

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABOU BEKR BELKAID-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Spécialité : Biologie moléculaire et génétique

Laboratoire de Chimie Analytique et d'Electrochimie

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le

12/06/2022 par

Madame Meziane Fatima Zohra

épouse Amraoui

En vue de l'obtention du

Diplôme de Doctorat

Thème

**Intérêts méthodologiques de l'analyse des marqueurs génétiques
au cours du diabète de type 1 (HLA DR3/DR4) chez l'enfant
dans les populations de l'extrême ouest Algérien**

Jury

Présidente : Mme MEDJATI-DENNOUNI Nouria. Professeur, Université de Tlemcen

Examinatrice : Mme MESLI TALEB BENDIAB Farida. Professeur, Université de Oran1

Examinatrice : Mme BELKASSAM Nafissa. MCA, Université de Sidi Bel Abbas

Examineur : Mr BOULENOUAR Houssam. MCA, Université de Tlemcen

Directrice de thèse : Mme DALI YUCEF-SAHI Majda. Professeur, Université de Tlemcen

REMERCIEMENTS

Au nom d'ALLAH, le plus grand merci lui revient de m'avoir guidé vers le droit chemin, de m'avoir aidé tout au long de mes années d'études. Merci de m'avoir octroyé une si bonne sagesse, une volonté titanesque, et qui m'a aidé dans un parcours acharné envers le savoir scientifique.

Merci ALLAH de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et de m'avoir donné la foi qui m'a permis d'en arriver là.

La réalisation de cette thèse a été possible grâce aux aides de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude les plus sincères.

Mes remerciements s'adressent.....

A ma directrice de thèse, Madame **DALI YUCEF-SAHI Majda**, Professeur à l'université de Tlemcen. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant de diriger cette thèse de doctorat. Je lui suis reconnaissante pour sa patience, sa sympathie et sa disponibilité à tout moment. Egalement je la remercie pour ses encouragements durant mes années d'étude, très chargées en réflexion, de discussions interminables. Sa générosité scientifique, ses orientations, ses conseils, commentaires, et ses qualités scientifiques ont été très précieux pour mener à bien ce travail. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses grandes qualités humaines, à sa rigueur, à son professionnalisme et à son ouverture d'esprit. Je suis infiniment heureuse et honorée d'avoir fait ma thèse sous sa direction. Aucune expression de gratitude ne sera suffisante pour vous exprimer Madame mon respect et ma reconnaissance.

Plus particulièrement à Madame **DENOUNI-MEDJATI Nouria** Professeur à l'université de Tlemcen, d'abord je suis très sensible à l'honneur que vous m'avez fait en acceptant aimablement de présider mon jury de thèse. J'ai eu le grand privilège de bénéficier de votre enseignement lumineux et vos précieux conseils durant mes années d'étude. Veuillez Madame, trouver dans ce travail, le témoignage de ma gratitude, ma haute considération et mon profond respect.

A Madame **MESLI TALEB BENDIAB Farida** Professeur à l'université de Oran1, je voudrais vous exprimer ici mes sincères remerciements pour avoir accepté et d'avoir la gentillesse d'examiner mon travail de thèse. Aucune expression de gratitude ne sera suffisante pour vous exprimer Madame mon respect et ma reconnaissance.

Je remercie Madame **BELKASSAM Nafissa** MCA à l'université de Sidi Bel Abbès, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et de m'avoir fait l'honneur de l'examiner, pour cela je la remercie chaleureusement. Recevez Madame mon profond respect et ma profonde considération.

Monsieur **BOULENOUAR Houssam** MCA à l'université de Tlemcen. Je voudrais vous exprimer ici mes sincères remerciements pour avoir accepté et d'avoir eu la gentillesse d'examiner mon travail de thèse. Aucune expression de gratitude ne sera suffisante pour vous exprimer Monsieur mon respect et ma reconnaissance.

Je tiens bien sûre à remercier Dr Dib, chef de service de pédiatrie du CHU de Tlemcen et aux infirmières de m'avoir aidé.

Je remercie Monsieur **HAREK Yahia** professeur à l'université de Tlemcen, directeur du laboratoire de Chimie Analytique et d'Electrochimie ainsi qu'à l'ensemble du personnel. A mes ami(e)s « Yasmine, Nawel Halfaoui, Ammaria, Moussa, youcef, Nawel Amraoui, IKram, Latéfa, Takwa, , Salim, Zakaria, » pour les bons moments qu'on a passés.

Une partie du travail génétique a été réalisée en collaboration avec l'Institut Cochin - Bâtiment Faculté Inserm U1016 - Université de Paris Faculté de Médecine. Je remercie chaleureusement le professeur **JULIER Cécile** responsable de l'unité, je tiens à vous remercier ainsi que votre équipe pour cette collaboration. Recevez madame mon profond respect.

Une autre partie de l'analyse génétique a été réalisée en collaboration avec le professeur **GRANT Morahan**, Centre de recherche sur le diabète, Université d'Australie occidentale, Institut médical Harry Perkins. Je vous remercie pour cette collaboration. Recevez monsieur mon respect et ma sincère gratitude.

Je tiens à remercier mon amie **Benslama Yasmine** d'avoir partagé avec moi cette aventure avec des moments de joie, de tristesse, mais aussi de vives émotions. Je voudrais qu'elle trouve ici, l'assurance et l'hommage de mon respectueux et très fidèle attachement.

À tous mes professeurs qui ont contribué à ma formation tout au long de mon cursus et qui ont bien voulu par leur grande générosité partager leur savoir avec leurs étudiants.

DÉDICACES

A ma très chère mère, affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. En l'hommage de son grand sacrifice pour mon bonheur, qu'il voit ce travail un humble gage en toute ma reconnaissance.

A mes frères Adel et Halim en reconnaissance de leur aide pour la réalisation de travail. En guise de remerciements pour les conseils et les encouragements que vous m'avez prodigués que votre gentillesse et votre affection trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Merci à mon mari Amine de m'avoir soutenu et encouragé pendant mes moments de stress et de joie sans oublier ma belle-famille.

Merci à mes belles-soeurs Sara et Souad pour l'aide, le soutien, le réconfort et la gentillesse que vous m'avez apportés.

A ma chère princesse Fériel ma nièce adorée qui a illuminé ma vie depuis le jour de sa naissance.

A tous les membres de ma famille paternelle et maternelle qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Résumé

L'intérêt de ce travail permettra d'élaborer une méthodologie basée sur l'analyse des marqueurs génétiques au cours du diabète de type 1 (HLA DR3/DR4) chez l'enfant dans les populations de l'extrême ouest Algérien et l'important avant tout est de pouvoir dépister les sujets à haut risque génétique avec une meilleure exactitude car le caractère polygénique de la maladie complique les recherches dans ce domaine.

Les données épidémiologiques recueillies (gradient géographique, la consanguinité, l'hérédité liée au diabète de type 2 dans nombreux cas, les maladies virales de la petite enfance) laissent supposer que des facteurs environnementaux joueraient un rôle important dans le déclenchement et la progression du processus auto-immunitaire. Ces facteurs ne sont pas parfaitement reconnus mais certaines pistes existent néanmoins en ce qui concerne les populations de l'extrême ouest Algérien.

Les facteurs de risque environnementaux identifiés sont les antécédents familiaux au DT1, au DT2, les antécédents d'infection aux virus de la varicelle et de la rougeole. Notre recherche *in silico* a dévoilé un mimétisme moléculaire des épitopes de la glycoprotéine « gE » de la varicelle, l'hémagglutinine de la rougeole et la protéine humaine Hsp60 et qui ont la capacité de se lier aux molécules HLADR3/DR4 et déclencher la différenciation des LTh0 en Th1 et Th2 qui initient la destruction des cellules β pancréatiques. Par conséquent, la présence d'anticorps anti-Hsp60 peut être incluse parmi les anticorps à dépister lors du diagnostic du DT1 dans notre population.

Quant à la sévérité liée au DT1, les patients sont souvent exposés à des complications macrovasculaires.

Dans notre démarche méthodologique nous nous sommes intéressés à l'étude du profil hématologique. On note une élévation du nombre des éosinophiles et des globules blancs qui sont significativement associés aux sujets diabétiques. Ce qui explique le risque encouru par nos patients. Risque significativement associé à l'augmentation du nombre de monocytes, du volume plaquettaire moyen et la vitesse de sédimentation à 1 heure et la diminution de l'hématocrite et du nombre de plaquettes chez les diabétiques.

Quant au bilan lipidique, il révèle une élévation du taux de triglycéride et de cholestérol total qui sont significativement associés aux complications macrovasculaires auquel s'ajoute le surpoids et l'obésité ($p < 0.05$). Les résultats de notre étude analytique suggèrent que la durée du diabète supérieur à 10 ans et un taux élevé des triglycérides constituent des facteurs de risque des complications macrovasculaires.

Mots clés : diabète de type 1, extrême ouest Algérien, HLA DR3/DR4, monts de Tlemcen, antécédents familiaux au diabète, gE, hémagglutinine, Hsp60, mimétisme moléculaire, complications macrovasculaires, paramètres hématologiques, paramètres lipidiques, surpoids, obésité, durée du diabète.

Abstract

The interest of this work which will allow the elaboration of a methodology based on the analysis of genetic markers during type 1 diabetes mellitus (HLA DR3/DR4) for children in the populations of the Algerian extreme west and the importance above all is to be able to detect subjects at high genetic risk with a better accuracy because the polygenic character of the disease complicates the research in this field.

The epidemiological data collected (geographical gradient, consanguinity, heredity related to type 2 diabetes in many cases, viral diseases in early childhood) suggest that environmental factors play an important role in the initiation and progression of the autoimmune process. These factors are not perfectly recognized but some leads exist nevertheless with regard to the populations of the Algerian extreme west.

The environmental risk factors identified are family history of T1DM, T2DM, history of varicella and measles virus infection. Our *in silico* research revealed a molecular mimicry of epitopes of the varicella glycoprotein "gE", measles hemagglutinin and the human protein Hsp60 and which have the ability to bind to HLADR3/DR4 molecules and trigger the differentiation of LTh0 into Th1 and Th2 which initiate pancreatic β -cell destruction. Therefore, the presence of anti-Hsp60 antibodies can be included among the antibodies to be screened at the diagnosis of T1DM in our population.

