

Les différentes techniques d'études associées au diabète

Le diabète NID, cette pathologie touchant l'ensemble du métabolisme à travers une perturbation majeure de la composition du milieu intérieur de celui ci, exagérément riche en glucose, est d'une importance majeure dans le staff médical. L'étude de cette maladie mobilise donc un ensemble de techniques très étendues, permettant la recherche d'une compréhension des phénomènes observés à l'échelon moléculaire, cellulaire, organique et enfin pour l'organisme entier.

C'est pourquoi on utilise à la fois des techniques de biologie moléculaire et cellulaire et des modèles animaux apportant des renseignements précieux sur l'interconnexion plurimétabolique et la généralisation des modifications pathologiques provoquées par l'état diabétique qui ne peuvent être approchées de façon trop réductionniste. Plusieurs modèles animaux ont été mis au point, aucun ne reproduisant exactement l'intégralité des dysfonctionnements observés chez l'être humain, mais chacun permettant l'exploration de certaines conséquences de la maladie.

L'étendue des techniques employées ne permet pas l'exhaustivité, c'est pourquoi nous présenterons simplement le principe de la réalisation de la plupart de ces protocoles à l'aide de quelques exemples particulièrement adaptés à l'étude du diabète NID.

TECHNIQUES D'IMAGERIE

Histologie en microscopie optique:

L'évolution des différents parenchymes pancréatiques est suivie par des techniques histologiques classiques et par immunohistochimie.

Les prélèvements sont fixés dans une solution de Bouin ordinaire qui a l'avantage de bien conserver l'antigénicité et d'entraîner un effet de rétraction des tissus d'uniquement 10 %. Cette solution est composée de :

- acide picrique	75 ml
- formol commercial à 36-40 %	25 ml
- acide acétique (ajouté extemporanément)	5 ml

La durée de fixation est de 24 heures. Elle est suivie d'une déshydratation dans des bains d'alcool de concentration croissante (70-95-100 %), d'une clarification dans le toluène, d'une imprégnation et d'une inclusion dans le paraplast-plus (point de fusion: 55-57 °C). Des coupes d'épaisseur 4-5 µm réalisées à l'aide d'un microtome, sont fixées sur lame de verre enduite de colle à bois diluée au 1/10 ° puis colorées.

• Coloration de Masson:

Cette technique de coloration trichromique permet de mettre en évidence:

- les noyaux en brun par l'hémalum de Mayer
- les cytoplasmes en rose par le mélange fuchsine-ponceau xylydine
- les collagènes de façon élective, sans différenciation du type, en bleu franc par le bleu d'aniline.

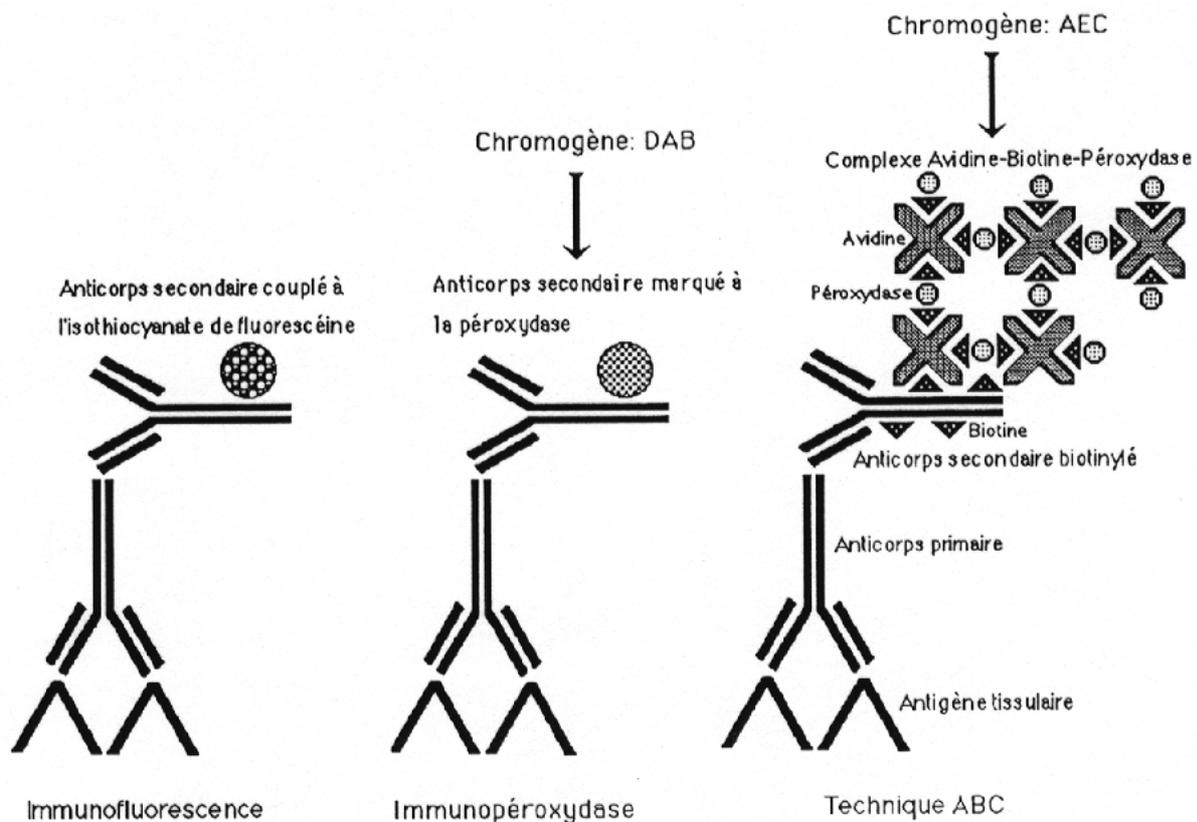
- Coloration à la fuchsine-paraldehyde (PAF = Gomori):

