miR-30e et le miR-7. Ces deux miARN contrôlent l'activation de l'NLRP3 jouant un rôle d'inhibiteur dans le cas d'une neuro-inflammation induite par l'inflammasome NLRP3 dans le cas de maladie Parkinson. Autres études ont démontré que les imitateurs miR-22 pouvaient diminuer la libération de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-18 en supprimant l'expression du gène NLRP3 dans les monocytes et les macrophages (**figure 2**) (**Tezcan et al., 2019**).

Il a été démontré que certains virus régulent aussi post-transcriptionnellement l'expression des inflammasomes pour favoriser l'auto-réplication. Elle se fait par la suppression des miARN en favorisant la liaison des inflammasomes sur des séquences bien précises pour empêcher l'activation et la traduction de ces inflammasomes (**Tezcan et al., 2019**).

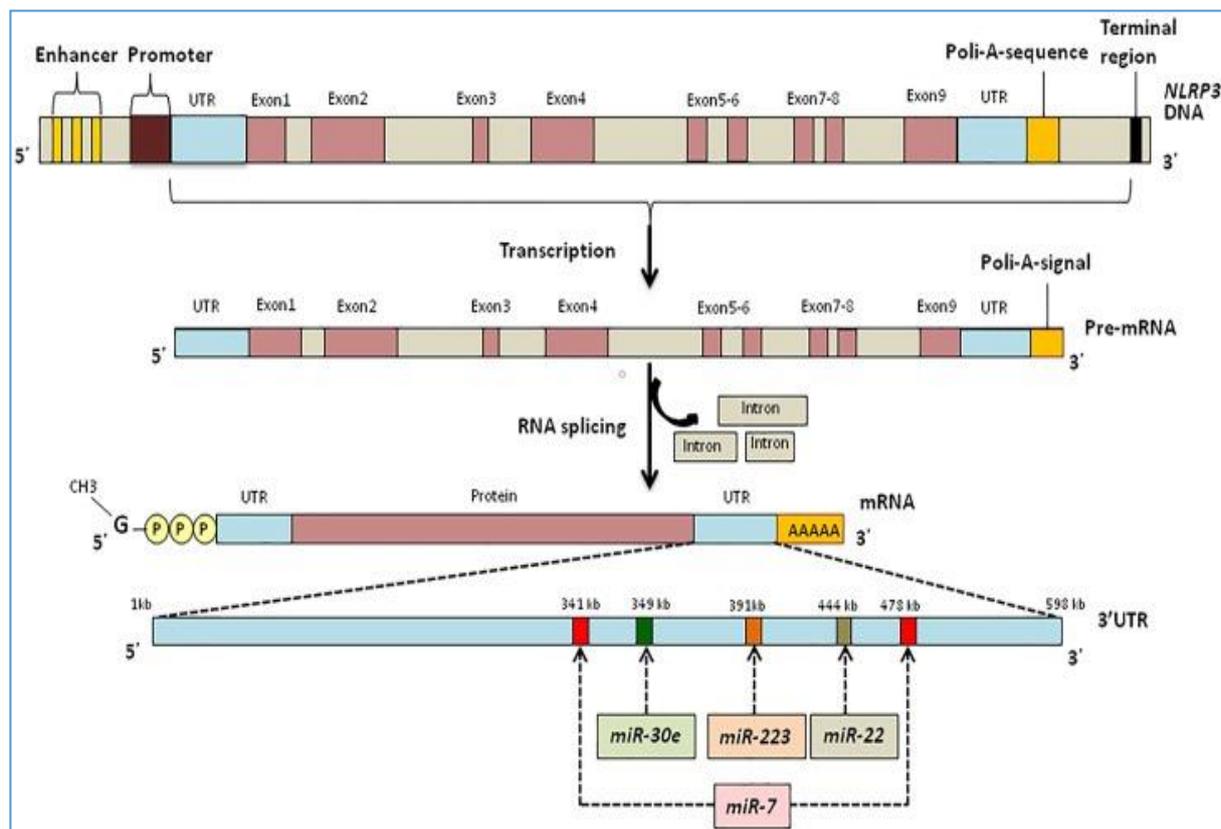


Figure 2: Sites de liaison UTR de NLRP3 pour les miARN responsables de la régulation de l'inflammasome.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6504709/bin/fphar-10-00451-g003.jpg>

1.3.3. Régulation de NLRP3 par les modifications post-traductionnelle

L'NLRP3 reconnaît et devient active en réponse à des signaux spécifiques tel que : l'ATP, les ions K^+ , l'hème, l'ARN associé au agent pathogène, toxines bactériennes et fongiques et leurs composant.

Ces signaux activent une signalisation cellulaire commune :

- Flux ionique
- Dysfonctionnement mitochondriale
- Dommage lysosomaux

Les signalisations cellulaires servent à activer ou renforcer l'activité de l'NLRP3. Des modifications post-traductionnelles affectent les différents domaines de la NLRP3. En régulant

Rappels Bibliographies

cette dernière positivement ou négativement par : la phosphorylation, l'ubiquitination, la nitrosylation et d'autre modification post-traductionnelle.

a) Ubiquitination (Ub) : elle a un rôle positive dans la régulation de l'activité de l'inflammasome NLRP3, le BCC36 est l'une des enzyme responsables à la deubiquitination, USP7 et USP47 deux autres enzymes qui régulent positivement la formation d'inflammasome NLRP3. La phosphorylation de NLRP3 médiée par JNK1 à Ser194, qui est nécessaire pour la désubiquitination et l'activation de NLRP3.

Aussi, l'ubiquitination de NLRP3 a un rôle négative ou positive dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, selon l'ubiquitine ligase et le type d'ubiquitination.

b) Phosphorylation (P) : la phosphorylation de NLRP3 au niveau du même site a des fonctions opposées dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. La phosphorylation de la serine 295 du domaine NOD par la PKA (induite par l'AMPc) inhibe l'activité ATPasique de l'NLRP3 et altère la fonction de l'inflammasome NLRP3. La phosphorylation de NLRP3 au niveau du même résidu favorise l'activation de l'inflammasome NLRP3.

c) La nitrosylation : la nitrosylation de NLRP3 bloque son activité. La S-nitrosylation de l'NLRP3 du macrophage infecté comme dans le cas de *Mycobacterium tuberculosis* induit l'inhibition de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3.

d) La sumoylation : la sumoylation régule négativement l'inflammasome NLRP3. SUMO E3-ligase MAPL (aka Mul1) cible NLRP3, et que lors de la stimulation, les protéases SUMO-spécifiques SENP6 et SENP7 désumoylatel' NLRP3, qui favorise l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Kelley et al., 2019).

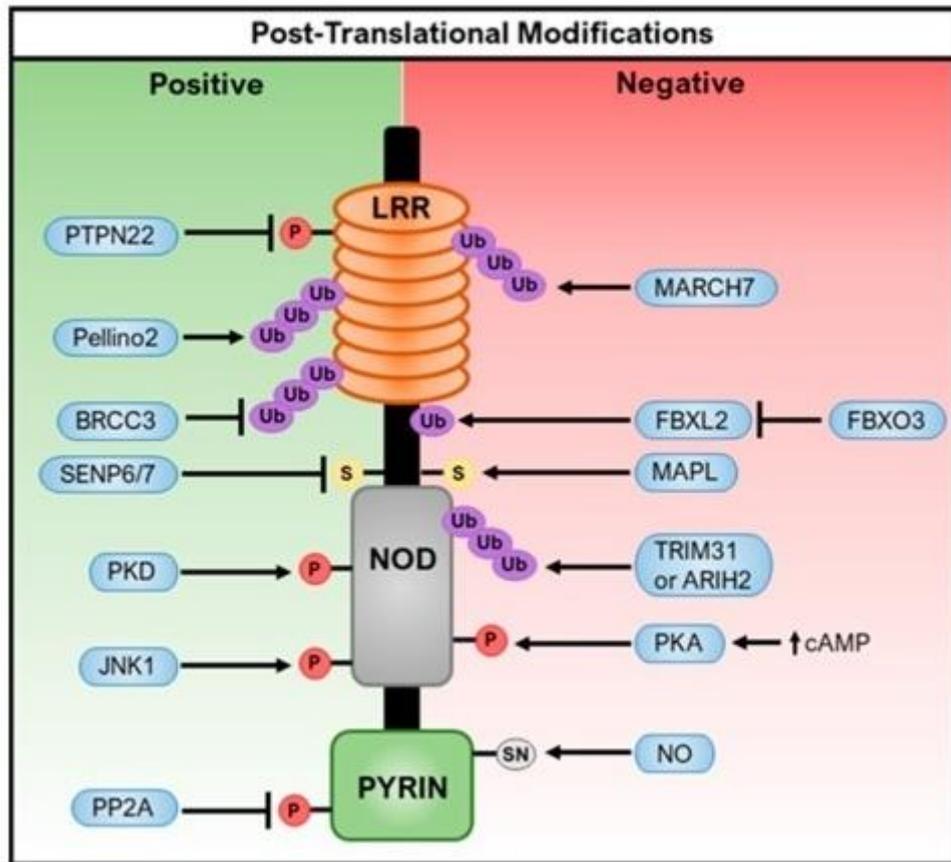


Figure 3: **Modifications post-transcriptionnelle et régulation de l’NLRP3**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651423/bin/ijms-20-03328-g003.jpg>

1.4. Protéines du gène de la NLRP3

L’NLRP3 est un PRR « *Pattern Recognition Receptors* », récepteur exprimé par les cellules de la lignée germinale en réponse à une infection bactérienne, fongique, et virale en changeant leur conformation. Ce PRR reconnaît les PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) et les DAMP (Damage associated molecular pattern), déclenche des voies d’infections pour éliminer l’infection microbienne et répare les tissus endommagés. L’NLRP3; Une protéine tripartite, ces domaines sont :

PYD: Domaine pyrine amino-terminal, interagit avec le domaine n-terminal de la protéine adaptatrice(ASC) pour initier l’assemblage de l’inflammasome.