As for the severity of T1DM, patients are often exposed to macrovascular complications.

In our methodological approach we were interested in the study of the haematological profile. We note an increase in the number of eosinophils and white blood cells which are significantly associated with diabetic subjects. This explains the risk incurred by our patients. Risk significantly associated with increased monocyte count, mean platelet volume and sedimentation rate at 1 hour and decreased hematocrit and platelet count in diabetics.

As for the lipid profile, it reveals an elevation of the triglyceride and total cholesterol levels which are significantly associated with macrovascular complications to which is added overweight and obesity ($p < 0.05$). The results of our analytical study suggest that the duration of diabetes higher than 10 years and an elevated triglyceride level constitute risk factors for macrovascular complications.

Key words: type 1 diabetes mellitus, extreme west Algeria, HLA DR3/DR4, Tlemcen mountains, family history of diabetes, gE, hemagglutinin, Hsp60, molecular mimicry, macrovascular complications, hematological parameters, lipid parameters, overweight, obesity, duration of diabetes.

الملخص

الاهتمام بهذه الدراسة تتيح امكانية تطوير منهجية قائمة على تحليل الواسمات الجينية HLA DR3/DR4 أثناء الإصابة بمرض السكري من النوع 1 عند أطفال سكان الغرب الأقصى. مثلما تتيح ايضا القدرة على فحص الأشخاص المعرضين لمخاطر وراثية عالية بدقة أفضل ، و ذلك لأن الطبيعة المتعددة الجينات للمرض تعقد البحث في هذا المجال. تشير البيانات الوبائية التي تم جمعها (التدرج الجغرافي ، القرابة ، الوراثة المرتبطة بمرض السكري من النوع 2 في كثير من الحالات ، والأمراض الفيروسية للأطفال في مرحلة الطفولة) أن العوامل البيئية تلعب دوراً مهماً في بدء عملية المناعة الذاتية وتطورها. تبقى هذه العوامل غير معترف بها بشكل كامل، إلا انه و مع ذلك توجد طرق معينة مع فيما يتعلق بسكان أقصى غرب الجزائر.

عوامل الخطر البيئية التي تم تحديدها هي التاريخ العائلي لمرض السكري نوع 1 و نوع 2، تاريخ الإصابة بمرض جذري الماء و فيروس الحصبة.

كشفت أبحاثنا في السيليكو عن محاكاة جزيئية بين gE لفيروس جذري الماء، وهيماجلوتينين الحصبة والبروتين البشري Hsp6 والتي لديها القدرة على الارتباط بجزيئات HLA DR3/DR4 وتحفيز تمايز Th0 الى Th1, Th2 لالذين لديهم القدرة على تدمير خلايا β للبنكرياس. لذلك ، يمكن تأكيد وجود أجسام مضادة لـ Hsp6 ضمن الأجسام المضادة التي يتم فحصها عند تشخيص بمرض السكري من النوع 1 في مجتمعنا.

بالنسبة لشدة مرض السكري من النوع 1، غالباً ما يتعرض المرضى لمضاعفات امراض الأوعية الدموية الكبيرة. في مخطط دراستنا ، أولينا اهتمامنا بدراسة نمط تركيب الدم بحيث ان هناك زيادة في عدد الحمضات وخلايا الدم البيضاء التي ترتبط ارتباطاً وثيقاً بمرض السكري. هذا ما يفسر وجود عامل الخطر على مرضانا. ترتبط المخاطر بشكل كبير بزيادة عدد الخلايا الوحيدة ، ومتوسط حجم الصفائح الدموية ومعدل الترسيب في ساعة واحدة وانخفاض نسبة الهيماتوكريت وعدد الصفائح الدموية لدى مرضى السكري أما بالنسبة لتوازن الدهون ، فإنه يكشف عن زيادة في مستوى الدهون الثلاثية والكوليسترول الكلي المرتبطين بشكل كبير بمضاعفات مرض السكري $P < 0.05$

وتشير نتائجنا اللوجستية إلى أن مدة مرض السكري أكبر من 10 سنوات وارتفاع مستويات الدهون الثلاثية عوامل خطر لمضاعفات امراض الأوعية الدموية الكبيرة

الكلمات المفتاحية: السكري من النوع 1 ، أقصى غرب الجزائر HLA DR3/DR4 جبال تلمسان، التاريخ العائلي لمرض السكري، Hsp60، Hemagglutinin، gE التقليد الجزيئي، مضاعفات الأوعية الدموية، الخصائص الدموية، معايير الدهون، زيادة الوزن، السمنة، مدة مرض السكري

Production scientifiques

1. Publications

1.1. Article

FZ. Meziane, M. Dali-Sahi, N. Dennouni- Medjati, H. Boulenouar, Y. Kachekouche, Y.Benslama, Y. Harek. Molecular mimicry between varicella, measles virus and Hsp60 in type 1 diabetes associated HLA-DR3/DR4 molecules. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2020; 14:1783-1789.

Y.Benslama, N. Dennouni- Medjati, M. Dali-Sahi, **FZ. Meziane**, Y. Harek. Childhood type 1 diabetes mellitus and risk factor of interactions between dietary cow's milk intake and HLA-DR3/DR4 genotype. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2021;1-9.

2. Communications internationales.

FZ. Meziane, A. Bahar, M. Dali-Sahi, N. Dennouni- Medjati, Y. Benslama (2018) : Analyse du statut en vitamine E chez les diabétiques de type1. *Journées francophones de la nutrition*. 28-30 Novembre, Nice (France).

FZ. Meziane, M. Dali-Sahi, N. Dennouni- Medjati, Y. Harek (2019) : Impact de l'apport en vitamine A et calcium sur l'indice de masse corporelle des diabétiques de type 1. *Journées francophones de la nutrition*. 27-29 Novembre, Rennes (France).

FZ. Meziane, M. Dali-Sahi, N. Dennouni- Medjati, Y. Benslama, Y.Harek (2020) : Anémie au cours de la grossesse chez les femmes diabétiques et la mort fœtale intra-utérine. *Congrès annuel de la SFD*, 8 au 11 septembre2020, Bruxelles (Belgique).

FZ. Meziane , M.Dali-Sahi , N. Medjati-Dennouni , Y. Benslama, Y.Harek (2020). Facteurs environnementaux et risque du diabète de type 1 dans la population de l'extrême Ouest Algérien. *3ème congrès international BIOTECH 2020*, 27 au 29 février, Fès (Maroc).

3. Communications nationales.

FZ. Meziane, M.Dali-Sahi, Y. Benslama, N. Dennouni-Medjati, (2018) : Intérêts méthodologiques de l'analyse des marqueurs génétiques au cours du diabète de type 1 (HLA DR3/DR4) chez l'enfant dans les populations de l'extrême ouest Algérien. *Doctoriales SNV2018*. 08 Décembre, Tlemcen (Algérie).

FZ. Meziane, M.Dali-Sahi, N. Dennouni-Medjati, A.Bahar, Y.Harek (2019) :Statut en vitamine C des diabétiques de type 1. *3ÈME SÉMINAIRE NATIONAL BIOLOGIE & SANTÉ (3ÈME SNBS 2019)*.07 Décembre, Sidi Bel-Abbès (Algérie).

Liste des figures

Matériel et Méthodes

Figure 1. Principe de la méthode de génotypage par sondes Taqman (Applied Biosystems) ..18

Figure 2. Capture d'écran de résultats obtenus sur le logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.1 pour le génotypage par sondes Taqman d'un SNP19

Liste des tableaux

Résultats et Discussion : Chapitre 1

Tableau 1. Les variables propres à la description de l'échantillon.....	29
Tableau 2. Les variables servant à l'analyse comparative	31
Tableau 3. Les paramètres du bilan glucidique	32
Tableau 4. Les paramètres du bilan lipidique des cas et des témoins.....	33
Tableau 5. Les paramètres du bilan lipidique des diabétiques avec et sans complications macrovasculaires.....	34
Tableau 6. Paramètres hématologiques associés au DT1	35

Résultats et Discussion: Chapitre 2

Tableau 1. Associations entre DT1 et allèles HLA de classe II, les génotypes	45
Tableau 2. Facteurs environnementaux associés au diabète de type 1	46
Tableau 3. Les facteurs environnementaux associés à l'allèle HLADR3 ou HLADR4 dans notre population étudiée	47
Tableau 4. Les facteurs environnementaux associés à l'allèle HLADR3 dans la population cas-témoins habitant les monts de Tlemcen.....	48
Tableau 5. Odds ratios (intervalles de confiance à 95 %) du modèle de régression logistique.....	48
Tableau 6. Génotypage des SNPs rs2187668 et rs3104413 taggant HLADR3/DR4.....	49

Résultats et Discussion: Chapitre 4

Tableau 1. Paramètres hématologiques associés au diabète de type 1.	68
Tableau 2. Résultats de la régression logistique.....	69
Tableau 2.1. Les tests d'adéquation des ajustements	69
Tableau 3. Mesure des associations (entre la variable de réponse et les prévisions de probabilité)	70

Résultats et Discussion: Chapitre 5

Tableau 1. Caractéristiques anthropométriques de la population étudiée	80
Tableau 2. Paramètres lipidiques caractéristiques de la population étudiée	81
Tableau 3. Résultats de la régression logistique	82
Tableau 3.1. Les tests d'adéquation des ajustements	82
Tableau 4. Mesure des associations (entre la variable de réponse et les prévisions de probabilité).....	82