Cette technique histologique colore les granulations argentaffines, notamment des cellules B des îlots de Langerhans, en violet intense.

- Coloration au rouge CONGO alcalin:

Le principe de cette coloration est basé sur l'affinité du rouge CONGO ($C_{32}H_{22}Na_2O_6S_2$) avec la configuration orientée, linéaire, de type feuillet β plissé de la **substance amyloïde**. La méthode utilisée est celle au rouge CONGO alcalin. La substance amyloïde apparaît en rouge à l'observation en lumière blanche. Elle présente une forte biréfringence verte en lumière polarisée, accentuée par rapport à la biréfringence naturelle de l'amyloïde.

Immunohistochimie



Comparatif des différentes étapes concernant l'immunofluorescence, l'immunopéroxydase et la technique Avidine Biotine peroxydase Complexe.

Marquage des collagènes I, III et IV par immunofluorescence:

Les collagènes sont suivis par immunofluorescence sur coupes en congélation. Les fragments de pancréas prélevés sont placés dans des cupules contenant un gel, immédiatement congelés dans l'azote liquide et stockés à $-80^{\circ}C$. Les coupes d'épaisseur $6\mu m$ réalisées au cryocut sont passées 10 minutes dans un bain d'acétone, séchées, cerclées au PAP pen, puis incubées en chambre humide, 30 minutes à température ambiante, soit avec du tampon PBS à pH 7,4 (contrôle négatif), soit avec l'anticorps primaire anti-collagène humain

- . **Collagène I** : immunosérum fait chez la chèvre,
- . **Collagène III** : immunosérum fait chez le cobaye
- . **Collagène IV** : immunosérum fait chez la chèvre)

Après lavage dans le tampon PBS, les lames sont incubées 30 minutes avec l'anticorps secondaire anti Ig G (H+L) couplé à la fluoresceine:

. anti-chèvre, ou anti-cobaye, puis rincées au tampon PBS et montées au fluoprep. L'observation est effectuée sur un microscope à fluorescence.

Marquage des cellules pancréatiques A, B et D et du composant-P amyloïde par immunohistochimie (technique Avidine Biotine peroxydase Complexe):

Les coupes de pancréas fixées au Bouin sont immunocolorées par la technique ABC (Avidine Biotine peroxydase Complexe).