NOD(NATCH) : un domaine central de liaison au nucléotides et d’oligomérisation, possède une activité ATPasique nécessaire pour leur oligomérisation.

LRR: leur fonction n'est pas clair .

Le domaine pyrine de NLRP3 interagit avec le domaine pyrine de ASC pour initier l'assemblage inflammasome. Le domaine NOD possède une activité ATPase qui est requise pour l'oligomérisation NLRP3 après l'activation (**Kelley et al., 2019**).

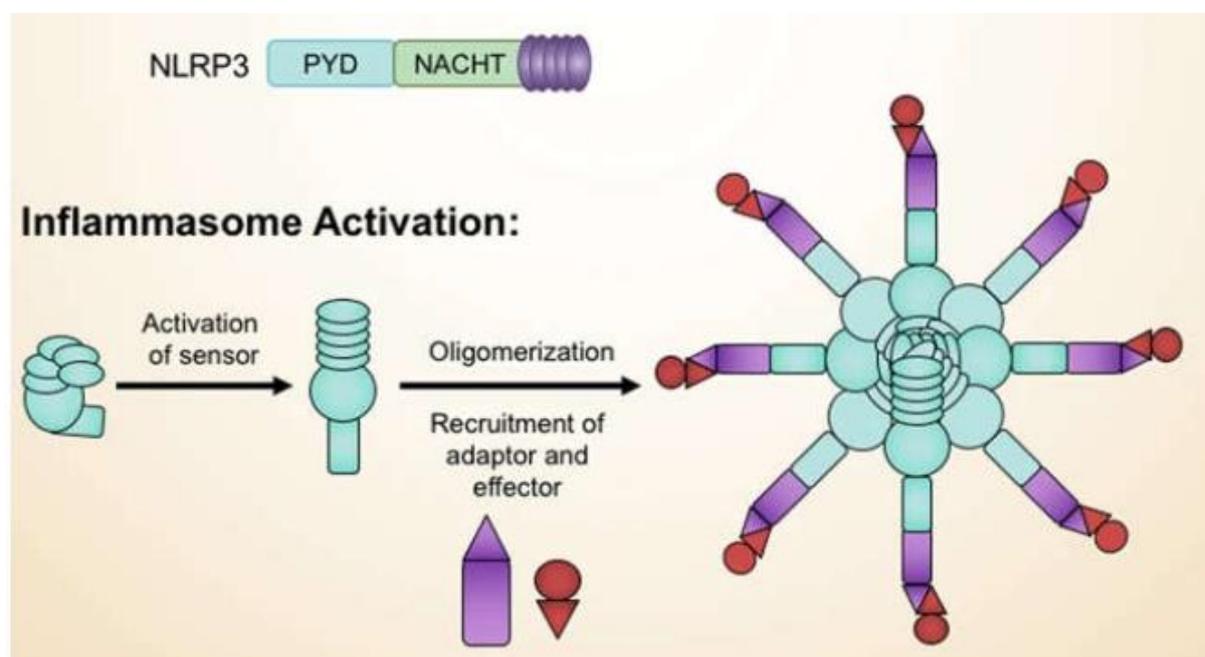


Figure 4: schéma explicatif de l'assemblage de la protéine NLRP3

https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/art:10.1038/s41422-020-0295-8/MediaObjects/41422_2020_295_Fig5_HTML.png?as=webp

1.5. Polymorphisme

Le polymorphisme génétique (du grec "poly" plusieurs et "morphe" forme) est la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou locus donnés. Dans une population, C'est le fait qu'une espèce présente donc des individus différents aux caractères phénotypiques différents (appelés morphotypes) au sein d'une même population. Le polymorphisme concerne toutes les espèces. Ce sont des variations liées aux mutations génétiques et aux différentes adaptations.

Le polymorphisme correspond aux variations de la séquence nucléotidique de l'ADN d'un gène dans une population. Un gène est considéré comme polymorphe s'il existe au moins deux allèles à une fréquence égale ou supérieure à 1 %.

1.5.1. Marqueurs polymorphiques

Un marqueur génétique est simplement une portion de l'ADN de l'organisme étudié, ou un sous-produit codé par cet ADN (comme une protéine). Il est important que cette portion d'ADN reste la même (même localisation dans le génome, à la même place sur le même chromosome) d'un individu à l'autre, d'où le terme locus. Ce dernier peut correspondre à un gène (codant pour une fonction quelconque), comme c'est le cas pour les loci enzymatiques, mais il peut aussi correspondre à une zone non codante. Et donc à priori non fonctionnelle de l'ADN, comme c'est le cas de la plupart des microsatellites. Enfin, il est important de se souvenir qu'un locus, même non codant, peut se trouver dans un intron, c'est-à-dire dans un gène. un locus doit être variable (on dit polymorphe) (De Meeûs & De Meeûs, 2017).

Cette notion de marqueur génétique a été introduite en 1980. Il s'agit d'une séquence d'ADN repérable spécifiquement. En cartographie génétique, le marqueur est utilisé pour "baliser" le génome. En contrôle du transfert de gène, le marqueur est un gène associé au gène d'intérêt, codant une caractéristique détectable facilement et précocement, facilitant le repérage des cellules au sein desquelles la transgénèse a réussi. Il existe aussi des marqueurs " anonymes " qui correspondent à des séquences non traduites (les variations alléliques de ces marqueurs ne sont pas décelables au niveau phénotypique mais au niveau de la séquence). Marqueurs SNP (tSNP) ont été sélectionnés dans la région flanquante 5 'du gène NLRP3 comme le rs2027432, qui est situé dans la région flanquante 5 ', et qu'il a un effet sur l'activité du promoteur (Zhang et al., 2011).

1.5.2. Variations de nucléotides uniques (SNP)

Plusieurs études ont été menées sur l'association des altérations génétiques des gènes codant pour NLRP3 avec les maladies complexes d'origine inflammatoire, comme les maladies inflammatoires de l'intestin, les maladies cardiovasculaires, la polyarthrite rhumatoïde et le diabète de type 1. Les variantes génétiques, en particulier les SNPs, sont des déterminants critiques des différences interindividuelles en ce qui concerne à la fois les réponses inflammatoires.

SNP codant : sont des SNP (single nucleotide polymorphism), ou prononcés Snips, correspondent à des variations mineures du génome au sein d'une population. Un seul nucléotide, le composant de base de l'ADN, est modifié, dans une région de gène codant ou fonctionnelle.

SNP non codant : sont des variation nucléotidiques au niveau des régions non codantes de gène (comme les introns), dans les régions régulatrices du gène (comme le promoteur), ou situé en dehors du gène dans des régions 5' UTR (ou 3'UTR) ou des séquences satellites , et participent dans la régulation du gène , et altérations peut provoquer une altération de fonction du gène (**Zhang et al., 2011**).

1.5.3. Polymorphisme du gène NLRP3

De plus en plus de preuves suggèrent que les variantes génétiques du gène NLRP3 pourraient être un déterminant important de l'ampleur des réponses immunitaires inflammatoires. Influençant la sensibilité aux maladies infectieuses et non infectieuses. Environ plus de 60 SNP ont été identifiés dans l'ensemble du gène NLRP3. rs10754558, rs12065526, rs4612666, rs4925648, rs10925019, rs10925027, rs3806265 et rs35829419 se sont avérés susceptible d'être associés au diabète (**Paramel et al., 2015**).

plusieurs polymorphismes mono nucléotidiques (SNP), dans les gènes codant pour les composants de l'inflammasome NLRP3 ou dans leurs régions régulatrices , ont été associés à la physiopathologie de diverses autres maladies. localisés dans les gènes NLRP3 et dans des régions régulatrices putatives (**Paramel et al., 2015**).

Le polymorphisme rs2027432 pourrait améliorer significativement les activités de promoteur du gène *NLRP3*. Il est situé dans la région flanquante 5'. Le polymorphisme rs2027432 était significativement associé à une production d'IL-1 β plus élevée. Le SNP rs10754558 dans la région régulatrice en aval de NLRP3 s'est avéré être t associé au DT1 chez les patients d'origine brésilienne (**Paramel et al., 2015**).