Liste des abréviations

ADA: American Diabetes Association
ADN: Acide Désoxyribonucléique
ADNp: Acide Désoxyribonucléique plasmidique
CPA : Cellules Présentatrice d'Antigène.
ATG : Anti-Thymocyte Globulin
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BLG : β -Lactoglobuline
BSA: Bovine Serum Albumin
CBV : Coxsackie B virus
CD4,8 : Cluster de Différenciation 4
ChgA : Chromogranin A
CT : Cholestérol Total
CMV: Cytomegalovirus
CTLA4: Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein
DAISY: Diabetes Autoimmunity Study in the Young
DO : Densité Optique
DT1 : Diabète de Type 1
EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EV : Entérovirus
FID : Fédération Internationale du Diabète
Foxp3 : Forkhead box P3
GAD-65: Glutamic Acid Decarboxylase-65
GB: Globules Blancs
GCSF: pegylated Granulocyte Colony-Stimulating Factor
gE : Glycoprotéine E
GR : Globules rouges
GWAS: Genome Wide Association Study
HDL-C: High Density Lipoprotein-Cholesterol
HLA: Human Leukocyte Antigen
Hsp-60: Heat shock protein 60
IA-2: Insulinoma Antigène
IAA : Anticorps Anti-Insuline
IC : Intervalle de confiance
ICA: Islet Cell Autoantibodies
IDDM: Insulin dependent diabetes mellitus
IEDB : Immune Epitope Database
IFN γ : Interféron- γ
IGRP : Islet-specific Glucose-6- phosphatase catalytic subunit-Related Protein
IL-4,2 : Interleukine-4,2
IM : Infarctus du myocarde

IMC: Indice de Masse Corporelle
LDL-C: low-density lipoproteins- Cholesterol
M-DC: Cellules Dendritiques Myéloïdes
NIH: National Institute of Health
NOD : Non Obese Diabetic
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OR : Odds Ratio
ORF4: Open reading frame
p2C:Proteine2C
PCR : Polymerase Chain Reaction
pH: potentiel Hydrogène
RV : Rotavirus
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
T1DGC: Type 1 Diabetes Genetics Consortium
TCR: T cell receptor
TG : Triglycérides
TLR-2: Toll-Like Récepteurs-2
TNF- α : Tumor Necrosis Factors- α
UVR : Rayonnements UV
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
VNTR : Variable Number Tandem Repeat
VPM: Volume plaquettaire moyen
ZnT8: Transporteur de Zinc-8

Table des matières

PREMIÈRE PARTIE	1
Introduction générale	1
1. Introduction générale	2
DEUXIÈME PARTIE	13
Matériel et Méthodes	13
1. Population d'étude	14
2. Le recrutement des sujets	14
3. Le recueil des données.	14
3.1 Le questionnaire	14
3.2 Le dossier médical	14
4. Critères d'évaluation des malades	14
4.1 Critère d'inclusion	14
4.2 Critère de non inclusion.....	15
5. Critères d'évaluation des témoins	15
5.1 Critères d'inclusion.....	15
5.2 Critères de non inclusion	15
6. Prélèvement et paramètres étudiés.....	15
6.1 Les variables d'intérêts.....	16
7. Extraction de l'ADN par la technique NaCl (salting out).....	16
7.1 Techniques d'extraction	16
7.1.1 Lyse des globules rouges	16
7.1.2 Lyse des leucocytes	17
7.1.3 Précipitations des protéines.....	17
7.1.4 Précipitation de l'ADN	17
7.2 Dosage et contrôle de qualité de l'ADN.....	17
8. Etude du polymorphisme HLADR3/DR4	18
8.1 Génotypage des allèles HLADR3/DR4 par sonde Taqman.....	18
8.2 Réaction PCR.....	19
8.3 Génotypage des SNPs rs2187668 et rs3104413 taggant HLADR3/DR4	19
9. Analyse immunoinformatique pour la détermination des épitopes viraux.....	20
9.1 Programmes et bases de données utilisés	20
9.1.1 NCBI (ProteinDatabase).....	20
9.1.2 Blast.....	20
9.1.3 LALIGN	20
9.2 Établissement des liants et des non liants.....	20
9.2.1 Outil d'analyse IEDB	20
9.2.2 Allèles utilisés dans l'étude	21
9.2.3 L'auto-antigène	21
9.2.4 Antigènes viraux	21
9.3 Profil de sécrétion des cytokines.....	22
9.3.1 I4Pred	22
9.3.2 IFNepitope	22
9.4 Prédiction de la structure 3D des peptides homologues.....	22
9.5 Établissement du mimétisme structurel.....	23

10. L'analyse statistique	23
TROISIÈME PARTIE	24
Résultats et Discussion	24
Chapitre 1: Description de la population.....	25
1. Introduction	26
2. Matériel et méthodes.....	26
3. Analyses Statistiques.....	27
4. Résultats	27
5. Discussion	36
6. Conclusion.....	38
7. Références	39
Chapitre 2:Epidemiologie du DT1, haplotype de prédisposition (HLADR3/DR4) et gradient géographique de prédisposition	41
1. Résumé.....	42
2. Introduction.....	43
3. Méthodes.....	44
3.1 Génotypage HLA Classe II.....	44
3.2 Génotypage des SNPs rs2187668 et rs3104413 taggant HLADR3/DR4.....	44
3.3 Analyses statistiques	45
4. Résultats.....	45
5. Discussion	49
6. Conclusion	51
7. Références.....	52
Chapitre 3: Molecular mimicry between varicella, measles virus and Hsp60 intype 1 diabetes associated HLA-DR3/DR4 molecules.....	55
1. Résumé.....	56
2. Introduction.....	56
3. Méthodes.....	56
4. Résultats.....	56
5. Conclusion	56
Chapitre 4 : Les anomalies de la formule sanguine au cours du diabète de type 1 et risquecardiovasculaire	64
1. Résumé	65
2. Introduction.....	66
3. Méthodes.....	66
3.1Outils d'étude.....	67
4. Résultats.....	67
5. Discussion	70
6. Conclusion	71
7. Références.....	72
Chapitre 5 : Risque de complications macrovasculaires associées aux paramètres lipidiques et à la durée du diabète dans le diabète de type 1.....	75
1. Résumé.....	76

2. Introduction	77
3. Méthodes	77
3.1 Outils d'étude	78
4. Résultats.....	78
5. Discussion.....	82
6. Conclusion	83
7. Références.....	84
Discussion Générale et Conclusion	88
1. Discussion générale.....	89
2. Conclusion et perspectives	95
Références bibliographiques	97
Annexe.....	115

PREMIERE PARTIE

Introduction générale

1. Introduction générale

L'incidence et la prévalence du diabète de type 1 connaissent une progression à travers le monde entier. En 2019, la Fédération internationale du diabète (FID) a estimé que le nombre d'enfants et d'adolescents atteints par le diabète de type 1 âgés de moins de 20 ans est à 1,1 million (FID, 2019) alors que en 2010, on y compte 480000 enfants de moins de 15 ans atteints de diabète de type 1 (FID, 2010)

En Algérie, la prévalence totale des diabétiques n'a pas cessé d'augmenter car l'OMS a recensé 1 million de personnes en 1993 pour atteindre 2 500 000 personnes en 2007 (OMS, 2007). Selon les données publiées en 2019 par (FID), l'Algérie a répertorié (33 100), le Maroc (30 200) et l'Arabie saoudite (27 800) enfants et adolescents âgés entre 0-19 ans vivant avec le diabète de type 1 qui sont les plus grands nombres enregistrés dans la Région du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord (FID, 2019).

Le diabète de type 1 (DT1) est subdivisé en type 1A (auto-immun) et type 1B (idiopathique). Nous utilisons le terme DT1 pour désigner le type auto-immun, qui se caractérise par une destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, responsable d'une insulino-pénie .

Cette destruction auto-immune est initiée par la fixation des peptides antigéniques sur les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigène (CPA) macrophages et cellules dendritiques et transférées vers le ganglion lymphatique drainant le pancréas. Ces CPA activent et mobilisent les lymphocytes T-helper (CD4 +) et T CD8 + nécessaires à l'induction de la maladie (Haskins et al., 1988 ;Mallone et al., 2007) .

Ainsi, les macrophages sécrètent l'interleukine (IL) -12, stimulant les cellules T CD4 + pour sécréter l'interféron (IFN) - γ et l'IL-2. L'IFN-stimule d'autres macrophages qui vont libérer à leur tour d'autres cytokines telles que l'IL-1 β , le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et les radicaux libres, toxiques pour les cellules β . De plus, les cellules T-helper (CD4) activées produisent des cytokines qui attirent les lymphocytes T et B et les encouragent à proliférer dans l'îlot conduisant à l'insulite (Gelber et al., 1994; Maclaren et al., 1999; Sabbah et al., 1999)

Les antigènes bêta-cellulaires présentés dans ce contexte pro-inflammatoire et avec l'aide CD4 (LTh2) initient la conversion des lymphocytes B en plasmocytes qui peuvent produire différents auto-anticorps dirigés contre l'insuline (IAA) (Crawford et al., 2011), Glutamic Acid Decarboxylase (GAD)-65 (Baekkeskov et al., 1990 ; Atkinson et al., 1993), l'antigène neuroendocrinien la tyrosine phosphatase IA-2 (Insulinoma Antigène (IA)-2) (ICA512) (Kawasaki et al., 1997), Transporteur de Zinc (ZnT8)(Wenzlau et al., 2008) (114), la protéine de choc thermique (HSP)-60(Jones et al., 1990) et le peptide WE14 de la chromogranine A (Stadinski et al., 2010; DeLong et al., 2012).

Pendant ce temps, dans la périphérie, le déclencheur environnemental a provoqué un changement métabolique créant un environnement pro-inflammatoire qui favorise la

prolifération des cellules LT CD4 créant une imbalance entre cellules LT CD4+ effecteurs et LT régulatrices (Bluestone and Tang, 2005).

En outre, les cellules T CD8 autoréactives sont stimulées pour proliférer et migrer dans le pancréas pour attaquer directement les cellules β portant les auto-antigènes cibles. Le stress induit par cette deuxième vague de destruction des cellules bêta, qui implique la perforine, l'IFN- γ et le facteur de nécrose tumorale (TNF) - α , entraîne une pseudoatrophie causant une perte de certaines cellules bêta (Gelber et al., 1994; Maclaren et al., 1999; Sabbah et al., 1999). Cette destruction provoque également la libération de nouveaux antigènes de cellules bêta qui sont captés par les CPA, y compris les cellules B migrées, et sont acheminées vers le ganglion lymphatique pancréatique. Cela engage de nouvelles spécificités des cellules T CD4 et CD8 et des cellules B dans un processus appelé propagation d'épitope (Ott et al., 2004; Tian et al., 2006). Une vague subséquente de destruction des cellules bêta est donc plus sévère et entraîne généralement un épuisement de la masse des cellules bêta.