Quatre coupes sériées, déparaffinées, hydratées dans des alcools de concentration décroissante (100 - 95 - 70) sont traitées quelques secondes au carbonate de lithium, puis au peroxyde d'hydrogène à 3 % pour bloquer l'activité des peroxydases endogènes. Les coupes sont cerclées au PAP pen. Les liaisons non spécifiques à l'anticorps sont réduites par un agent protéique bloquant. Les lames sont ensuite incubées séquentiellement soit avec un anticorps primaire commercial anti-insuline monoclonal (spécifique de l'**insuline biologiquement active**), ou anti-**glucagon** ou anti-**somatostatine** ou **composant-P amyloïde (AP)** polyclonaux, soit avec du tampon PBS - pH 7,4 à 25°C (contrôle négatif de l'anticorps), soit avec un réactif Kappa/Lambda (contrôle positif de la méthode), puis dans tous les cas avec un deuxième anticorps biotinylé polyvalent pendant 30 minutes et par le complexe avidine/biotine peroxydase (réactif universel lié à l'avidine) pendant 30 minutes. Le complexe est révélé par un chromogène fraîchement préparé (3-amino-9-éthylcarbazole supplémenté par le substrat peroxyde d'hydrogène à 3 %: AEC) pendant 15 minutes, donnant une coloration rouge. Les lames sont contrecolorées à l'hématoxyline (coloration nucléaire) pendant 2 minutes, montées en utilisant un gel aqueux permanent et observées avec un microscope photonique .

Marquage du peptide-c (proinsuline) par immunopéroxydase:

Des coupes issues des mêmes blocs que précédemment sont immunomarquées selon la technique indirecte de marquage en deux temps pour mettre en évidence le peptide-c et la proinsuline.

Après déparaffinage et blocage des peroxydases endogènes au peroxyde d'hydrogène à 0,3 % pendant 30 minutes, les coupes sont rincées au tampon TRIS-HCl 0,05 M à pH 7,6 (3 fois 5 minutes) et cerclées au PAP pen . Le **blocage du bruit de fond** est effectué par du sérum de chèvre normal pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire polyclonal anti-**peptide-c** de rat fait chez le lapin, rincées au tampon TRIS (2 fois 5 minutes), puis à nouveau incubées avec l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase: sérum anti-lapin fait chez la chèvre. Après rinçage au tampon TRIS (3 fois 5 minutes), les coupes sont révélées au 3, 3' diamino benzidine tétrahydrochloride (DAB). Une légère coloration nucléaire est réalisée à l'hématoxyline de Harris. Après déshydratation, les lames sont montées à l'eukitt et observées au microscope photonique .

Analyse morphométrique:

Ces méthodes, révolutionnées et fiabilisées par les moyens modernes de traitement d'image, permettent une quantification des observations histologiques à la fois au niveau cellulaire et extracellulaire.

Le système d'analyse d'image vidéo utilisé comprend des microstations d'imagerie

organisées autour d'un micro-ordinateur.

La caméra permet d'acquérir l'image sous forme d'un signal vidéo obtenu par éclairage (banc optique ou microscope) d'un spécimen ou dans notre cas d'une lame histologique à analyser. Le moniteur couleur d'image vidéo sert à la visualisation en temps réel des résultats des opérations effectuées sur l'image. Le logiciel que nous avons utilisé autorise l'acquisition, les opérations (traitement) et l'édition des images.

Le système d'analyse d'images a été étalonné à l'aide d'une lame micrométrique graduée en mm, afin d'obtenir des mesures de surfaces en μm^2 : surfaces nucléaires (SN) et surfaces cytoplasmiques (SC). Toutes ces mesures ont été réalisées avec le même objectif microscopique (objectif à immersion).

Si l'on choisit un intervalle de confiance de 95 %, en acceptant donc 5 % de marge d'erreur, le nombre de cellules à mesurer déterminé à l'aide d'un logiciel a toujours donné un nombre inférieur mais proche de 20.

Au préalable, nous avons effectué un certain nombre de mesures sur différents échantillons. La plus petite et la plus grande surface rencontrées nous ont permis de définir les limites inférieure et supérieure des classes. L'intervalle entre ces extrêmes a été divisé en un nombre de classes égales, nombre maximum accepté par l'appareil afin d'obtenir une courbe presque point par point.

Après avoir étalonné l'appareil à l'aide de la lame micrométrique, il est nécessaire d'effectuer une vérification de l'étalonnage: on s'assure que 1 mm sur le micromètre correspond bien à 100 μm sur la lame histologique. Il suffit d'introduire sur le champ d'instruction du morphomètre la limite inférieure (1000), la largeur de classe (2000) et le nombre de classes (9). L'analyseur d'images est alors prêt pour les mesures.