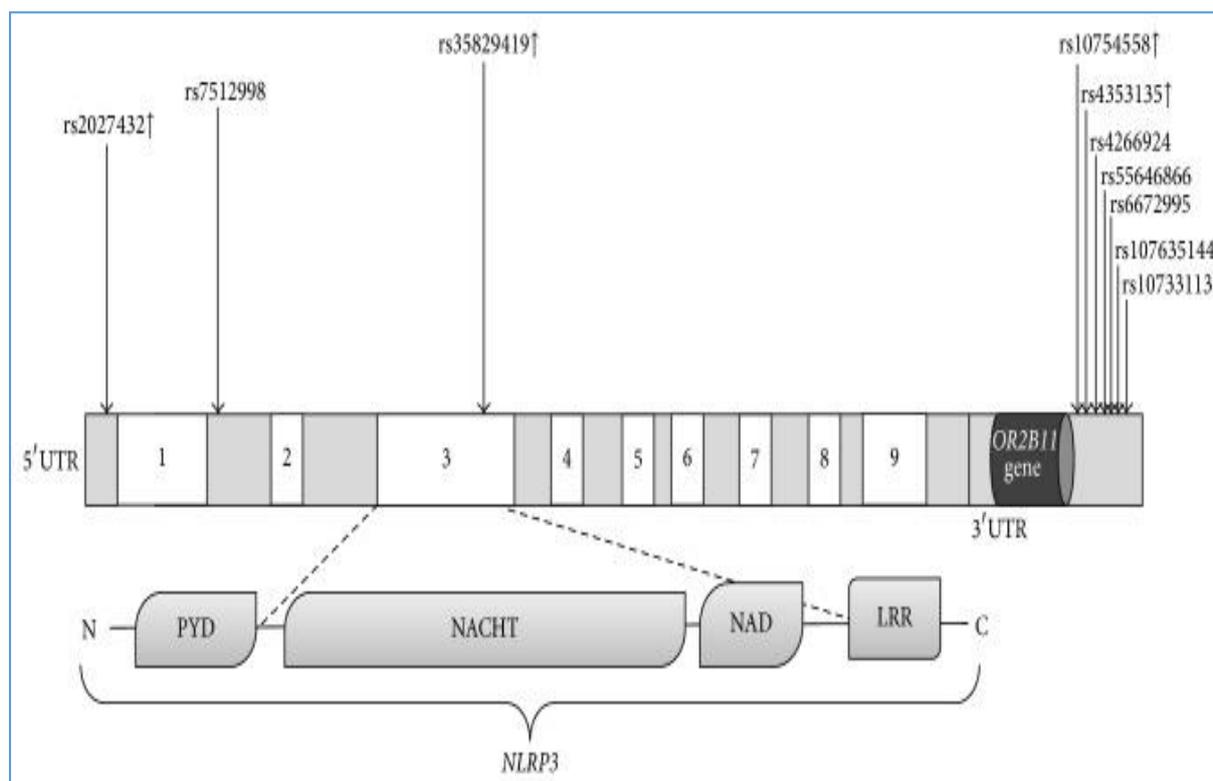


Figure 5 : Représentation schématique des polymorphismes du gène NLRP3 étudiés en relation avec les maladies inflammatoires

1.5.4. Association diabète et polymorphisme du gène NLRP3

Un certain nombre d'études se sont intéressées aux polymorphismes pouvant être associés à des maladies à étiologie complexe tel que diabète ; une des maladie multifactorielles dont la progression c'est avéré associer au polymorphisme du gène NLRP3. Une fois que l'inflammasome NLRP3 sera activé. Il conduit à l'activation de la pro-caspase -1 en caspase-1 active, l'expression et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoire IL-1B et IL-18. Celle ci jouant un rôle cruciale dans la résistance à l'insuline. Elles peuvent provoquer un stress des cellules bêta des îlots pancréatique ainsi que leur endommagement (**Klen et al., 2015**).

En conséquence, l'analyse de ces variabilités et structure génétique de l'espèce humaine paraît essentiel, pour combattre les maladies communes à composante génétique et d'identifier les

polymorphismes et les gènes impliqués dans des susceptibilités d'atteinte et ainsi définir les cibles thérapeutiques potentiels dans la progression de la maladie.

Le diabète de type 1 (DT1) ; est une maladie auto-immune spécifique à un organe caractérisée, par la destruction médiée par les lymphocytes T et des cellules β pancréatiques productrices d'insuline. Une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux conduit finalement à la perte de la masse cellulaire fonctionnelle des cellules β et à l'hyperglycémie (**Tai et al., 2016**). Contrairement aux cellules résidant dans les tissus, telles que les macrophages et les cellules dendritiques, les cellules T sont rarement observées dans les îlots pancréatiques sains. Par conséquent, le recrutement des cellules T effectrices vers les îlots pancréatique est une étape clé de l'inflammation et de la destruction des cellules β caractéristique du TD1 (**Ding et al., 2019**).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 déclenche des réponses immunitaires innées et libère de l'IL-1 β active. Ces cytokines sécrétées et les IFN de type 1 peuvent provoquer un stress des cellules bêta des îlots pancréatiques et également faciliter l'activation des cellules T naïves qui sont amorcées avec les auto-antigènes des cellules bêta des îlots présentés par les macrophages ou les Cellules dendritique. Cet événement attire des macrophages plus matures, des Cellule dendritiques et des cellules T effectrices pour migrer vers les îlots pancréatiques pour à la fois endommager directement les cellules β et indirectement via les cytokines pro-inflammatoires (**Tai et al., 2016**).

Le diabète de type 2 (Le DT2) ; appelé aussi diabète non insulino-dépendant ou le diabète de la maturité ; est défini par un désordre chronique. Il est caractérisé par une altération du métabolisme lipidique et glucidique liée à une déficience soit de la sécrétion d'insuline (insulinopénie ; dysfonction des cellules β -pancréatiques), soit de l'action de l'insuline (insulino-résistance). C'est est une maladie multifactorielle, hétérogène et polygénique qui peut être déclenchée par l'interaction d'anomalies de plusieurs gènes intervenants dans le déterminisme du DT2 (tels les gènes de la glucokinase, du glucagon, etc.) , et qui s'expriment en présence de facteurs environnementaux comme l'obésité, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, etc (**Abderrazak et al., 2017**). La résistance à l'insuline, souvent associée à l'obésité, et les défauts de sécrétion d'insuline sont des facteurs de risque majeurs de diabète de type 2. Les anomalies génétiques jouent un rôle important dans la survenue de cette maladie. Cette part héréditaire est à l'origine de plusieurs formes de DT2 dont la plupart des mutations influent s la sécrétion de l'insuline (**Wang et al., 2015**). De plus les patients diabétiques de type 2 ont montré des taux élevés d'ARNm et de protéines NLRP3, ASC, IL-1 β et IL-18 dans les

macrophages dérivés de monocytes, par rapport à ceux des sujets témoins sains. L'inflammasome NLRP3 peut contribuer à promouvoir la production de cytokines inflammatoires et la résistance à l'insuline en réduisant la signalisation de l'insuline. IL-1 β sécrété suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3, peut induire une résistance à l'insuline en réduisant la phosphorylation de la tyrosine du substrat-1 du récepteur de l'insuline (IRS-1) et l'expression du gène IRS-1 (Ding et al., 2019; Abderrazak et al., 2017).

1.6. Conséquences physiopathologiques du polymorphisme de NLRP3

La complexité d'une maladie inflammatoire courante est influencée par de multiples facteurs génétiques et environnementaux contribuant à la susceptibilité à la maladie. Des études de polymorphisme génétique sur des cohortes de patients pourraient aider à déterminer la signification fonctionnelle des données d'expression des protéines. Enfin, l'identification d'outils pharmacologiques sélectifs capables d'affecter l'expression et / ou l'activité de cette nouvelle voie qui pourrait représenter la preuve ultime de l'importance de l'axe inflammasome-caspase-1-IL-1 β / 18 dans le développement de l'inflammation métabolique. La protéine NLRP3 est connue par des mutations responsables de l'apparition des maladies inflammatoires graves. Par exemple, Les patients ayant un syndrome de fièvres récurrentes héréditaires et des maladies inflammatoires chroniques, présentent des mutations au niveau de l'exon 3 du gène qui code cette protéine (Abderrazak et al., 2017). En dehors du diabète et ces complication Le polymorphisme de l'inflammasome Nlrp3 est associer a un spectre de maladie inflammatoire ; tel que les Maladie inflammatoire de l'intestin, Maladies cardiovasculaires, Polyarthrite rhumatoïde, Spondylarthrite ankylosante, Maladie cœliaque, La maladie d'Alzheimer, la Goutte, l'asthme et le cancer. On trouve tous les pathologies associer au variation génique dans le lien suivant : https://www.disgenet.org/browser/1/1/2/114548/50/25/source__ALL/_b/

Matériel et Méthodes

2. Matériel et méthodes

Dans cette partie, nous avons développé une étude in Silico pendant une durée de temps de 06 mois du mois de Mai 2020 jusqu'au mois de Septembre.

Notre objectif principal est d'étudier le polymorphisme du gène NLRP3 et son association à l'apparition du diabète chez l'homme en utilisant différentes les Bases des données génomiques et les outils de la bio-informatiques.

2.1. Matériels

2.1.1. Matériel biologique

Les identifiants (numéros d'accessions) et les sources des séquences nucléotidiques transcrites du gène « NLRP3 » Refseq gène et RNAseq sont représentés dans le tableau ci-dessous (tableau I). Ces données sont stockées dans des bases de données à accès libre.

Tableau I : Description du gène NLRP3

Gène	Nombre de paire de bases	Nombre d'exon	emplacement	Refseq NCBI	Gène ID
NLRP3	39936 pb	10	1q44	NG_007509.2	114548

2.1.2. Matériel non biologique

Pour l'analyse de nos échantillons moléculaires nous avons utilisé des interfaces web, des logiciels, des softwares qui se base sur des algorithmes. Ces outils bio-informatiques sont répertoriés dans le tableau II.

Tableau II : Description des diffèrent outil de bio-informatique

Base de données	Commentaires	URL
NCBI	C'est une base de données Qui fait progresser la Science et la santé en Fournissant l'accès àL'information biomédicale Et génétique.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov
UCSC	C'est une base de données Ouverte, stable et Accessible en ligne, elle est Issue de la consolidation De l'ensemble des données produites par la communauté scientifique.	https://genome.ucsc.edu

Galaxy	C'est une plateforme de travail En ligne Contenant divers Outils pour effectuer un grand nombre d'opération sur des données génomiques	https://usegalaxy.org/
Ensembl	C'est un système bio-informatique d'annotation automatique de génomes. Permet de filtrer les données des SNP codants du promoteur\exon du gène	http://www.ensembl.org

2.2 Méthodes

Le protocole de notre étude est schématisé en organigramme par la figure ci-dessous.