Le diabète de type 1 est une maladie polygénique, hétérogène et multifactorielle qui nécessite la conjonction de facteurs génétiques et environnementaux (Wanstrat and Wakeland, 2001). Aucun gène ne peut expliquer à lui seul la maladie ; néanmoins la région human leucocyte antigen (HLA) situé sur le bras court du chromosome 6 communément appelée IDDM1 est le contributeur majeur (Davies et al., 1994 ; Farid et al., 1979; Thorsby and Rønningen, 1993; Undlien et al., 1997) parmi les 52 régions génétiques associées significativement au diabète de type 1 par les études d'association pangénomique (Genome Wide Association Study - GWAS) effectuées notamment sur la cohorte du Type I Diabetes Genetics Consortium (T1DGC- www.t1dgc.org).

Depuis la découverte de l'association entre HLA et DT1 en 1973 (Singal and Blajchman, 1973), plusieurs allèles des gènes HLA de classe II ont été identifiés comme étant liés à la susceptibilité au DT1 ou à la protection contre le DT1 (Sheehy et al., 1989; Cucca et al., 1993; Noble et al., 1996; Bugawanet al., 2002; Aly et al., 2006; Erlich et al., 2008).

Les associations les plus fortes de la région HLA sont observées avec des haplotypes et des génotypes formés par les loci DRB1-DQA1-DQB1. L'association qui confère le risque le plus élevé est un génotype hétérozygote spécifique, composé de DRB1 * 03: 01(DR3)-DQA1 * 05:01-DQB1 * 02 :01(DQ2) sur un chromosome et HLA-DRB1*04 (DR4)- DQA1*03:01-DQB1*03:02 (DQ8) sur le deuxième chromosome. L'abréviation commune pour ce génotype à risque le plus élevé est "DR3 / DR4"(Noble and Valdes, 2011; Erlich et al., 2008).

Dans les populations du nord de l'Europe, l'association la plus forte est celle des hétérozygotes DR3 / DR4, alors que pour les Européens du Sud le taux de croissance du DT1 est dû à la présence de HLA-DR3 dans un état homozygote ou hétérozygote (Bilbao et al., 2006).

De plus, une étude tunisienne a montré que la fréquence des hétérozygotes DR3/DR4 est de 12,5% et une association positive des haplotypes DRB1 * 030101-DQB1 * 0201 et DRB1 * 040101-DQB1 * 0302 alors que la fréquence des hétérozygotes d'une population marocaine est égale à 30% et les haplotypes DRB1 * 03-DQB1 * 02, DRB1 * 04-DQB1 * 03 et DRB1 *

04-DQB1 * 02 induisent une susceptibilité au diabète de type 1 tandis que les haplotypes

DRB1*13 DQB1 * 06 et DRB1 * 15-DQB1 * 06 confèrent un effet protecteur (Stayoussef et al., 2009; Benseffaj et al., 2012).

Les études familiales indiquent que les génotypes DQA1 * 05: 01-DQB1 * 02: 01 (DQ2) et DQA1 * 03: 01-DQB1 * 03: 02 (DQ8) représenteraient environ 40% à 50% de l'agrégation familiale du DT1 et les individus avec le plus grand risque de DT1 expriment ces deux haplotypes prédisposants, qui sont respectivement en déséquilibre de liaison avec DRB1 * 03: 01 (DR3) et avec DRB1 * 04: 01/02 (DR4) (Noble and Valdes, 2011).

Les frères et sœurs DR3 / 4-DQ2 / 8 qui sont HLA identiques ont un risque élevé de plus de 80% pour développer les auto-anticorps anti-ilots et 60% pour la progression vers le diabète à l'âge de 15 ans (Aly et al., 2006).

Le sous-typage moléculaire de locus DRB1 a offert la possibilité de subdiviser DR4 à des sous-groupes alléliques HLA-DRB1 * 0401, 0402, 0405 et HLA-DRB1 * 0403, 0406, qui sont respectivement associés au risque du DT1 et à la protection, indépendamment des allèles DQ (Tait et al., 1995). Pratiquement, la sensibilité semble plus fortement associée à DR4 qu'avec DQB1 * 0302, alors que c'est l'inverse pour la protection contre le DT1, DQB1 * 0602 conférant une protection dominante par rapport à DR2 (Danze et al., 1997).

Dans le même contexte, il a été montré que la combinaison DQA1 et DQB1, codant respectivement pour les chaînes DQ alpha et bêta confère un risque du DT1 (Dorman, 1997) lorsque il y a une substitution de l'acide aspartique à la position 57 sur la chaîne bêta de la molécule HLA de classe II (non Asp 57), par la serine, valine ou alanine, associé à la présence d'arginine sur la chaîne alpha à la position 52 (Arg-52)(Todd et al., 1988, Baranda et al., 1994). Ainsi, l'hétérodimère résultant de la combinaison de la chaîne alpha DQ Arg-52 avec la chaîne bêta DQ non Asp-57 confère un risque plus élevé pour développer le diabète de type 1 car ces changements au niveau de ces deux positions infligeraient probablement un grand effet conformationnel sur la capacité de présentation de l'antigène (Khalil et al., 1990, Nepom and Kwok, 1998).

Les haplotypes HLA DRB1 * 15: 01-DQA1 * 01: 02-DQB1 * 06: 02, ont toujours conféré une protection contre la maladie dans presque toutes les populations (Van der Auweraet al., 1995). Néanmoins, chez les caucasiens certaines études suggèrent que la protection est conférée par d'autres haplotypes comprenant DRB1 * 11: 04-DQA1 * 05: 01-DQ B1 * 03: 01, DR B1 * 07: 01-DQA1 * 02: 01-DQB1 * 03: 03 et D RB1 * 14: 01-DQA1 * 01: 01-DQB1 * 05: 03 (Valdes et al., 2005).

Les différences structurelles entre les molécules HLA qui prédisposent au DT1 et celles qui sont protectrices vont influencer leurs capacité à lier les antigènes diabétogènes et les TCR des lymphocytes T auto-réactifs spécifiques des cellules β . Les mécanismes possibles par lesquels les molécules HLA affecteront le développement du diabète de type 1.

- 1) À la périphérie : les molécules HLA prédisposantes se lient bien aux antigènes diabétogènes induisant l'activation des lymphocytes T auto-immunes, contrairement aux molécules HLA protectrices. (Nepom and Kwok, 1998)

- 2) La stabilité moléculaire et la délétion thymique des lymphocytes T autoréactifs n'est possible que lorsque les molécules HLA protectrices forment des complexes stables avec des auto-antigènes dans le thymus, conduisant à une délétion efficace des lymphocytes T potentiellement autoréactifs. En revanche, les complexes moins stables formés par les molécules HLA prédisposantes peuvent entraîner une élimination inefficace des lymphocytes T et la libération de lymphocytes T autoréactifs dans la périphérie (Schmidt et al., 1997).

La détermination du type HLA qui confère un risque génétique pour développer le diabète de type 1 notamment les allèles HLA DRB1 et DQB1 s'avère primordiale ce qui a poussé les chercheurs à retrouver un nombre minimum de marqueurs SNP qui pourraient définir rapidement les types HLA-DR pertinents pour le DT1, à savoir, DR3 / 4, DR3 / 3, DR4 / 4, DR3 / X, DR4 / X, et DRX / X (où X n'est ni DR3 ni DR4) et pourrait distinguer le type DR4 le plus risqué (DR4-DQ8) ainsi que le type DR4-DQB1 * 03: 01 non associé au DT1 cela permettra un gain en matière de coût et de temps qui sont infligés par les actuelles méthodes de typages.

Pour les échantillons de T1DGC et la population DAISY, un test de dépistage à deux SNP(rs7454108 ; rs2040410) peut identifier le génotype hétérozygote DR3/4-DQ8 le plus à risque pour le diabète de type 1 (Barker et al., 2008).

L'étude de Nguyen et al a rapporté que l'analyse des trois SNPs (rs2854275, rs3104413 et SNPrs9273363) peut déterminer les individus avec les types HLA-DR, DR4-DQ8, DR4-DQ7, DR3/4-DQ8, et DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 avec la possibilité de remplacer SNP rs9273363 par rs9275184, rs9275495, rs9275532, rs9275334 (Nguyen et al., 2013).

D'autre part, l'intervention des facteurs environnementaux s'avère nécessaire au déclenchement de la réaction auto-immune. Un grand nombre de facteurs a été évoqué notamment l'introduction précoce du lait de vache pourrait constituer un facteur de risque pour développer le DT1.

Des études ont montré que l'exclusion des protéines de lait de vache durant les six premiers mois de vie réduit la probabilité d'apparition d'auto-anticorps anti-cellules β chez l'enfant à haut risque génétique. La physiopathologie de cette association n'est pas encore élucidée, néanmoins on a décelé la présence d'anticorps anti-albumine (BSA) chez des sujet diabétiques de type 1 et anti- β lactoglobuline qui semblent être liés au génotype HLA de classe II (Harrison and Honeyman, 1999).

Ainsi, il existe deux mécanismes complémentaires pour assurer une protection immunitaire pendant que le processus éducatif thymique est en cours. D'abord, il y a l'immunité cellulaire passive à court terme qui consiste au transfert des cellules immunitaires du lait maternel à l'enfant, qui fournit une protection immédiate (Tuboly et al., 1995 ; Jain et al., 1989).

Ceci est ensuite remplacé par le résultat de l'immunité maternelle éducative démontrée dans l'étude de Ghosh et al qui stipule que l'allaitement influence le développement du répertoire des lymphocytes T CD8 + de la progéniture d'une manière spécifique à l'Ag quel que soit le mécanisme intrathymique de la présentation de l'Ag transporté (Ghosh et al., 2016).