A partir d'une image couleur numérisée et parfois transformée en niveau de gris (entre 0 et 255), il est possible de faire les mesures. Cependant, celles-ci ne peuvent pas être réalisées sur les images brutes qui sont souvent bruitées. On a donc recours au traitement de l'image pour en améliorer sa qualité et en extraire les éléments pertinents. La réduction du bruit est le lissage. Chaque lame est parcourue de gauche à droite et de haut en bas. La première cellule est lue: la lecture se fait dans le sens des aiguilles d'une montre, le tour complet étant achevé au "bip" de l'appareil. L'évaluation des surfaces SN et SC des cellules pancréatiques A, B et D est effectuée sur 20 cellules choisies au hasard sur la coupe et à partir de 3 lames par pancréas. La distribution des cellules A, B et D est estimée par champ visuel au grossissement x 120 sur une coupe entière. Seules les cellules présentant un noyau bien visible sont prises en compte à partir de 5 lames par pancréas.

L'image obtenue à partir de la lame histologique observée à l'objectif 10 (x 120) nous permet alors d'évaluer la surface occupée par le tissu conjonctif par rapport à la surface totale pancréatique. Les mesures sont exprimées en %.

Microscopie électronique:

De petites pièces de tissu (1 mm^2), subissent les étapes classiques suivantes:

- Fixation pendant 1 heure dans du tampon cacodylate 0,1 M froid contenant 2 % de glutaraldéhyde (pH 7,4)

- Post-fixation pendant 1 heure dans du tétroxyde d'osmium (1 %) à 4 °C
- Rinçage des pièces dans le tampon cacodylate
- Déshydratation par des bains d'alcool de concentration croissante
- Inclusion en gélules dans de l'épon 812 durci au durcopan ASM
- Coupes à l'ultramicrotome
- Contrastes par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb
- Observation des coupes fines réalisées au microscope électronique

Hybridation *in situ*

Elle est réalisée sur des coupes tissulaires de pancréas doublement fixées: par l'acétone puis par le formaldéhyde à 4%. Le bruit de fond, c'est-à-dire le marquage non spécifique, sera atténué par acétylation.

L'hybridation va se dérouler en 2 étapes : l'hybridation proprement dite et les lavages. Préalablement, il est nécessaire de préparer la sonde correspondant à une séquence nucléique complémentaire de l'ARN recherché sur laquelle sera fixé un complexe biotine d'UTP, marqueur détectable par immunohistochimie.

L'hybridation doit être réalisée dans les meilleures conditions expérimentales pour permettre l'appariement des brins complémentaires entre l'ARN de la sonde et l'ARNm à caractériser. La difficulté est d'optimiser la durée d'hybridation, la température et la quantité de sonde diluée dans le milieu d'hybridation.

Les lavages permettent d'éliminer les molécules de sonde faiblement fixées sur l'échantillon en fonction de la température et de la force ionique du milieu de lavage. On peut utiliser pour cela une solution 4xSSC (Standard Saline Citrate).

La révélation des hybrides sera effectuée par un chromogène sur une préparation SPA (Streptavidine Phosphatase Alcaline). Cette méthode met en évidence la localisation des différents peptides pancréatiques.

TECHNIQUES DE DOSAGE

• Enzymatique: exemple de la glycémie:

Elle est dosée à partir de 5 µl de plasma selon la méthode glucose GOD-PAP qui est une technique **colorimétrique enzymatique** basée sur le principe suivant:



La formation du peroxyde d'hydrogène est proportionnelle à la concentration en glucose présent dans le milieu ce qui permet un dosage colorimétrique évalué à 510 nm. Les résultats sont exprimés en mmol/l.

• Radioimmunologique: exemple du dosage de l'insulinémie, de la glucagonémie et de la c-peptidémie

L'insuline plasmatique et de la réserve pancréatique sont évaluées.

Le principe de ce dosage repose sur la **compétition entre l'insuline marquée à l'iode 125 et l'insuline contenue dans les standards de la gamme étalon** à raison de 0

- 5 - 10 - 25 - 50 - 100 et 200 $\mu\text{U/ml}$ ou les échantillons à mesurer, vis-à-vis d'un nombre donné et limité de sites anticorps anti-insuline porcine. A la fin de la période d'incubation, **la quantité d'insuline marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'insuline non marquée présente dans l'essai**. La méthodologie proposée pour la séparation des fractions libre et liée utilise un réactif immunoprécipitant dans lequel un deuxième anticorps se trouve pré-précipité et en excès. Après centrifugation à 3200 tours/minute pendant 15 mn à 4°C, le surnageant est éliminé par aspiration à la trompe à vide. La radioactivité du culot est mesurée à l'aide d'un compteur qui grâce à un programme informatique donne directement la dose d'insuline en $\mu\text{U/ml}$ (sensibilité du dosage: $2,50 \pm 0,27 \mu\text{U/ml}$). Sachant que $10 \mu\text{U} = 69 \text{ pmol/l}$, les résultats seront aussi exprimés en $\mu\text{g/pancréas total}$ au niveau de la réserve pancréatique.