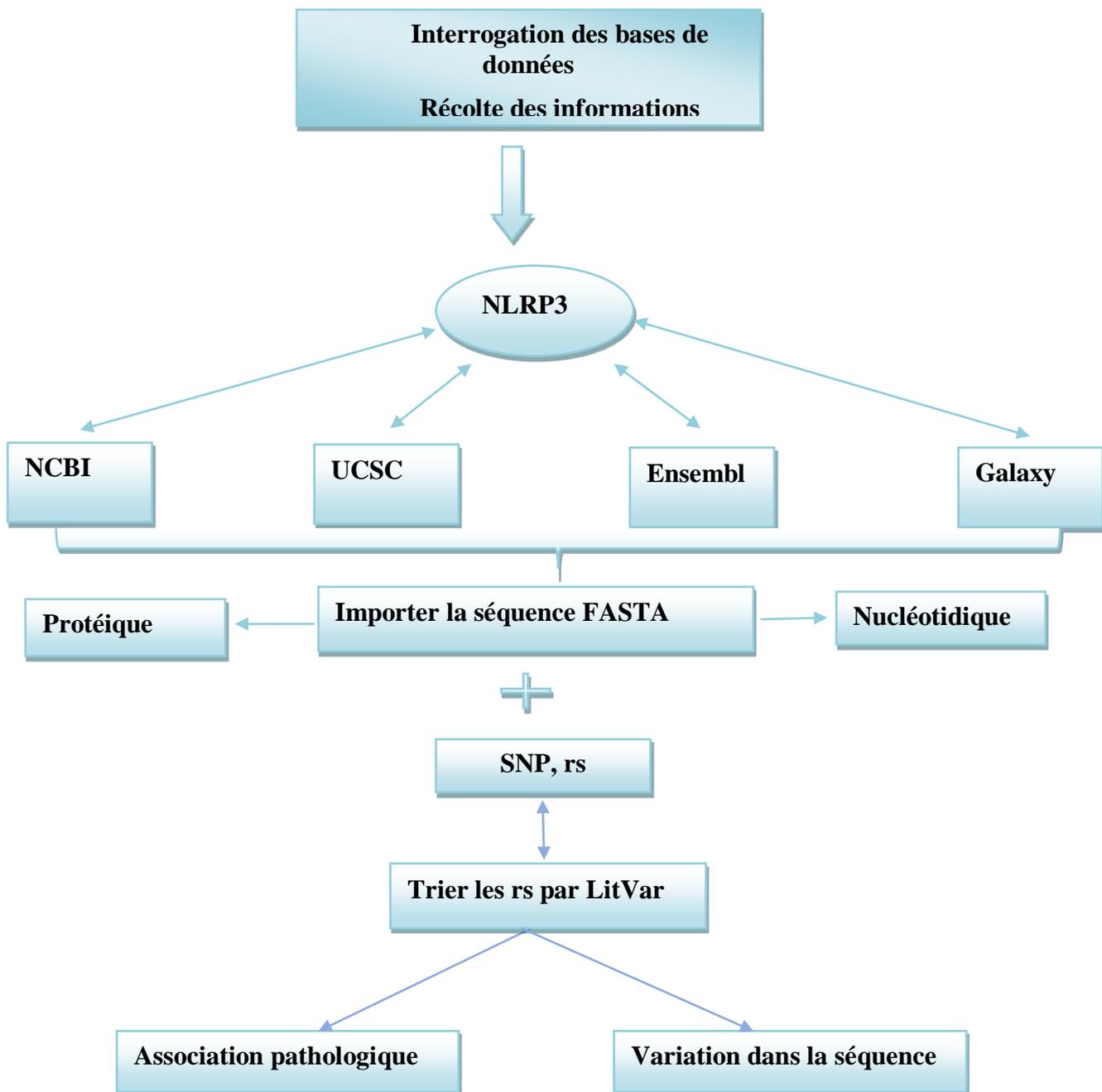


Figure 6 : Méthode de recherche des SNP du gène NLRP3.

2.2.1. Outils bio-informatiques

2.2.1.1. Outil NCBI

Principe : NCBI est le centre national de l'information biotechnologique. C'est aussi l'institut américain pour l'information biologique moléculaire. à partir de sources de données multiples, cette source de données nous permet d'initier la récolte d'information sur le gène « NLRP3 » (Furey., 2006).

Méthodes

Tous d'abord faut consulter le site (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et insérer le mot clé caractérisé par le symbole du gène « **NLRP3** », on s'assurant que le type d'information que l'on cherche est sur « **GENE** », puis et on appui sur « **search** » (figure.7).

La recherche nous donne une multitude d'ID et nom de gène avec différents espèces . et donc, on appuis sur le nom du gène de l'espèce homo sapiens (humain) (Figure 8). Une autre page s'ouvre, indiquant toutes les informations sur le gène NLRP3 avec les divers outils pour la suite des recherches.

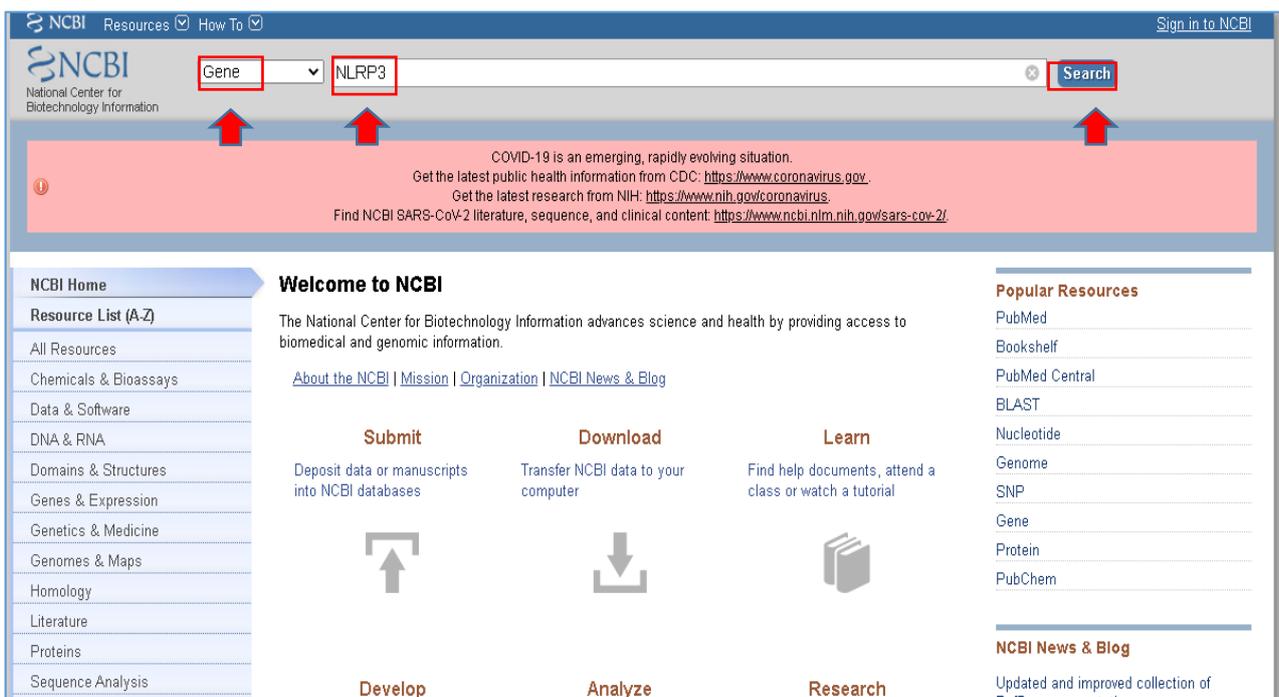


Figure 7 : Plateforme NCBI et recherche sur le gène

Résultats de recherche

Articles: 1 à 20 sur 768 << Premier <Précédent Page 1 sur 39 Suivant> Dernier >>

 Voir également 8 articles abandonnés ou remplacés.

Nom / ID de gène	La description	Emplacement	Alias	MIM
<input type="checkbox"/> <u>Nlrp3</u> ID: 216799	Famille NLR, domaine pyrine contenant 3 [<i>Mus musculus</i> (souris domestique)]	Chromosome 11, NC_000077.6 (59541569..59566955)	AGTAVPRL, AII / AVP, Cias1, FCAS, FCU, MWWS, Mmig1, NALP3, Pypaf1	
<input type="checkbox"/> <u>NLRP3</u> ID: 114548	Domaine pyrine de la famille NLR contenant 3 [<i>Homo sapiens</i> (humain)]	Chromosome 1, NC_000001.11 (247416163..247448823)	AGTAVPRL, AII, AVP, C1orf7, CIAS1, CLR1.1, DFNA34, FCAS, FCAS1, FCU, KEFH, MWWS, NALP3, PYPAF1	606416
<input type="checkbox"/> <u>Nlrp3</u> ID: 287362	Famille NLR, domaine pyrine contenant 3 [<i>Rattus norvegicus</i> (rat de Norvège)]	Chromosome 10, NC_005109.4 (45884324..45918290)	Cias1	

Figure 8 : Résultats de recherche et choix d'ID du gène selon l'espèce

2.2.1.2 Outil Ensemble genome browser

Principe : Le navigateur de génome d'Ensembl est un système bio-informatique d'annotation automatique de génomes. C'est un projet conjoint de l'Européen Bio-informatique Institute (EBI) et du « Welcome Trust Sanger Institute » (Furey., 2006). Il fournit une multitude de données génomiques librement disponibles et gratuitement accessibles pour les chercheurs en génétique, en génomique et en biologie moléculaire (<http://www.ensembl.org>)

Méthode

Tous d'abord on va vers plateforme ensembl <http://www.ensembl.org>. On retrouve une barre bleu claire ou on introduit le gène « **NLRP3** » et On choisit l'espèce « **homo sapiens** » (**figure 9**).

Une multitude de résultat nous apparaissent, on appuis sur « **NLRP3(Human Gene)** », ensuite une nouvelle page apparait qui donne un aperçu des informations disponibles au niveau du gène (**figure 10**), ainsi que le tableau de transcription qui montre chaque variante d'épissage d'un gène (les transcrits codant et non codant pour les protéines) et le résumé avec des liens vers des bases de données externes.