Parmi les facteurs externes, les infections virales ont longtemps été considérées comme un déclencheur environnemental potentiel de la maladie (Dahlquist and Källén, 1996).

De nombreux virus ont été incriminés sans preuve formelle, comme les entérovirus (Coxsackie B, Rhinovirus, Rotavirus), des virus de la famille des Herpesviridae (virus varicelle-zona, cytomégalovirus), des virus de la famille des Paramyxoviridae (rougeole et oreillons), et les virus de la famille des Togaviridae (rubéole).

Parmi eux les entérovirus. Ce sont les agents infectieux viraux les plus répandus chez l'homme et ont été trouvés dans les tissus pancréatiques de patients atteints de diabète de type 1 (Richardson et al., 2009) et chez les personnes ayant des auto-anticorps anti-îlots de Langerhan (Williams et al., 2006).

Plusieurs études ont rapporté une association entre infection par entérovirus, plus particulièrement le virus coxsackie B et la survenue ultérieure d'un DT1 (Hober et al., 1998). Des études ont identifié une homologie de séquence entre la séquence d'acides aminés de la protéine 2C (p2C) du virus Coxsackie B4 et de la protéine GAD 65 (PE-VKEK) (Baekkeskov et al., 1990, Kaufman et al., 1992), ce mimétisme moléculaire a été démontré par l'étude de Vreugdenhil et al chez les diabétiques ayant une prédisposition génétique à la molécule HLA DR3 (Vreugdenhil et al., 1998).

De plus, l'étude australienne BABY DIAB (étude prospective de la naissance chez les parents de DT1) a montré une association significative entre la séroconversion des rhinovirus et l'augmentation des taux d'anticorps GAD et IA2 chez les enfants. Les auteurs ont suggéré que l'infection par des rhinovirus pourrait déclencher ou amplifier l'auto-immunité des îlots chez les enfants génétiquement prédisposés (Honeyman et al., 2000).

Les Rotavirus sont l'une des causes les plus communes des maladies gastro-intestinales chez les enfants. Ces virus partagent des séquences d'acides aminés homologues avec deux autoantigènes associés au diabète, la glutamic acid decarboxylase (GAD) et la protéine tyrosinephosphatase (IA2): ce mimétisme moléculaire peut déterminer une réaction auto-immune (Honeyman et al., 1998).

Dans une étude in vitro, le mimétisme moléculaire a été démontré entre un antigène particulier du cytomégalovirus CMV et GAD65. De plus, le CMV a démontré sa capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T réactifs à GAD-65, suggérant une contribution à la perte de tolérance des lymphocytes T au GAD-65. Par conséquent, ils ont suggéré que l'infection du tractus gastro-intestinal par CMV peut se propager par voie systémique et influencer le processus auto-immun des cellules β du pancréas (Masuzawa and Motojima, 2004).

Le virus des oreillons a été associé au DT1 car lors du diagnostic du DT1, une fréquence élevée d'anticorps dirigés contre les îlots de Langerhans a été observée (Helmke et al., 1980).

Des études *in vitro* indiquent que les oreillons sont capables d'infecter les cellules β humaines (Cavallo et al., 1992; Vuorinen et al., 1992). L'étude de Cavallo et al a montré que le virus des oreillons induisait la libération d'IL-1 et d'IL-6 dans une lignée cellulaire d'insulinome humaine et augmentait l'expression des molécules HLA de classe I et de classe II provoquant la perte de tolérance envers les cellules β en les rendant plus vulnérables à la destruction à médiation immunitaire (Cavallo et al., 1992).

La rubéole congénitale est la conséquence d'une infection de la mère pendant la grossesse, elle est associée à un risque élevé de DT1 chez les nouveau-nés génétiquement prédisposés. Les patients atteints de rubéole congénitale qui ont développé le DT1 présentaient des fréquences accrues HLA-DR2 et -DR3 donc la rubéole peut représenter un déclencheur environnemental uniquement chez les patients présentant une susceptibilité génétique au DT1 (Rubinstein et al., 1982).

Les facteurs diététiques peuvent également contribuer au déclenchement du DT1 ainsi des études ont démontré que les enfants atteints de diabète introduisent précocement les aliments contenant du gluten (Beyerlein et al., 2014).

L'exposition précoce et tardive aux céréales contenant du gluten (l'avoine, le riz, blé et de l'orge) a été associée au développement de l'auto-immunité des îlots (Norris et al., 2003). La destruction auto immune des îlots pancréatiques a été significativement associée aux enfants ayant des maladies gastro-intestinales et qui ont introduits le blé ou l'orge avant l'âge de 4 mois et après l'âge de 7 mois (Snell-Bergeon et al., 2012). Les antigènes protéiques de blé peuvent induire une réponse inflammatoire dans l'intestin (Chakir et al., 2005) et pourraient donc préparer le système immunitaire à une réponse néfaste à l'infection par un agent viral notamment les entérovirus qui ont été trouvés dans les tissus pancréatiques de patients atteints de diabète de type 1 (Richardson et al., 2009).

D'autre part, la variation géographique influe sur le taux d'incidence du diabète de type 1 qui suit un gradient Nord-Sud (LaPorte et al., 1995).

Plusieurs études ont démontré un gradient latitudinal de l'incidence du DT1 car l'incidence augmente en s'éloignant de l'équateur et inversement avec les rayonnements ultraviolets (UVR) qui sont connus pour leur rôle immunorégulateur notamment dans la synthèse de la vitamine D (LaPorte et al., 1995 ; Shoenfeld et al., 2009).

Cette vitamine s'avère protectrice car un niveau élevé de 25-hydroxyvitamine D peut retarder la progression vers le DT1 (Mäkinen et al., 2014, Mäkinen et al., 2016).

Cela s'explique par le fait que la Vitamine D joue un rôle important dans l'homéostasie du glucose en stimulant l'expression du récepteur de l'insuline et le transport du glucose en

Introduction générale
réponse à l'insuline (Maestro et al., 2000) et favorise la protection des cellules β contre les réponses immunitaires (Wolden-Kirk et al., 2011) car le calcitriol cible les CPA (les cellules dendritiques myéloïdes (M-DC) leur conférant un profil tolérogène stable et durable. Ces cellules M-DC régulatrices induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs spécifiques d'un antigène (Adorini and Penna, 2009), en plus, les cellules M-DC induisent la délétion clonale des lymphocytes T autoréactifs (Van Halteren et al., 2004). L'incidence de diabète de type 1 est réduite de façon significative avec des suppléments de vitamine D, soit chez les nourrissons à risque ou leurs mères pendant la grossesse (The EurodiabSub study 1999, Bener et al., 2008).

De plus, l'hérédité s'ajoute aux autres facteurs jouant un rôle dans la pathogénèse du DT1, ainsi plusieurs études menées à Tlemcen en Algérie (Dali-Sahi and Benmansour, 2014) en Allemagne (Cardwell et al., 2010), au Royaume-Uni (Marshall et al., 2004) et en Egypte ont démontré une association positive entre le DT1 et les antécédents familiaux de DT1 (Awadalla et al., 2017).

À ce jour, aucun de ces facteurs n'a été démontré de manière concluante pour influencer le risque de DT1

Par ailleurs, ces diabétiques courent des risques de complications chroniques que ce soit des complications microvasculaires (néphropathie diabétique, neuropathie et rétinopathie) et macrovasculaires (maladie coronarienne, maladie artérielle périphérique et accident vasculaire cérébral).

Les complications microvasculaires essentiellement la neuropathie a été retrouvé chez les adolescents diabétiques de type 1 ayant une durée comprise entre 2 et 5 ans, suggérant que la durée de 2 ans est appropriée pour commencer le dépistage (Cho et al., 2011; Demirel et al. 2013).

Plusieurs études ont corrélé le développement des complications macrovasculaires et microvasculaires avec l'élévation du nombre de leucocytes (Tong et al., 2004 ; Chung et al., 2005; Tsai et al., 2007). Ainsi le nombre de leucocytes est devenu un marqueur inflammatoire largement répandu dans la pratique clinique. Les leucocytes peuvent être activés par les produits finaux de la glycation, le stress oxydatif résultant de l'hyperglycémie et peuvent produire des facteurs comme le facteur de nécrose tumorale α et l'interleukine β 1 qui sont impliqués dans la pathogénèse des complications du diabète chronique (Vlassara et al., 1988; Andersen et al., 1996; Heidland et al., 2001).

Le mécanisme pathologique central de la maladie macrovasculaire est le processus d'athérosclérose qui résulte d'une inflammation chronique et d'une lésion de la paroi artérielle dans le système vasculaire périphérique ou coronaire, induisant un rétrécissement des parois artérielles dans tout le corps (Boyle, 2007).

Ainsi, l'initiation et la progression de l'athérosclérose sont conditionnées par les leucocytes qui libèrent des cytokines entraînant le recrutement des macrophages et la prolifération des cellules musculaires lisses au niveau des parois vasculaires. D'autre part, la sécrétion de protéase entraîne des lésions endothéliales des vaisseaux

Introduction générale coronaires, exposant le collagène thrombogène et prédisposant les vaisseaux à la formation de thrombus (Cheng et al., 2008). En cas de stress, les plaquettes activées favorisent l'adhésion des neutrophiles à la matrice sous – endothéliale (Chirkov et al., 2001). Les plaquettes synthétisent également l'interleukine-1 bêta (IL-1 β), qui est un médiateur de l'activation des cellules endothéliales, ces dernières induisent des chimiokines qui régulent à la hausse les molécules qui favorisent l'adhésion endothéliale des neutrophiles et des monocytes (Davì and Patrono, 2007).

Dans cet élan, les risques accrus des maladies coronariennes ont été associés à des niveaux élevés du nombre total de globules blancs, tous les sous-types de globules blancs, y compris monocytes (Neto et al., 2006), les éosinophiles (Umemoto et al., 2000), neutrophiles (Wheeler et al., 2004), et lymphocytes (une relation inverse), (Sakatani et al., 2004).