C-peptidémie:

L'insuline et le peptide-c étant sécrétés en quantité équimolaire, le dosage de la c-peptidémie permet une estimation de la production d'insuline endogène et peut être un élément intéressant pour confirmer un diabète non-insulino dépendant.

Le principe du dosage repose sur la compétition entre le peptide-c marqué à l'iode 125 et le peptide-c contenu dans les standards (0 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 et 5 pmol/l) ou les échantillons à mesurer, vis-à-vis d'un nombre donné et limité de sites anticorps anti-peptide-c. Les résultats sont exprimés en pmol/ml ou nmol/l (sensibilité du dosage: $0,05 \pm 0,01 \text{ pmol/ml}$). Sachant que $1 \text{ pmol} = 3 \text{ ng}$, ils seront aussi exprimés en $\mu\text{g/pancréas}$ au niveau de la réserve pancréatique.

Glucagonémie:

Le glucagon plasmatique et de la réserve hormonale sont évalués. Le principe repose sur la compétition entre le glucagon marqué à l'iode 125 et le glucagon contenu dans les standards (1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 63 - 125 et 250 $\text{fmol/100 } \mu\text{l}$) ou les échantillons à mesurer, vis-à-vis d'un nombre donné et limité de sites anticorps anti-glucagon (immunsérum GAN à une dilution de 1/15000 et spécifique de la partie C-terminale du glucagon. Les résultats sont exprimés en $\text{fmol/100 } \mu\text{l}$ (sensibilité du dosage: $0,7 \text{ fmol/500 } \mu\text{l}$). Sachant que $75 \mu\text{g} = 25 \text{ pmol/l}$, ils seront aussi exprimés en $\mu\text{g/pancréas}$ au niveau de la réserve pancréatique.

• Quantification du collagène: dosage de l'hydroxyproline:

Le principe de ce dosage repose sur une réaction colorimétrique réalisée sur des échantillons de pancréas (1 g) déshydratés et délipidés. Après hydrolyse acide (500 μl d'HCl 6N, 24 heures, à 110°C), les acides aminés sont libérés par rupture des liaisons peptidiques. L'évaporation de l'acide est effectuée au dessiccateur, l'extrait étant repris par 4 ml d'eau distillée. L'oxydation douce de l'hydroxyproline par la chloramine T conduit à la production de dérivés pyrroliques qui donnent avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde, en milieu acide, une coloration rose évaluée spectrophotométriquement à 558 nanomètres.

Le dosage est effectué en double sur chaque échantillon.

L'hydroxyproline représentant 13 % des acides aminés totaux du collagène, un facteur multiplicatif de 7,5 est utilisé pour obtenir la quantité de collagène de chaque fraction étudiée

La concentration en collagène du tissu sec permet d'apprécier le collagène total, présent dans l'échantillon de départ, avant l'extraction. Le collagène contenu dans chaque fraction permet d'apprécier le pourcentage par rapport à ce collagène total.

• **Réserves pancréatiques hormonales:**

Le pancréas est prélevé dans sa totalité pour évaluer les réserves en insuline, peptide-c et glucagon. Il est pesé puis dilacéré aux ciseaux et plongé dans 10 ml d'un mélange acide/alcool (250 ml alcool absolu, 5 ml HCl fumant, 78 ml eau distillée) additionné d'iniprol (antiprotéases pour conserver les hormones). Il est ensuite broyé à 4°C par un appareil Ultra-Turrax (10 000 rpm pendant 2 minutes) et homogénéisé au Potter de Thomas (10 coups de 20 secondes chacun). Après 4 jours d'attente à 4°C, le broyat est centrifugé (5 000 tours pendant 15 minutes). Le surnageant est prélevé et conservé à 4°C jusqu'au moment des dosages hormonaux. Il est alors dilué au 1/5 000 par du tampon phosphate PBS à pH 7,4. La quantité d'hormone par pancréas sera donnée par la formule:

dose x dilution x (poids pancréas (g) + quantité de solvant (ml)) et exprimée en µg/pancréas total.