Par la suite, on se dirige vers « **sequence** » trouver en haut de « **Gene-based displays** » (**figure 11**). la séquence génomique du gène « **NLRP3** » apparait, on peut télécharger la

séquence en cliquant sur « **downlond sequence** » puis on appuis sur « **configure this page** » et on a fait les changement (**figure 12**).

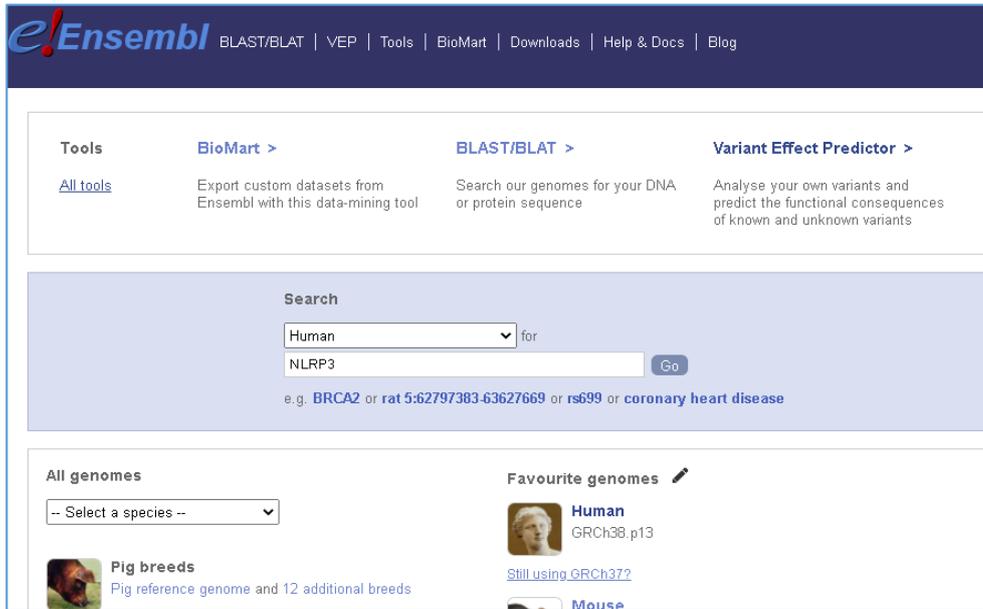


figure 9 : Plateforme Ensembl et lacement de la recherche sur le gène



Figure 10 : Choix de sélection du gène d'intérêt dans Ensembl



Figure 11 : accès aux séquences du gène

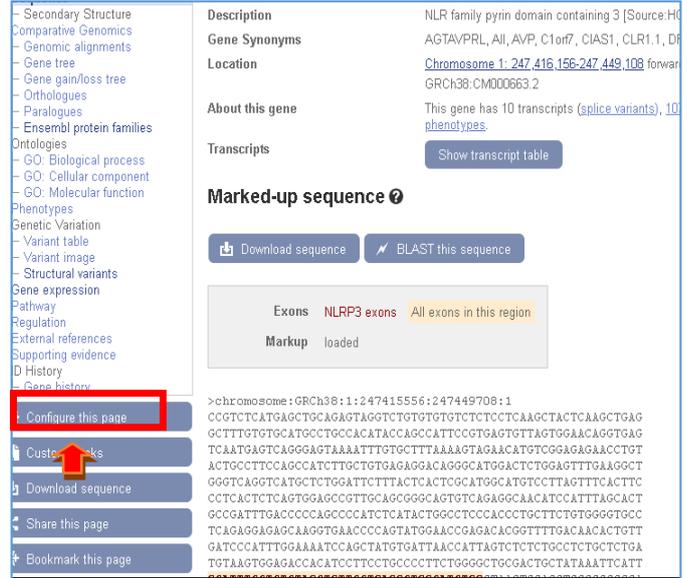


Figure 12 : accès à la configuration de la page de séquences du gène NLRP3

2.2.2.1 Outil UCSC

Principe : Le navigateur de génome d'UCSC est un navigateur de génome en ligne, gratuit et téléchargeable hébergé par l'Université de Californie à Santa Cruz (UCSC), son site fournit un outil graphique permettant de visualiser une région spécifique d'un génome et une collection de « pistes » d'annotations alignées ainsi qu'aux tables de la base de données MySQL sous-jacent aux annotations du navigateur de génome. Les deux navigateurs prennent en charge une fonctionnalité de suivi des annotations personnalisée qui permet aux utilisateurs de télécharger leurs propres données à des fins d'affichage et de comparaison (**Karolchik et al, 2010**).

Méthode

le site <https://genome.ucsc.edu> va nous guider directement vers la plateforme d'UCSC , ou on appuis sur « **Genome Browser** », ce qui va nous menez à une nouvelle page ou on met l'espèce « **homo sapiens** », l'assemblage humain « **dec.2013(GRCh38/hg38)** » et le nom du gène « **NLRP3** ». Par la suite une multitude de résultats apparaissent et on sélectionne la position du gène nous menant vers une nouvelle page, on va simplifier l'affichage en masquant toutes les pistes de donnée en appuyant sur « **hide all** », puis on activera les pistes suivantes en cliquant sur pack dans : **Common SNPs \ ALL SNPs \ Flagged SNPs pour variation**, et **Old UCSC genes \ UCSC all évents pour Gènes**. Puis on clique sur actualiser (refresh). Ensuite, on clique sur « **Tools** » et on tape sur « **table browser** » pour trier les « **rs** », puis « **output** », « **done with selections** » et « **send query to galaxy** » (**figure 13**).

The screenshot displays the UCSC Genome Browser interface. At the top, there are navigation menus for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, and Downloads. The main header reads "UCSC Genome Browser" with navigation controls (move <<< << < > >>>). Below this, the current position is shown as "chr1:247,416,156-247,449".

The interface is divided into several sections:

- Left Panel:** "Browse/Select Species" with a dropdown menu set to "Human Assembly" (Dec. 2013 (GRCh38/hg38)). Below this are "POPULAR SPECIES" and "REPRESENTED SPECIES" icons.
- Search Section:** "Find Position" with a "Position Search Term" field containing "MLRP3" and a "GO" button. Below it, "Human Assembly" and "UCSC Genome Browser - hg38 assembly" are selected.
- Genomic View:** A central track showing a genomic region with various annotations and a list of SNPs (rs IDs) such as rs72771992, rs139949057, rs10925615, etc.
- Table Browser:** A section below the genomic view with a title "Table Browser" and a description: "Use this program to retrieve the data associated with a track in text format, to calculate intersections between tracks, and to retrieve DNA sequence covered by a track." It includes dropdown menus for "clade" (Mammal), "genome" (Human), and "assembly" (Dec. 2013 (GRCh38/hg38)). Other options include "group" (Variation), "track" (Common SNPs(151)), and "table" (snp151Common).

Figure 13 : Recherche des SNP « rs » par l’outil UCSC

2.2.1.3 Outil Galaxy

Principe : Galaxy est une plate-forme Web open source pour la recherche biomédicale intensive en données. C’est de flux de travail scientifique, d’intégration de données, de persistance et de publication de données et d’analyses qui vise à rendre la biologie computationnelle accessible aux chercheurs qui n’ont pas d’expérience en programmation informatique.

Méthode

le site <https://usegalaxy.org/> va nous menez a la plateforme Galaxy , ou on trouvera le résultat de notre recherche sur UCSC dans « history » et cela on appuient sur « vieu data » qui est symbole par un œil. (figure 14)

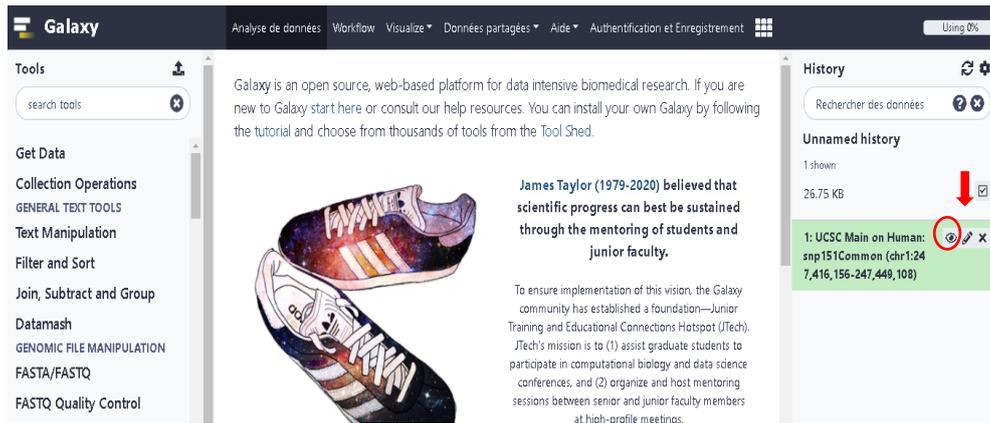


Figure 14 : Recherche des snp « rs » par plateforme Galaxy

2.2.1.4 outil DISGENET

Principe : DisGeNET est une plate-forme de découverte complète conçue pour répondre à diverses questions concernant le fondement génétique des maladies humaines. DisGeNET contient plus de 380 000 associations entre plus de 16 000 gènes et 13 000 maladies, ce qui en fait l'un des plus grands référentiels du genre. Il offre l'une des collections les plus complètes d'associations gène-maladie humaines et un ensemble précieux d'outils pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents aux maladies d'origine génétique, conçus pour répondre aux besoins de différents profils d'utilisateur, notamment les bioinformaticiens, les biologistes et les professionnels de la santé (Piñero et al ., 2015).