En outre, l'étude prospective de Paris II a montré qu'un nombre élevé de monocytes est lié aux maladies coronariennes et s'avère un prédicteur indépendant du dépôt de plaque d'athérome et de l'épaississement de l'intima-média carotidienne (Olivares et al., 1993).

De plus, la présence d'éosinophiles est un marqueur inflammatoire impliqué dans la modulation des réponses immunitaires au niveau des sites inflammatoires. Leur surface apporte des récepteurs d'histamine H4 facilitant la chimiotaxie des éosinophiles vers les mastocytes, qui sont les principaux producteurs d'une gamme de médiateurs inflammatoires solubles (Minai- Fleming and Levi-Schaffer, 2009).

D'autre part, le volume plaquettaire moyen (VPM) est un paramètre qui indique la taille des plaquettes. C'est un biomarqueur potentiel de la réactivité plaquettaire car les grosses plaquettes sont plus réactives que les petites ; de plus, son augmentation est significativement corrélée à la durée du diabète (Chu et al., 2010).

L'étude menée par Ersoy et al., considère le VPM comme un marqueur de l'athérosclérose précoce chez les enfants atteints de DT1(Ersoy et al., 2015).

En outre, la dyslipidémie est un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires (Qi et al., 2015). Le trouble est caractérisé par un profil lipidique anormal, qui peut inclure des niveaux élevés de cholestérol total, de triglycérides, ou des niveaux réduits de cholestérol à lipoprotéines de haute densité (HDL-C) (Houston et al., 2018 ; Huang et al., 2009).

De plus, l'étude de Pal et al a montré que les lipoprotéines résiduelles contenant des triglycérides étaient présentes dans la plaque athérosclérotique humaine et ont fortement indiqué que les lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) participent au développement et à la progression de la lésion athéroscléreuse (Pal et al., 2003). D'autre part, les résidus TRL transportent plus de cholestérol par particules que les LDL, en raison de leur plus grande taille de ce fait, ces résidus ont un effet athérogène plus fort que le LDL (Rosenson et al. 2014).

À ce jour, plusieurs thérapies ont été conçues afin de moduler le système immunitaire dans le but d'arrêter la destruction des cellules bêta pancréatiques à court terme.

Des essais cliniques ont utilisé des anticorps anti-CD3 (hOKT31) qui ciblent les cellules T exprimant CD3 avec CD4 ou CD8 et suppriment ainsi les réponses immunitaires par déplétion transitoire des cellules T. Les patients ayant reçu ce traitement ont maintenu ou amélioré la production d'insuline sans effets indésirables stricts (Herold et al., 2005).

L'étude de Haller et al a montré que l'administration intraveineuse de l'ATG (Anti-Thymocyte Globulin) à faible dose (2,5 mg / kg) à des diabétiques récemment diagnostiqués a ralenti le déclin du peptide C et réduit l'HbA1c dans le DT1 nouvellement apparu. L'ajout de GCSF (pegylated granulocyte colony-stimulating factor) n'a pas amélioré la conservation du peptide C offerte par l'ATG à faible dose (Haller et al., 2018).

Un anticorps monoclonal anti-CD20 appelé le rituximab cible les lymphocytes B et les épuise. L'étude de Pescovitz et al a rapporté qu'un traitement unique de 4 semaines de rituximab dans les 3 mois suivant le diagnostic préserve de manière significative la fonction des cellules β et aussi une baisse d'HbA1c et une dose d'insuline plus faible à 1 an (Pescovitz et al., 2009).

L'administration de la protéine de fusion antigène-immunoglobuline des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4 – Ig ; L'abatacept) à des patients atteints de DT1 récemment diagnostiqués a la capacité de moduler la co-stimulation des lymphocytes T en bloquant la délivrance des signaux de co-stimulation CD80 et CD86 aux cellules T et empêche ainsi l'activation complète des lymphocytes T. L'abatacept a ralenti l'élimination de la cellule bêta. Cet effet bénéfique suggère que l'activation des lymphocytes T se produit toujours au moment du diagnostic clinique du diabète de type 1. L'effet initial du traitement a été maintenu pendant l'administration mensuelle d'abatacept pendant 24 mois, et a également persisté pendant au moins un an après l'arrêt du traitement (Rachid et al., 2020)

Un essai pilote d'un récepteur soluble du facteur de nécrose tumorale (TNF) (étanercept) a entraîné une baisse de la glycémie et une augmentation de la production d'insuline chez les patients (Mastrandrea et al., 2009).

La greffe des cellules souches hématopoïétiques autologues permet l'arrêt de la destruction auto-immune du tissu ciblé et le rétablissement de la tolérance par des mécanismes inconnus. Néanmoins un répertoire des récepteurs de cellules T diversifié (Muraro et al., 2014) et la réactivation du thymus ont été observés (Alexander et al., 2009). Selon l'étude de Ye et al, les patients traités sont devenus à court-terme insulino-indépendants, ce qui en fait une thérapie prometteuse pour le DT1 (Ye et al., 2017).

Une autre approche qui vise à rétablir la tolérance aux antigènes spécifiques aux cellules bêta a utilisé un traitement avec la protéine de choc thermique 60 (HSP60) (un peptide de 24 acides aminés appelé peptide 277 : p277) (Elias and Cohen, 1994), dont on pense qu'il peut signaler directement les cellules T humaines via le récepteur inné Toll-like (TLR-2) (Nussbaum et al., 2006). Une étude montre que les diabétiques ayant reçu le vaccin nécessitent une insuline exogène significativement moins élevée pour atteindre le même niveau de

HbA1c (7%) à la fin de l'essai. (Raz et al., 2001).

La vaccination à ADN spécifique à l'antigène de la cellule β s'est avérée infructueuse chez les patients DT1. L'expression médiée par l'ADN plasmidique (ADNp) de la proinsuline ou GAD65 a démontré une protection uniquement transitoire (Weaver et al., 2001 ; Solvason et al., 2008 ; Roep et al., 2013).

Tandis que l'approche utilisant une vaccination qui délivre l'ADNp de plusieurs épitopes / mimotopes à partir de plusieurs antigènes de cellules β présentés efficacement aux cellules T CD4 + et CD8 + pourrait induire une meilleure tolérance qui retardera le développement du DT1 (Dastagir et al., 2017).

De plus la co-délivrance des vecteurs d'ADNp exprimant quatre antigènes complets (proinsuline, protéines GAD65, ChgA et IGRP) protégeait plus de souris. (Postigo-Fernandez and Creusot, 2019).

La délivrance de plusieurs épitopes a abouti à un large recrutement des cellules T spécifiques, provoquant une réponse distincte des épitopes endogènes drainant les îlots. Les phénotypes des lymphocytes T varient également avec la spécificité de l'antigène. De plus, le répertoire des cellules T réactives au même épitope est hautement polyclonal. Malgré l'induction de certaines cellules T régulatrices CD25 + Foxp3 +, la protection contre la maladie n'a pas persisté après l'arrêt du traitement (Postigo-Fernandez and Creusot, 2019).

Dans le but ; de combler l'effet temporaire des thérapies précédemment citées. D'autres thérapies ont été développées et testées sur des souris NOD. Il s'agit d'interventions qui induisent la tolérance vis-à-vis d'un antigène spécifique et ceux qui modulent le système immunitaire de façon aspécifique ceci a été mené par l'étude de Takiishi et al qui ont restauré la tolérance en administrant dans la muqueuse intestinale de la souris de *Lactococcus lactis* génétiquement modifié pour sécréter l'auto-antigène complet de la proinsuline ainsi que la cytokine immunomodulatrice IL-10. Cette thérapie combinée a induit une augmentation de la fréquence des Tregs locaux qui s'accumulent dans les îlots pancréatiques et la suppression des réponses immunitaires de manière spécifique à l'auto-antigène (Takiishi et al., 2012).

Une autre approche de thérapie combinée a été menée par Von Herrath et al sur des diabétiques récemment diagnostiqués. Ils ont procédé à une modulation du système immunitaire de façon aspécifique en administrant des anticorps anti-IL21 et en améliorant la fonction des cellules bêta par l'administration de liraglutide. Ce traitement combiné avait une amélioration de 48% de la sécrétion de peptide C stimulée par les repas par rapport au placebo à 54^{ème} semaine associé à une diminution des besoins en insuline de 0,13 U / kg. Cependant ces effets bénéfiques n'ont été conservés que juste 26 semaines après l'arrêt du traitement (von Herrath et al. 2021).

Ce travail abordera en premier lieu le rôle de la génétique dans la survenue du DT1 chez les enfants de l'extrême ouest Algérien. Dans un deuxième lieu vérifier les différentes hypothèses environnementales et perspectives thérapeutiques envisagées quant à la prévention du DT1 dans les populations de l'extrême ouest Algérie.

DEUXIEME PARTIE

Matériel et Méthodes

1. Population d'étude

Pour répondre à notre problématique, nous avons mené une étude analytique rétrospective. Le groupe des cas (les sujets atteints du diabète de type 1) comporte 717 sujets et le groupe des témoins est constitué de 959 sujets.

Les sujets de notre population d'étude sont répartis au hasard entre différentes régions de la wilaya de Tlemcen.

2. Le recrutement des sujets

Cette étude analytique, rétrospective s'est déroulée entre 2015 et 2019 au niveau des différents centres hospitaliers de la wilaya de Tlemcen.

Notre population d'étude (cas-témoins) a été recrutée auprès des enfants, adolescents, jeunes adultes, adultes après avoir obtenu l'accord des adultes et celui des parents des sujets âgés de moins de 19 ans.

3. Le recueil des données

Le recueil de données s'est fait pour une partie via un questionnaire en interrogeant les parents des enfants et des adultes, pour une autre partie à partir des données des dossiers médicaux.

3.1. Le questionnaire

Les renseignements ont été notés de manière à rassembler les données de chaque patient qui sont d'ordre sociodémographiques, anthropométrique, antécédents familiaux, antécédents personnels, le type d'allaitement, les antécédents aux infections virales (voir questionnaire).

3.2. Le dossier médical

Le dossier médical a servi de support pour les informations qui ont contribué à l'élaboration et au suivi du diagnostic et du traitement et ceux d'ordre biologique et clinique.