PERFUSION

Après anesthésie de l'animal, le pancréas est isolé avec le duodénum proximal et séparé de la rate et de l'estomac. Ce bloc entéro-pancréatique est placé dans un incubateur et perfusé à travers les artères coéliquales et mésentériques à l'aide d'une canule insérée dans l'aorte, à une température constante de 37°C. Le perfusé, diffusé à vitesse constante par une pompe péristaltique, est un tampon bicarbonate Krebs./Ringer. Dans certaines expériences, il est supplémenté en glucose ou en glucose et théophylline. Le perfusé est continuellement aéré par un mélange O₂/CO₂, à un pH final de 7,4.

Des substances stimulantes sont testées, telles que la L arginine, la L leucine, l' isocaproate, le glucose, le mannose, le glycéraldéhyde, la tolbutamide, l'isoprotérénol et l'acétyl méthylcholine bromide. L'effluent est collecté dans la veine porte par une canule à intervalle régulier dans des tubes refroidis et stockés à - 20°C. On analyse ensuite les taux de glucose et d'insuline, par exemple, contenus dans chaque fraction collectée.

Utilisation d'un champ constant ("clamp")

Il s'agit de maintenir constante une grandeur en adaptant une perfusion de l'organisme ou d'un organe. On peut par exemple réaliser un champ euglycémique en provoquant une hyperinsulinémie, après absorption (ou injection) d'une quantité connue de glucose. Cette technique fournit de précises indications sur la sensibilité des tissus à l'insuline.

TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE: exemple de l'étude des substances amyloïdes

Le pancréas du modèle expérimental est prélevé directement *post-mortem* et immédiatement congelé à - 70°C. De petits fragments de ce tissu sont aussi fixés dans du formol à 10 % et inclus dans la paraffine.

• **Méthode au cDNA pour analyser la séquence peptidique:**

Les méthodes au recombinant cDNA ont été appliquées. Le RNA total (utilisé à la fois dans la synthèse du cDNA et dans l'hybridation-northern blot) est préparé à partir du

pancréas par les méthodes CILi/urée et isothiocyanate de guanidine suivies d'une chromatographie d'oligo (dT)-cellulose sur colonnes. Le RNA apparaît être intact à en juger par l'électrophorèse sur gel d'agarose et par la coloration au bromide d'éthidium. Les primers d'oligonucléotides utilisés dans la réaction polymérase en chaîne (PCR) sont

5' ATTCGAGAATTCTGCAACAC(G/T)GCCAC(G/A)TGTGC et

5' ATTCGAGGATCC(G/A)TA(C/T)GT(G/A)TT(C/G)GATCCCAC

(les positions redondantes sont entre parenthèses), correspondant aux positions 1-7 et 32-37, respectivement, dans la séquence en acides aminés de l'IAPP humain. Pour la synthèse du premier brin du cDNA, un kit de synthèse cDNA est utilisé suivant le protocole donné. Approximativement 20 ng du CDNA résultant sont utilisés avec 120 pmol de chaque primer d'oligonucléotides dans la réaction PCR (30 cycles d'amplification à 60°C, élongation à 72°C et dénaturation à 95°C). La migration du produit amplifié est réalisée sur gel d'agarose-TBE à 3 % révélant une bande unique de taille attendue (134 nucléotides). Ce fragment est purifié par isotachophorèse. Dans cette technique le mélange ionique à séparer constitue l'électrolyte chargé de conduire le courant, il n'y a donc pas de tampon. A l'équilibre dans une zone donnée, plus la concentration d'ion est élevée plus sa mobilité sera élevée et plus la zone sera étalée plus l'ion sera en quantité importante. Une fois établies, les zones migrent toutes à la même vitesse. Puis le fragment est scindé par une kinase, sous-cloné par des vecteurs séquentiels M13 et séquencé. L'analyse en northern blot est effectuée selon un protocole standard.

• Synthèse de fibrilles:

Le peptide correspondant à la position 20-29 de la molécule IAPP est élaboré par synthèse automatique en phase solide sur un synthétiseur de peptides modèle 430A . Sa capacité à former des fibrilles amyloïd-like *in vitro* est testé comme décrit . Brièvement, le peptide est dissous (10 mg/ml) dans de l'acide acétique à 10 % et laissé à température ambiante pendant 24 heures. La formation des fibrilles est ensuite étudiée à l'aide d'un microscope électronique après contraste à l'acétate d'uranyle à 1 % et après neutralisation par NH₄OH. Des frottis séchés et colorés au rouge Congo alcalin, sont observés en lumière polarisée pour confirmer la biréfringence verte, typique de la substance amyloïde.