Méthode

Afin d'effectuer la recherche sur DISGENET, il suffit d'entrer au site <http://www.disgenet.org>. La plateforme DisGeNET s'ouvre et on introduit simplement le nom du gène « NLRP3 » (figure 15).



Figure 15 : Recherche de l'association gène maladie par la plateforme DISGENET

2.2.1.5. Outils LIT VAR

Principe

LIT VAR permet la recherche et la récupération d'informations pertinentes sur les variantes dans la littérature biomédicale et montre les relations biologiques clés entre une variante et ses entités proches (par exemple, les gènes, les maladies et les médicaments). Les résultats LitVar sont automatiquement extraits (avec des mises à jour régulières) de plus de 30 millions d'articles Pub Med ainsi que des articles en texte intégral applicables dans Pub Med Central.

Méthode

le site web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/#> nous permet d'accéder à la plateforme puis il suffit d'introduire le nom du gène dans la barre de recherche puis appuyer sur « entrée » (**figure 16**).



Figure 16 : Recherche par LiT VAR des associations polymorphiques

Résultats et Discussion

3. Résultats et discussion

Rappelons que notre étude est une étude in silico qui utilise des outils bio-informatique pour comprendre et étudier l'association du polymorphisme du gène NLRP3 dans le développement du diabète.

3.1. Résultats

3.1.1. Résultats de l'OUTIL NCBI

La plateforme NCBI nous a fourni le résultats d'annotation du gène NLRP3, ou on vois les 11 différents transcrits codant (en vert) dans la direction 5' UTR , ainsi que le transcrit non codant (en violet) .

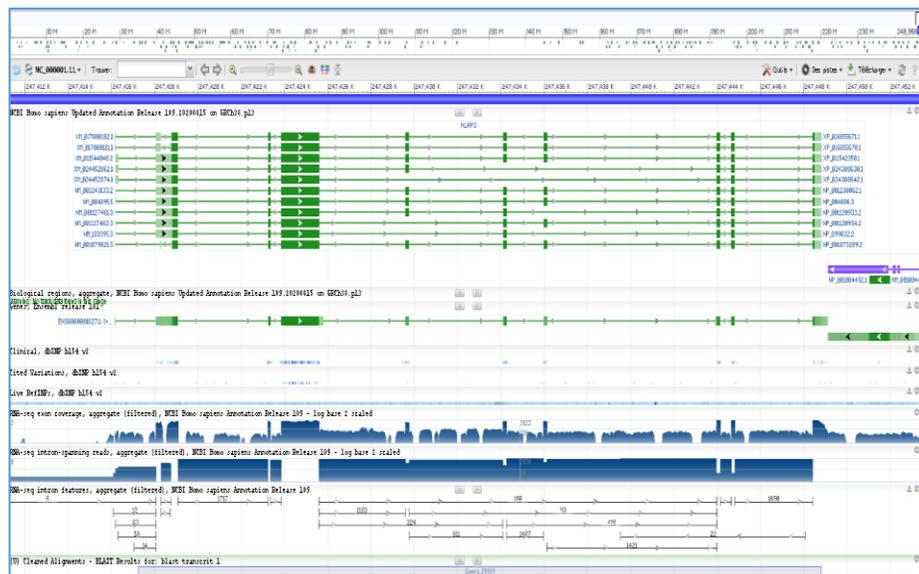


Figure 17: Résultats de l'outil NCBI du gène NLRP3

3.1.2. Résultats de l'outil Ensembl

Ensembl nous a fourni un tableau des différents transcrit indiquant leur noms, l'ID du transcrit, nombre de pair de bases, nombre d'acide aminé dans la protéine, la translation et le biotype (transcrit code pour une protéine ou pas) (**figure 18**).

Résultats Et Discussion

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Flags
NLRP3-204	ENST00000366497.6	4318	979aa	Protein coding	CCDS44346	Q96P20	-	TSL:1 GENCODE basic
NLRP3-205	ENST00000391827.3	4242	977aa	Protein coding	-	Q96P20	-	TSL:1 GENCODE basic
NLRP3-201	ENST00000336119.8	4187	1034aa	Protein coding	-	Q96P20	NM_001243133.2	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1 MANE Select v0.9
NLRP3-203	ENST00000366496.7	3995	977aa	Protein coding	-	Q96P20	-	TSL:1 GENCODE basic
NLRP3-206	ENST00000391828.8	3853	1034aa	Protein coding	-	Q96P20	-	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1
NLRP3-202	ENST00000348069.7	3824	920aa	Protein coding	-	Q96P20	-	TSL:1 GENCODE basic
NLRP3-210	ENST00000643234.2	3207	1014aa	Protein coding	-	Q96P20	-	GENCODE basic
NLRP3-207	ENST00000474792.2	2524	717aa	Protein coding	-	Q96P20	-	TSL:2 GENCODE basic
NLRP3-209	ENST00000642259.1	3630	672aa	Nonsense mediated decay	-	ADA2R8YEG7	-	CDS 5'incomplete
NLRP3-208	ENST00000532063.1	579	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:2

Figure 18 : Résultats des transcrits par Ensembl

Ensembl nous a fourni aussi la région en détail du gène NLRP3 par rapport aux autres gènes, au niveau du chromosome 1 ; ou il est marqué en vert (**figure 19**).

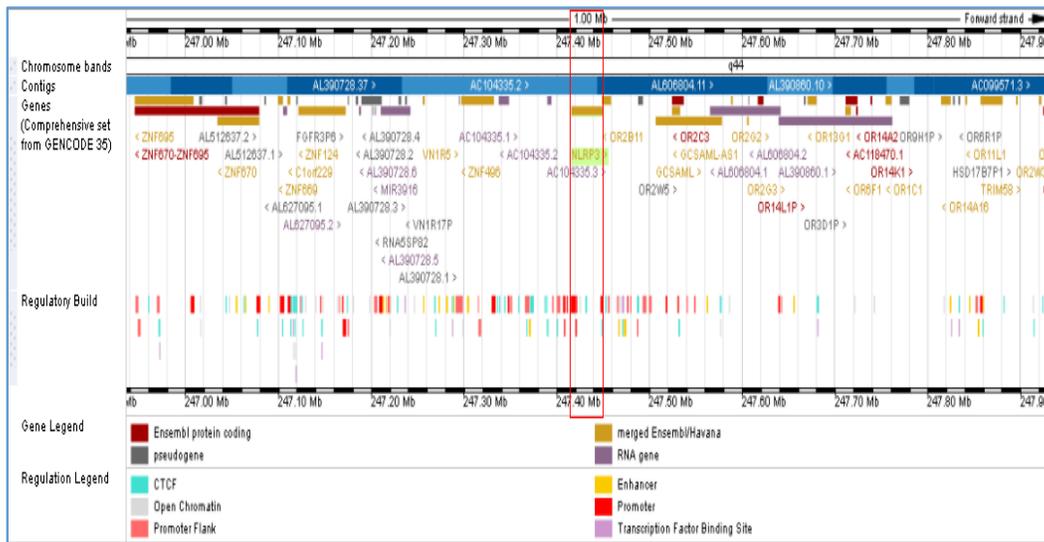


Figure 19: Résultats de la localisation du gène NLRP3 dans le chromosome 1

Cette plateforme nous a aussi fourni la séquence nucléotidique du gène NLRP3 avec un marquage des séquences variantes au niveau du gène par exemple les variations synonymes (celles dont la mutation ne mène pas au changement d'acide aminé) elles sont marquées en vert. Les mutations qui mènent à un codon stop sont marquées en rouge, les sites d'épissage en orange (variation non synonyme) (**Figure 20**).

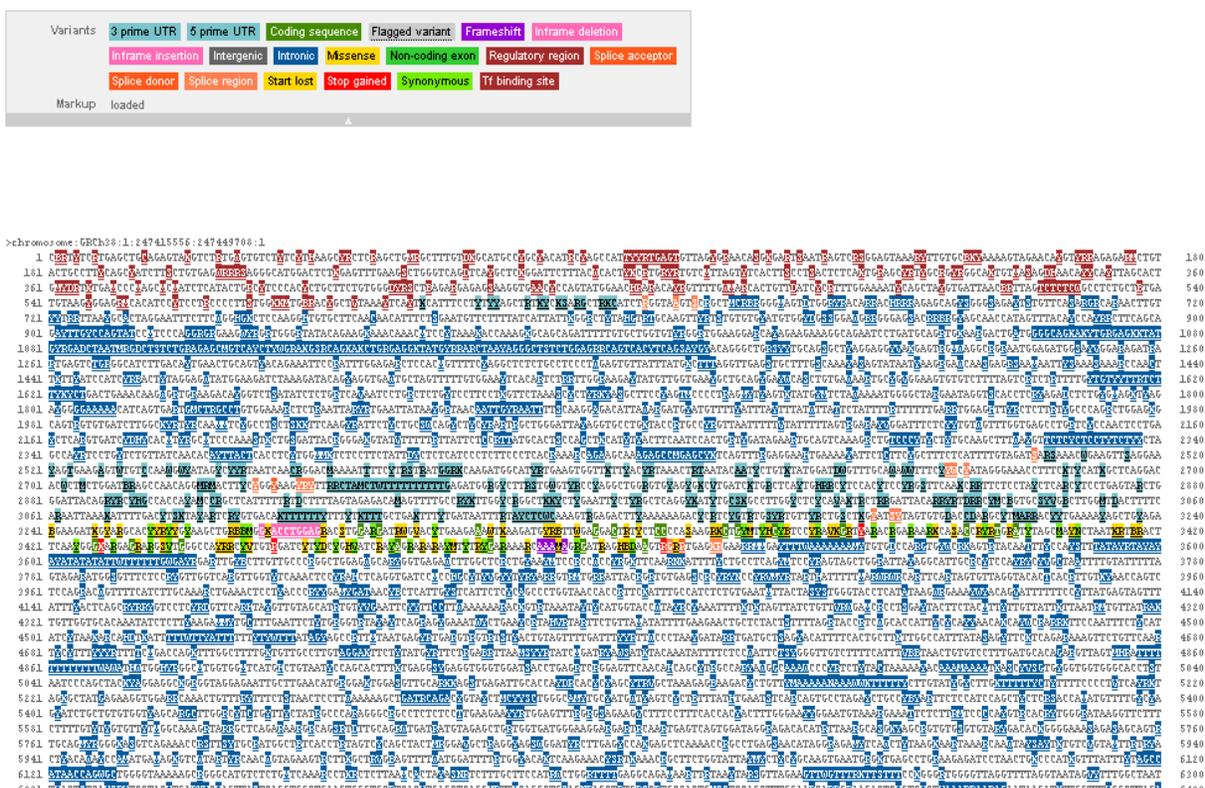


Figure 20: Localisation des polymorphisme snp « rs » sur la séquence nucléidique du gène NLRP3

3.1.3. Résultat de l’outil UCSC

La plateforme UCSC nous a fourni un très grand nombre de SNP avec leurs numéros à l’écran qui apparaissent montrant la diversité du polymorphisme du gène NLRP3, dont :

- les rouges sont des SNPs codants non synonymes
- les verts sont des SNPs codants synonymes
- les bleus sont les SNPs des régions d’épissage ou des régions non traduites
- les noirs représentent les SNPs des régions ironiques (**figure 21**).