4. Critères d'évaluation des malades

Tous les patients diabétiques qui se présentaient pour un contrôle médical au niveau du service de pédiatrie ont été invités à participer à cette étude.

4.1. Critère d'inclusion

- L'étude a inclus tous les patients présentant un diabète de type 1 qui a été diagnostiqué par des spécialistes selon les critères de l'American Diabetes Association (ADA, 1997) et OMS (OMS, 2011) et les recommandations en matière de diagnostic, dépistage et classification du diabète, approuvées par le NIH et par l'OMS ont été retenues, à savoir :

- La présence des symptômes classiques d'hyperglycémie et d'une analyse de sang anormale. Glycémie (concentration plasmatique de glucose) ≥ 126 mg/dl) et par un autre test, appelé HbA1C, est fait pour renseigner sur la qualité de l'équilibre métabolique au cours des 2 ou 3 derniers mois et pour orienter la prise de décisions thérapeutique.
- Patients qui acceptent de faire un prélèvement sanguin.

4.2. Critère de non inclusion

Patients qui refusent de participer à l'étude.

Patients refusant de faire un prélèvement sanguin.

5. Critères d'évaluation des témoins

Les sujets témoins sont retenus comme tel si leur taux de glycémie est inférieur à 1,26g/l et s'ils n'avaient jamais reçu d'hypoglycémifiants.

5.1. Critères d'inclusion

Sujets des deux sexes, résidants à Tlemcen.

Sujets sains ne développant aucune pathologie.

5.2. Critères de non inclusion

Sujets atteints d'une pathologie auto-immune.

Sujets prenant des médicaments au moment du prélèvement (corticoïdes)

Sujets refusant de faire un prélèvement sanguin

6. Prélèvements et paramètres étudiés.

Les prélèvements sanguins des sujets ont été réalisés par les professionnels de la santé, le sang a été collecté dans des tubes EDTA.

Les tubes EDTA ont été utilisés car l'EDTA est un anticoagulant et inhibiteur des nucléases par séquestration des ions magnésium Mg^{2+} bloquant ainsi leurs activités et de ce fait, on obtient de l'ADN intact permettant la récolte d'une banque d'ADN.

Les numérations globulaires, y compris la numération des globules blancs et les différentiels, l'hémoglobine, les plaquettes ont été analysés en utilisant l'analyseur d'hématologie automatisé Beckman Coulter 750 par méthode d'impédance.

Les paramètres du profil lipidique ont été analysés à l'aide de Roche Modular P800 en utilisant des méthodes standard. Les taux de cholestérol total (CT), de TG et de HDL-C ont été mesurés. Les taux de LDL-C ont été calculés par la formule de Friedewald en utilisant les données lipidiques disponibles (Warnick et al., 1990).

6.1. Les variables d'intérêts

Les variables recueillies se subdivisent en deux catégories : les variables qui servent à l'analyse comparative et les variables propres à la description de l'échantillon.

Les variables servant à l'analyse comparative sont :

- Consanguinité.
- Les antécédents familiaux de diabète, de type 1 et de type 2.
- Les antécédents par rapport à l'allaitement (maternel, artificiel, mixte).
- Les antécédents par rapport aux infections virales.
- Le profil hématologique et lipidique

Les variables propres à la description de l'échantillon sont :

- Géographie
- La tranche d'âge.
- Le sexe.
- Le type d'habitat (maison collective, individuelle).
- La glycémie à jeun, l'âge de révélation du diabète et l'hémoglobine glyquée.
- Indice de masse corporelle (IMC).

7. Extraction de l'ADN par la technique NaCl (salting out).

L'ADN a été extrait par la technique de relargage des protéines à force ionique élevée dénommée salting out (Miller et al., 1989) (par le chlorure de sodium NaCl) qui présente l'avantage de ne pas avoir un risque de toxicité par des produits dangereux comme le phénol en plus de sa rapidité et facilité.

7.1. Techniques d'extraction

7.1.1. Lyse des globules rouges

Le sang initialement décongelé est mélangé à une solution hypotonique TE10/10(Tris/HCl10mM, EDTA 10mM ;pH=8,0). Les tubes sont mis dans la glace pendant 30 minutes (l'action conjuguée du Tris et du froid provoque un choc hypotonique qui éclatera la membrane des globules rouges) puis centrifugés à 2500 tours/mn pendant 15 mn. La centrifugation permettra la séparation des débris de globules rouges contenus dans le surnageant du culot de globules blancs précipités au fond du tube. Après élimination du surnageant, Ce lavage est répété en centrifugeant à 3000 tours/mn pendant 15mn jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre correspondant aux globules blancs dépourvus de globules rouges.

7.1.2. Lyse des leucocytes

Le culot de globules blancs est traité par 5ml de solution de lyse de globules blancs (Tris/HCl 10mM, EDTA 0,1M et SDS 0,5% ; pH=8,0) et 125µl de protéinase K pour digérer les protéines associées à l'ADN nucléaire. Après homogénéisation, le mélange est incubé au bain marie à 37°C pendant une nuit.

L'action combinée de l'EDTA (chélateur d'ions bivalents, inhibiteur de l'activité des DNases) et celle de SDS (un puissant détergeant qui lyse les membranes cellulaires) qui provoqueront la dissociation des acides nucléiques.

7.1.3. Précipitations des protéines.

Deux millilitres de NaCl 5M sont ajoutés dans chaque tube et mélangés vigoureusement. Après une centrifugation de 4000 tours/mn pendant 10 minutes, le surnageant contient l'ADN et le culot renferme les débris cellulaires, protéiques.

7.1.4. Précipitation de l'ADN.

Après récupération du surnageant, deux volumes d'éthanol absolu froid est rajouté dans chaque tube suivis d'un retournement de tube qui apprêtera l'ADN sous forme d'un filament d'ADN (une méduse visible à l'œil).

La méduse d'ADN est ensuite lavée avec une solution d'éthanol à 70% afin d'éliminer les traces de sels puis la séchée et la récupérée dans un tube Eppendorf contenant 100 à 600µl de TE10/1(Tris/HCl 10mM et EDTA 1mM ;pH=8,0) selon la taille de la méduse.

Pendant 24h, les tubes seront mis sous agitation douce à une température ambiante, ensuite à 4 °C pour quelques jours.

7.2. Dosage et contrôle de qualité de l'ADN.

La méthode de spectrophotométrie est utilisée pour quantifier l'ADN en mesurant la densité optique à la longueur d'onde de 260nm pour des solutions diluées au 1/100 (20µl de l'échantillon, 1980 µl d'eau distillée). Sachant que l'ADN a un spectre d'absorption en U.V maximum à 260 nm, ce spectre d'absorption est proportionnel à la concentration de l'ADN sachant qu'une unité de densité optique à 260 nm équivaut à 50 µg/mL d'ADN double brin [ADN]=DO 260*facteur de dilution*50).

Afin de déterminer une éventuelle contamination par les protéines, la deuxième lecture est effectuée à une longueur d'onde de 280 nm.

Pour identifier la pureté de l'ADN, le rapport de DO 260nm/280nm est calculé. Cette valeur doit être proche de 1,8 reflétant un ADN correctement purifié.

8. Etude du polymorphisme HLADR3/DR4

8.1. Génotypage des allèles HLADR3/DR4 par sonde Taqman

Le génotypage par la méthode Taqman permet un criblage rapide des SNPs d'intérêt. Cette technique a été réalisée avec le thermocycleur Biorad CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) au niveau de l'institut Cochin (Inserm U1016- Université de Paris) par l'équipe du professeur Cécile Julier.

La technique Taqman utilisée pour le génotypage utilise deux sondes fluorescentes : une sonde complémentaire de l'allèle 1 marquée en 5' par le fluorophore FAM (excitation à 495 nm/émission à 515 nm) et une sonde complémentaire de l'allèle 2 marquée en 5' par le fluorophore VIC (excitation à 535 nm/émission à 555 nm). Au cours de la réaction en chaîne d'amplification (PCR, Polymerase chain reaction), les sondes fluorescentes s'hybrident à la séquence qui leur est complémentaire. Lorsque la Taq (Thermusaquaticus) polymérase synthétise le brin d'ADN complémentaire, elle clive ces sondes grâce à son activité 5' exonucléasique libérant ainsi le fluorophore et permettant son émission de fluorescence qui peut être quantifiée (Figure 1).

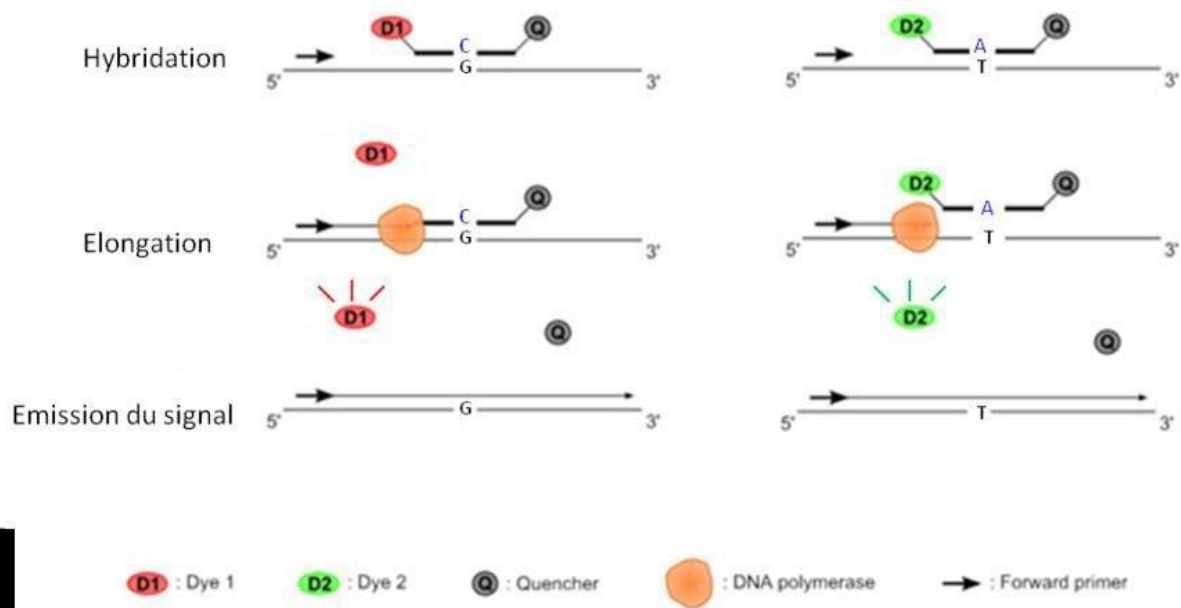


Figure 1. Principe de la méthode de génotypage par sondes Taqman (AppliedBiosystems).