• Méthodes immunologiques:

Des antisérums synthétiques anti IAPP 7-17 et IAPP 20-29 humain faits chez le lapin ont été préalablement caractérisés. Des antisérums anti IAPP 1-37 de rat (AA 110) et IAPP 1-37 humain (AA 116) sont produits par deux lapins selon des méthodes standards utilisant un IAPP synthétique de rat et un IAPP synthétique humain). Les deux polypeptides sont liés à l'hémocyanine . Dans la réaction d'immunohistochimie sur coupes de pancréas humain, chat et rat, les deux antisérums AA 110 et AA 116 réagissent spécifiquement et fortement avec les cellules B des îlots de Langerhans. Cette réaction ne se produit pas quand les antisérums sont préabsorbés (10 mg/ml d'antisérum non dilué) avec l'IAPP 1-37 respectivement de rat et humain. Pour l'immunohistochimie, la méthode peroxydase - antiperoxydase est utilisée. Les coupes de pancréas déparaffinées sont incubées avec un antisérum primaire dilué de 1/200 à 1/800. L'immunoréactivité est révélée par la diaminobenzidine.

Pour la détermination du contenu pancréatique en IAPP, les tissus de rat, souris et lapin

sont prélevés après sacrifice et immédiatement congelés. Les animaux (rats, souris) reçoivent *ad libitum* une nourriture ordinaire de laboratoire. Le tissu pancréatique est extrait en milieu acide et le contenu en IAPP est déterminé par radioimmunologie en utilisant un IAPP de rat marqué à l'iode 125 et un antisérum IAPP humain développé chez le lapin. La limite de détection est de 30 fmol/tube. Les résultats sont exprimés en pmol/g.

TECHNIQUES DE GENIE GENETIQUE

• modification de l'activité d'un ou plusieurs gènes

Les techniques de génie génétique permettent d'étudier le rôle de nombreuses molécules impliquées dans la pathologie diabétique en agissant sur l'expression de leurs gènes. Ces derniers sont modifiés en faisant pénétrer un transgène par transfection, électroporation ou micro-injection, dans un ovule fécondé ou dans des cellules souches. Ainsi, il est possible:

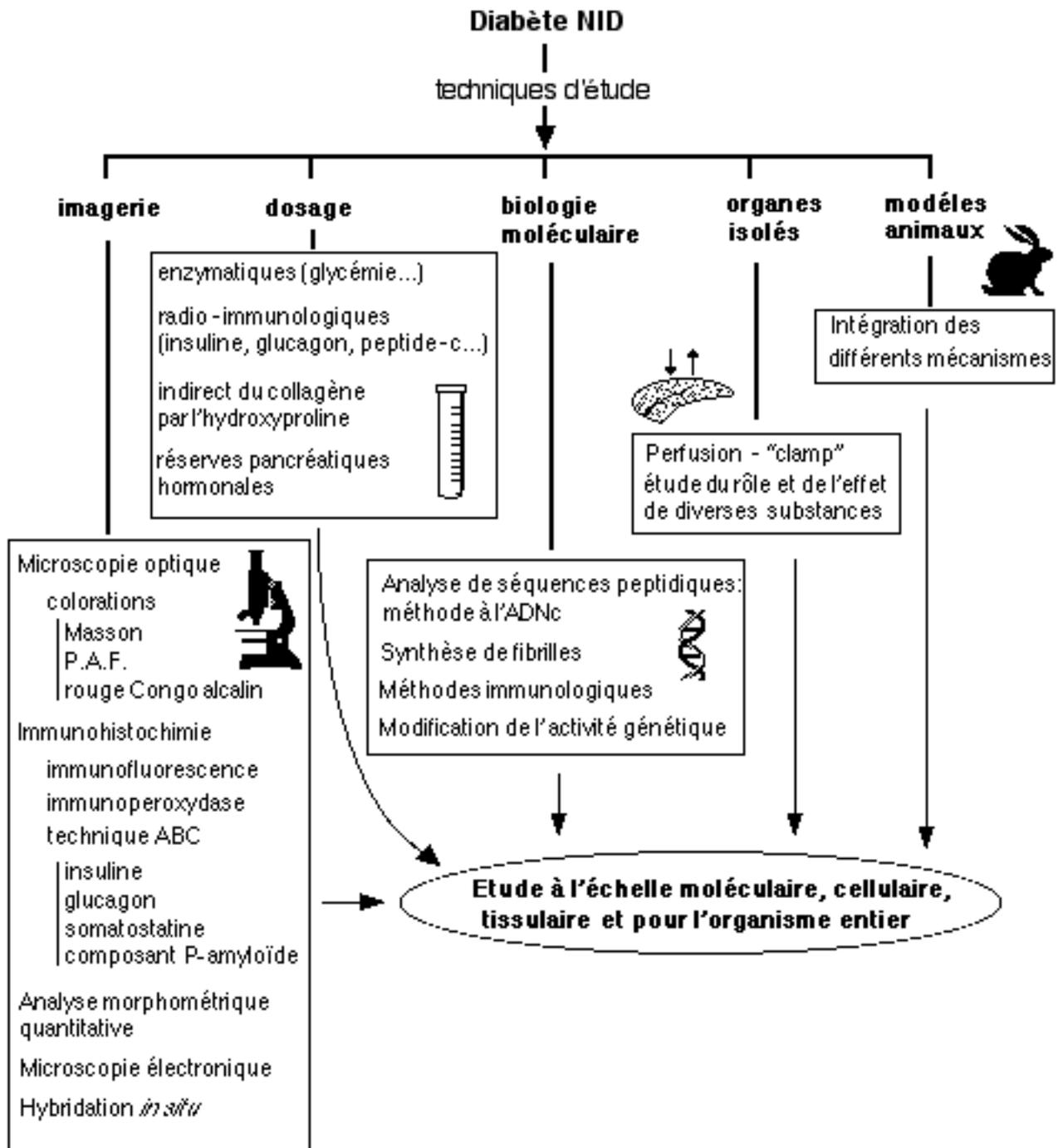
- **d'inactiver** de façon **conditionnelle** un ou plusieurs gènes. On utilise un transgène qui comprend un promoteur à expression contrôlée, le gène à étudier ou à réprimer et un ou plusieurs marqueurs de présence permettant de vérifier son insertion correcte dans le génome. L'inactivation du gène est déclenchée par un produit exogène, antibiotique ou autre, et permet donc d'étudier **l'influence du gène ainsi réprimé ou exprimé à la demande**.
- **de supprimer** totalement l'expression d'un gène, dit alors knock out, au niveau d'une lignée cellulaire, d'un organe ou, quand cela est possible, d'un organisme entier. Pour cela, on crée une délétion artificielle du gène à étudier au moyen d'une sonde vecteur qui s'y incorpore. Elle est injectée dans des cellules souches (pancréatiques par exemple) introduites par la suite à des blastocystes murins. On obtient ainsi des lignées d'animaux n'exprimant plus du tout (homozygotes) ou moins (hétérozygotes pour un transgène) le gène considéré. Le rôle de la glucokinase est ainsi étudié dans les cellules pancréatiques ou hépatiques.
- **de surexprimer** un gène en intégrant des copies supplémentaires de celui-ci au génome normal afin d'étudier les effets de son activité accrue au niveau de cellules isolées, d'un organe ou de l'organisme entier. Dans ce dernier cas, on procède à une micro-injection d'ADN dans des ovules fécondés. Le plus souvent, on utilise des souris qui ont l'avantage d'être disponibles sous forme de lignées parfaitement définies génétiquement.

APPORT DES MODELES ANIMAUX

L'utilisation de modèles animaux variés permet d'étudier l'intégration des différents mécanismes du diabète NID dans l'organisme. Ils permettent notamment l'étude:

- de l'étiologie du diabète NID
- des complications vasculaires ou dégénératives à l'échelle de l'organisme
- des imbrications des différents métabolismes perturbés par l'état diabétique
- de l'évolution des différents organes à long terme
- des rôles respectifs des différentes catégories cellulaires impliquées dans le diabète NID

De plus, ils servent également à valider les phénomènes étudiés à l'échelle moléculaire et cellulaire et permettent également de tester des thérapies. Ils sont donc indispensables à l'étude du diabète NID.



Principales techniques utilisées lors de l'étude du diabète NID