Résultats Et Discussion

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
#bin	chrom	chromStart	chromEnd	name	score	strand	refNCBI	refUCSC	observed	molType	class	valid
2472	chr1	247416407	247416408	rs72553859	0	+	C	C	C/G/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247416420	247416421	rs73136261	0	+	G	G	A/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247416446	247416447	rs72553860	0	+	A	A	A/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247416605	247416606	rs12079994	0	+	G	G	A/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247416684	247416685	rs544600539	0	+	A	A	-/A	genomic	deletion	by-frequency,by-1000genom
2472	chr1	247417117	247417118	rs76945969	0	+	C	C	C/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247417265	247417266	rs4925648	0	+	C	C	C/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247417507	247417508	rs72553861	0	+	T	T	A/C/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247417906	247417907	rs12137901	0	+	T	T	C/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-2
2472	chr1	247418239	247418240	rs72771992	0	+	T	T	G/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247418569	247418570	rs138900557	0	+	G	G	A/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247418760	247418761	rs73136263	0	+	G	G	A/G/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419159	247419160	rs538100787	0	+	A	A	-/A	genomic	deletion	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419161	247419162	rs66778510	0	+	A	A	-/A	genomic	deletion	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419163	247419164	rs4998423	0	+	A	A	A/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-2
2472	chr1	247419163	247419164	rs199523445	0	+	A	A	-/A/ATA/TT	genomic	in-del	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419316	247419317	rs146216440	0	+	G	G	A/C/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419453	247419454	rs57801316	0	+	C	C	C/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419523	247419524	rs12139843	0	+	T	T	A/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419707	247419708	rs79796552	0	+	A	A	A/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419822	247419823	rs36008445	0	+	G	G	A/C/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247419918	247419919	rs7512998	0	+	C	C	C/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-2
2472	chr1	247420149	247420150	rs7537426	0	+	G	G	A/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-2
2472	chr1	247420328	247420329	rs113561330	0	+	G	G	C/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247420374	247420375	rs10925015	0	+	G	G	C/G/T	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-2
2472	chr1	247420411	247420411	rs375724510	0	+	-	-	-/T/TT	genomic	insertion	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247420755	247420755	rs72504922	0	+	-	-	-/C	genomic	insertion	by-cluster,by-frequency,by-1
2472	chr1	247420772	247420773	rs4925650	0	+	G	G	A/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-2
2472	chr1	247421288	247421289	rs12048215	0	+	A	A	A/G	genomic	single	by-cluster,by-frequency,by-1

Figure 22 : Résultats de recherche des SNPs dans UCSC

3.1.5. Résultats de l'outil DISGENET

DISGENET nous a donné un tableau qui représente toute les maladies qui peuvent êtres associer à chaque variante du gène NLRP3, par la suite nous avant filtrer les résultats obtenu pour avoir toute les association possible , des diffèrent rs du gène NLRP3 avec le diabète (**tableau III**).

Table III : Résultats de recherche de SNP associer au diabète

variant	maladie	score	Type d'association	original BD	preuve	PMID	Année PMID
rs12137901	diabète sucré non-insulino-dépendant	0.010	Genetic Variation	BEF REE	En conclusion, on propose que le polymorphisme de NLRP3 rs10754558 contribue au développement du DT2, mais que les variants rs7512998 et rs12137901 ne sont pas associés à une sensibilité à cette maladie	26782387	2015
rs7512998	diabète sucré non-insulino-dépendant	0.010	Genetic Variation	BEF REE	Nous avons mené une étude cas-témoins pour étudier le rôle de trois polymorphismes courants (rs10754558, rs7512998 et rs12137901) de la famille du gène NLR, domaine pyrine protéine 3 (NLRP3) dans le développement du diabète sucré de type 2 (T2DM).	26782387	2015
rs12048215	diabète sucré non-insulino-dépendant	0.010	Genetic Variation	BEF REE	Les polymorphismes rs2027432 et rs12048215 pourraient être utilisés comme estimations de risque pertinentes pour le développement de la	22112657	2011

Résultats Et Discussion

					septicémie et du syndrome MOD chez les patients présentant un traumatisme majeur, dans lequel rs2027432 pourrait être un SNP fonctionnel.		
rs35829419	diabète sucré insulino-dépendant	0.010	Genetic Variation	BEF REE	En revanche, nous n'avons trouvé aucune association de NLRP3 et rs35829419 et CARD8 rs2043211 avec le développement du DT1, de la MC ou des deux maladies ensemble	30915320	2019
rs10754558	diabète sucré insulino-dépendant	0.020	Genetic Variation	BEF REE	En conclusion, nous proposons que le polymorphisme NLRP3 rs10754558 contribue au développement du T2DM, mais que les variants rs7512998 et rs12137901 ne sont pas associés à une sensibilité à cette maladie.	26782387	2015

3.1.6. Résultats de l'outil LITVAR

LITVAR nous a fourni un ensemble d'information sur certains rs étudiés, ainsi que leur association au diabète. Après filtration des données ; montrent Just les variant associer au diabète. on entrant dans chaque variant (rs) en vois les autres maladies ou pathologies dont il peu etre

Résultats Et Discussion

associer le même rs , ainsi qu'une citation montrant ou il a été indiqué et le résultats de l'étude de l'association de la pathologie avec le variant (**figure 23**).

The screenshot displays the LitVar interface for the gene NLRP3. At the top, there is a search bar with 'NLRP3' entered and a 'DIABETE' filter. Below this is a table of variants:

Variant	Clinical Significance	MAF	Diseases	Publications
rs7512998 [rs7512998]	—	n/a	GOUT, DIABETES MELLITUS, TYPE 2, ARTHRITIS, GOUTY, STROKE, HYPERTENSION	11
rs12137901 [rs12137901]	—	n/a	191900, GOUT, ARTHRITIS, GOUTY, DIABETES MELLITUS, TYPE 2, CRYOPYRIN-ASSOCIATED PERIODIC SYNDROMES	4
rs1307114721 [c.125T>C]	—	n/a	METABOLIC DISEASES, OBESITY, DIABETES MELLITUS, TYPE 2, INFLAMMATION, PNEUMONIA	1

Below the table, there are three detailed views for the variants:

- rs7512998 (NLRP3):** Shows a 'Results by year' bar chart with data for 2015, 2016, 2017, and 2018. It lists co-occurring entities like Diabetes Mellitus, Type 2 and Stroke. Publications include 'Rs4612666 Polymorphism of the NLRP3 Gene Is Associated with the Occurrence of Large Artery Atherosclerotic Ischemic Strokes and Microembolic Signals' and 'Investigation into the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus'.
- rs12137901 (NLRP3):** Shows a 'Results by year' bar chart for 2015. It lists co-occurring entities like Diabetes Mellitus, Type 2. Publications include 'Investigation into the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus'.
- rs1307114721 (NLRP3):** Shows a 'Results by year' bar chart for 2015. It lists co-occurring entities like Sepsis, Inflammation, Diabetes Mellitus, Type 2, Metabolic Diseases, and Obesity. Publications include 'Caspase-12, but not caspase-11, inhibits obesity and insulin resistance'.

Figure 23 : résultats des SNP et leur association au diabète

3.2. Discussion

Dans l'évolution du diabète, les cellules β pancréatiques sont soumises à un Processus d'infiltration de cellules immunitaires qui ne sont pas sensé y être ainsi. L'infiltration par les lymphocytes T au niveau des ilots de Langerhans va conduire à un apoptose puis une insulite jusqu'a en arriver complications du Diabète (**Vasumathi et Klaus ,2014**).

Il a été rapporté que NLRP3 était impliqué dans la reconnaissance de plusieurs modèles moléculaires associés à des agents pathogènes, induisant l'assemblage d'inflammasomes, l'activation de la caspase-1 et la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β , ainsi que de jouer un rôle dans le résultat réponse immunitaire innée (**Gross et al., 2011**).

les résultats final Forni par GALAXY nous montre non seulement le nom de chaque SNPs du gène NLRP3 mais aussi sa localisation et type de mutation et en contribution avec les résultats précédant présenté par DISGENET et LIT VAR .

Ainsi l'analyse des différents subtilité d'association du polymorphisme du gène Nlrp3 avec la pathologie du diabète par les preuves donné par ses deux plateformes, il a été trouvé que seul le polymorphisme rs10754558 été associer au diabète de type 2 avec un score de 0.020 , suggérant que des mutations dans NLRP3 sont impliquées dans la sensibilité à cette maladie , mais que rs7512998 et rs12137901 ne le font pas (**Benetti et al., 2013**).

Il est bien connu que la résistance à l'insuline est le principal mécanisme conduisant au développement du DT2, et de nombreuses cytokines inflammatoires, comme l'IL-1 β , jouent un rôle important dans la perturbation de la signalisation de l'insuline (**Stienstra et al., 2010**).

Les différente preuve fourni par DISGENE à partir des différents études mène sur l'étude des différent polymorphisme du gène NLRP3 montre que le polymorphisme rs7512998 , rs 12137901 , rs 1307114721 , rs35829419 ,12048215 et rs2027432 ne sont pas associer au diabète (**Zhang et al., 2011**) . Cependant, le rs10754558 était significativement associé à une résistance à l'insuline et à un risque accru de DT2 (**Wang et al., 2015;Benetti et al., 2013**).

Et en effet, plusieurs études ont montré qu'il existe bien une association entre le polymorphisme rs10754558 et le développement du diabète puisque l'allèle G multiplie par 1,3 l'expression de NLRP3 par rapport à l'allèle C. Contrairement au autre variant, dont l'association n'est pas significative. Suggérant ainsi que le rs10754558 est impliquée dans la sensibilité à cette maladie. Il est bien connu que la résistance à l'insuline est le principal mécanisme conduisant au développement du DT2, et de nombreuses cytokines inflammatoires, comme l'IL-1 β , jouent un rôle important dans la perturbation de la signalisation de l'insuline.

3.3. discussion

In the development of diabetes, pancreatic β cells go through an infiltration process by immune cells that are not supposed to be so. Infiltration by T lymphocytes in the islets of Langerhans will lead to apoptosis and then insulinitis, leading to complications of Diabetes (**Vasumathi, Klaus ,2014**).

NLRP3 has been reported to be involved in the recognition of several molecular patterns associated with pathogens, inducing the assembly of inflammasomes, activation of caspase-1 and secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , as well as playing a role in the innate immune response outcome (**Gross et al., 2011**).

The final results Formed by GALAXY show us not only the name of each SNPs of the NLRP3 gene but also his location and type of mutation and in contribution with the previous results presented by DISGENET and LIT VAR.

Thus, the analysis of the different subtlety of association of the polymorphism of the Nlrp3 gene with the pathology of diabetes by the evidence given by its two platforms, it was found that only the rs10754558 polymorphism was associated with type 2 diabetes with a score of 0.020, suggesting that mutations in NLRP3 are involved in susceptibility to this disease, but that rs7512998 and rs12137901 do not (**Benetti et al., 2013**).

It is well known that insulin resistance is the primary mechanism leading to the development of DT2 and many inflammatory cytokines, such as IL-1 β , play an important role in disrupting insulin signaling (**Stienstra et al., 2010**).

The different evidence provided by DISGENE from the different studies conducted on the study of the different polymorphism of the NLRP3 gene shows that the polymorphism rs7512998, rs 12137901, rs 1307114721 and rs35829419 are not associated with diabetes but that the polymorphism rs 12048215 and rs2027432 could be used as relevant risk estimates for the development of sepsis and MOD syndrome in patients with major trauma, in which rs2027432 could be a functional SNP (Zhang et al., 2011) . and that, rs10754558 was associated with insulin resistance and an increased risk of DT2 (**Wang et al., 2015; Benetti et al., 2013**).

And indeed, several studies have shown that there is indeed an association between the rs10754558 polymorphism and the development of diabetes, unlike the other variant whose association is not significant. Stienstra et al., 2010 suggesting rs10754558 are involved in susceptibility to this disease. It is well known that insulin resistance is the primary mechanism leading to the development of DT2, and many inflammatory cytokines, such as IL-1 β , play an important role in disrupting insulin signaling.

Conclusion

Conclusion

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par un niveau de sucre trop élevé dans le sang et l'altération de la production d'insuline et Compte tenu des énormes effets négatifs du diabète sur la personne et la société, à la fois DT1 et DT2, due aux complication majeure de la maladie. L'inflammasome NLRP3 fournit une plateforme de signalisation, qui conduit a la production de puissante cytokines pro-inflammatoire ; tell qu'IL-1 β et IL-18 qui se sont avéré ayant un rôle dans la résistance à l'insuline et la progression du diabète.

Notre étude est faite sur le polymorphisme du gène NLRP3, celui-ci conduit a la formation de l'inflammasome NLRP3 dont ses produits semble être un élément déclencheur du diabète. notre objectif est d'étudier les différents variant du gène NLRP3 et leur association avec le diabète en utilisant des programme bio-informatique.

La recherche des mutations polymorphique du gène NLRP3 par l'utilisation des données des publications récolté dans les site bibliographique Pub Med et les différents outils bio-informatique nous a permet de trouver les différentes variantes du gène NLRP3 ainsi que s'eux qui sont susceptible d'être associer au diabète comme le rs12048215, rs35829419, rs2027432, rs10754558, rs 7512998 et rs 1307114721. Et après filtration des donnés récolté par DISGENET et LIT VAR, on est arrivée à la conclusion que seul le rs10754558 est significativement associer avec la résistance a l'insuline ; le principal mécanisme conduisant au développement du DT2 .et de nombreuses cytokines inflammatoires, comme l'IL-1 β , jouent un rôle important dans la perturbation de la signalisation de l'insuline.

Les études de polymorphisme génétique du gène NLRP3 sur des cohortes de patients appropriées pourraient aider à déterminer la signification fonctionnelle des données d'expression des protéines. D'où la nécessité d'études supplémentaire ; Tell que l'étude de la protéinique de ce variant pathogène ainsi que les différentes interactions qu'elle peut avoir cette protéine avec le diabète et même avec d'autre pathologie. Enfin, l'identification d'outils pharmacologiques sélectifs et de nouvelles thérapies potentielles capables d'affecter l'expression et / ou l'activité de cette nouvelle voie et enfin mettre à jour des traitements potentielle de cette pathologie.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abderrazak, A., De, R., Ierre, L. U. N. P., & Arie, E. T. M. (2017). *Rôle de l' inflammasome NLRP3 dans l' athérosclérose et le diabète de type 2* Anna Abderrazak To cite this version : HAL Id : tel-01630298.
- Benetti, E., Chiazza, F., Patel, N. S. A., & Collino, M. (2013). The NLRP3 inflammasome as a novel player of the intercellular crosstalk in metabolic disorders. *Mediators of Inflammation*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/678627>
- Christgen, S., Place, D. E., & Kanneganti, T. D. (2020). Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. In *Cell Research* (Vol. 30, Issue 4, pp. 315–327). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0295-8>
- De Meeûs, T., & De Meeûs, T. (2017). 1. Qu'est-ce qu'un marqueur génétique ? In *Initiation à la génétique des populations naturelles* (pp. 19–28). IRD Éditions. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9301>
- Ding, S., Xu, S., Ma, Y., Liu, G., Jang, H., & Fang, J. (2019). Modulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasomes in diabetes. In *Biomolecules* (Vol. 9, Issue 12, p. 850). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom9120850>
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Klen, J., Goričar, K., Janež, A., & Dolžan, V. (2015). NLRP3 inflammasome polymorphism and macrovascular complications in type 2 diabetes patients. *Journal of Diabetes Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/616747>
- Paramel, G. V., Sirsjö, A., & Fransén, K. (2015). Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/846782>
- Ribeiro, F., Leite, J. A., Pereira, C., Tostes, R., Carlos, D., Rc Costa, F., Leite, J. A., André, C. A., Tostes, R. C., Carneiro, F. S., Camara, N. O., & Silva, J. S. (2017). NLRP3 Inflammasome: Pathogenesis and potential therapeutic strategies in Type 1 Diabetes Design and Synthesis of New Quinolone derivatives: searching for TcGAPDH inhibitors with trypanocidal activity

View project Male erectile dysfunction View project NLRP3 Inflammasome: From Pathogenesis to Therapeutic Strategies in Type 1 Diabetes. In *Type 1 Diabetes. J Autoimmune Disord* (Vol. 3). <http://www.imedpub.com/>

Tai, N., Wong, F. S., & Wen, L. (2016). The role of the innate immune system in destruction of pancreatic beta cells in NOD mice and humans with type I diabetes. In *Journal of Autoimmunity* (Vol. 71, pp. 26–34). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.03.006>

Tezcan, G., Martynova, E. V., Gilazieva, Z. E., McIntyre, A., Rizvanov, A. A., & Khaiboullina, S. F. (2019). MicroRNA post-transcriptional regulation of the NLRP3 inflammasome in immunopathologies. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 10, Issue MAY, p. 451). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00451>

Wang, S., Fang, F., Jin, W., Wang, X., & Zheng, X. (2015). Investigation into the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Genetics and Molecular Research, 14*(4), 17447–17452. <https://doi.org/10.4238/2015.December.21.15>

Zhang, A. Q., Zeng, L., Gu, W., Zhang, L. Y., Zhou, J., Jiang, D. po, Du, D. Y., Hu, P., Yang, C., Yan, J., Wang, H. Y., & Jiang, J. X. (2011). Clinical relevance of single nucleotide polymorphisms within the entire NLRP3 gene in patients with major blunt trauma. *Critical Care, 15*(6), R280. <https://doi.org/10.1186/cc10564>.

les sites utiliser :

<http://dictionnaire.sensagent.leparisien.fr/G%C3%A8ne/fr-fr/>.

https://www.disgenet.org/browser/1/1/2/114548/50/25/source__ALL/_b/

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

<https://genome.ucsc.edu>.

<https://usegalaxy.org/>.

<http://www.ensembl.org>.

<http://www.disgenet.org>.

Références Bibliographiques

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/#>.