1. Après dénaturation, il y a hybridation des amorces (primers) et de la sonde allèle-spécifique qui contient un fluorophore FAM (Dye 1) ou VIC (Dye 2) ainsi qu'un quencher, qui du fait de sa proximité empêche le fluorophore d'émettre son signal (principe de la méthode FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer).

2. Elongation grâce à la DNA polymérase et libération du fluorophore indépendamment du quencher

3. Emission de fluorescence FAM ou VIC selon le génotype de l'individu et détection du signal

8.2. Réaction PCR

Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 3 μ l : 1 μ l de Master Mix (AppliedBiosystem), 0,0375 μ l de sondes (Applied Biosystem), 1 μ l d'ADN à une concentration de 5 ng/ μ l et complété avec de l'eau. Le programme de PCR était le suivant : 92°C-10 sec + (92°C-15 sec +60°C-60 sec + lecture plaque) x (40 à 60 cycles) + 72°C -30 sec (courbe de fusion). Les génotypes sont assignés à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.1 en fonction de la fluorescence pour chaque allèle (Figure2).

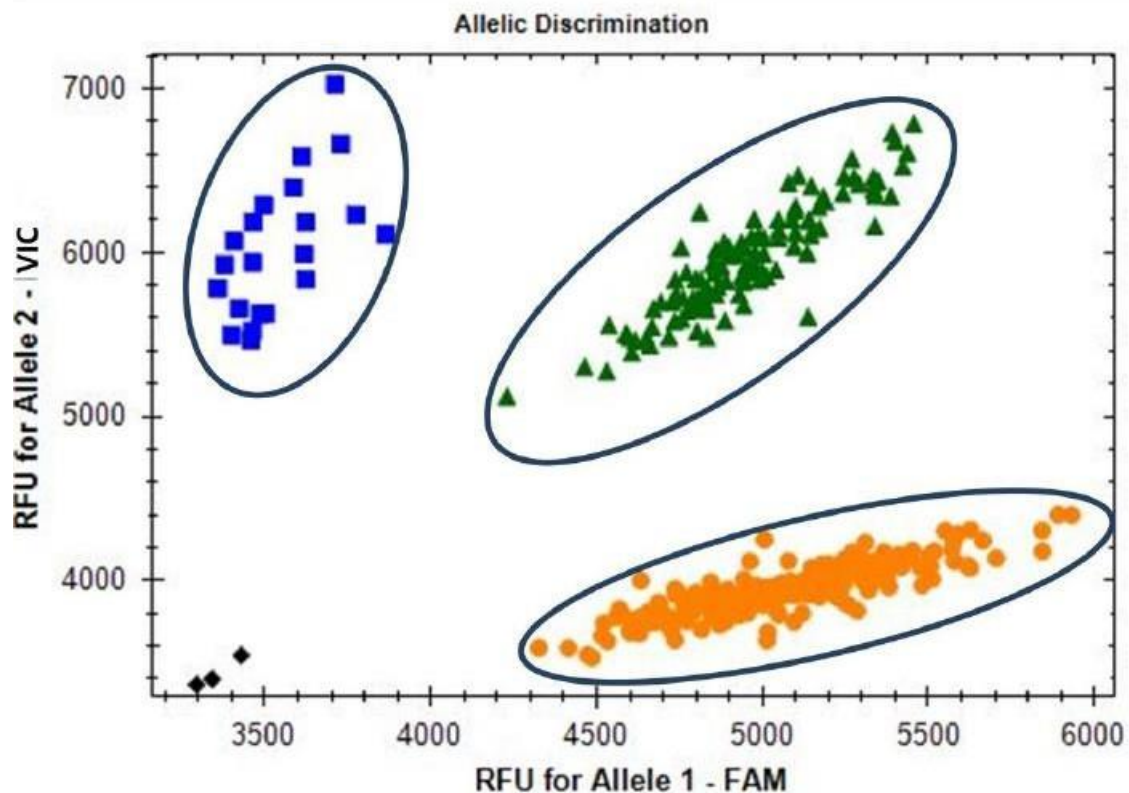


Figure 2. Capture d'écran des résultats obtenus sur le logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.1 pour le génotypage par sondes Taqman d'un SNP. Chaque symbole de couleur représente un sujet génotypé : les cercles oranges correspondent aux sujets homozygotes pour l'allèle 1 (émission du fluorophore FAM), les carrés bleus aux sujets homozygotes pour l'allèle 2 (émission du fluorophore VIC), les triangles verts aux sujets hétérozygotes pour les allèles 1 et 2 (émission des deux fluorophores). Les losanges noirs représentent les témoins négatifs (sans matrice) (émission de fluorescence sous le seuil).

8.3 Génotypage des SNPs rs2187668 et rs3104413 taggant HLADR3/DR4

Les SNPs rs3104413 (C/G) et rs2187668 (A/G) SNP ont été génotypés en utilisant Human Custom TaqMan Genotyping Assays 409 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) au niveau du Centre de recherche sur le diabète- Institut Haris Perkins en Australie mené par l'équipe du professeur Grant Morahan.

Les réactions ont été réalisées dans un volume total de 5 µl, en utilisant 2 ng d'ADN génomique, TaqMan Genotyping Master Mix 19 (Thermo Fisher Scientific), et Custom TaqMan Genotyping Assay 19.

Les plaques ont été positionnées dans un thermocycleur PCR en temps réel (ViiA7 Système de PCR en temps réel ; Thermo Fisher Scientific) et chauffé pendant 10 min à 95 °C, suivi de 50 cycles de 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 min.

9. Analyse immunoinformatique pour la détermination des épitopes viraux.

9.1. Programmes et bases de données utilisés

9.1.1. NCBI (ProteinDatabase)

Dans un premier temps, nous avons téléchargé les séquences protéiques de la base de données des protéines disponibles sur le site du NCBI " National Centre for Biotechnology Information " <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>.

Pour le virus de la varicelle, nous avons sélectionné les protéines du virus HHV3, pour le virus de la rougeole, nous avons sélectionné l'hémagglutinine glycoprotéine pour la souche Edmonston et Hsp60 d'Homo sapiens.

9.1.2. Blast

Le Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) trouve des régions de similarité locale entre les séquences de protéines et calcule la signification statistique des correspondances. Les séquences des protéines virales choisies ont été comparées à leur similarité avec la protéine humaine à l'aide du programme BLAST (Altschul et al. 1990) du serveur NCBI. Sur la base des résultats de BLAST, nous avons trouvé différentes séquences peptidiques qui étaient similaires entre les protéines humaines et virales, qui ont été sélectionnées pour l'analyse des liants et des non liants pour les allèles HLA de classe II : HLA-DR. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

9.1.3. LALIGN

Lalign de William Pearson est un programme d'analyse de séquence (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html). Il trouve de multiples sous-segments correspondants dans deux séquences. Le programme lalign met en œuvre l'algorithme de Huang et Miller (Huang 1991).

9.2. Établissement des liants et des non liants

9.2.1. Outil d'analyse IEDB

Le logiciel IEDB (Immune EpitopeDatabase) permet de prédire les peptides qui se lient aux molécules du CMH de classe II (<http://www.iedb.org/>) (Kolaskar et Tongaonkar 1990).

Nous avons utilisé la méthode recommandée par l'IEDB car elle essaie d'utiliser la meilleure méthode possible pour une molécule de CMH donnée. La méthode recommandée par l'IEDB utilise l'approche Consensus, combinant NN-align (Nielsen et Lund 2009), SMM-align (Nielsen et al. 2007), CombLib (Sidney et al. 2008) et Sturniolo (Sturniolo et al. 1999) si un prédicteur correspondant est disponible pour la molécule, sinon NetMHCIIpan est utilisé (Andreatta et al. 2015).

L'outil analyse les séquences de protéines d'entrée en 15 mers et prédit l'affinité de

Matériel et Méthodes
liaison pour chaque peptide. Il compare ensuite l'affinité prédite pour chaque peptide à celle d'un large ensemble de peptides sélectionnés au hasard pour déterminer son rang centile. La méthode du Consensus utilise le rang médian des trois méthodes constitutives. Sachant que le seuil recommandé pour la liaison au CMH II (rang percentile du Consensus IEDB) est de 10, nous ne sélectionnons que les peptides qui ont une affinité de liaison avec les molécules du CMH de classe II. Le serveur web peut être consulté librement par l'URL : <http://tools.iedb.org/mhcii/> (Wang et al. 2008 ; Wang et al. 2010).

9.2.2.Allèles utilisés dans l'étude

Les protéines du CMH humain, également connues sous le nom d'antigènes leucocytaires humains (HLA), sont des glycoprotéines qui fixent de petits fragments peptidiques, ou épitopes, provenant de protéines pathogènes et hôtes et les présentent à la surface cellulaire pour être reconnus par les lymphocytes T (Atanasova et al. 2011). L'activation des cellules T CD4+ helper est essentielle au développement de l'immunité adaptative contre les agents pathogènes (Rosenberg et al. 1997). Une étape critique de l'activation des cellules T CD4+ est la reconnaissance des épitopes présentés par les molécules du CMH de classe II (Rudolph et al. 2006).

Les protéines du CMH de classe II sont également codées par trois loci : HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP. Le site de liaison peptidique des protéines de classe II est ouvert, formé par deux chaînes protéiques distinctes : α et β (Janeway et al. 1999).

Les allèles HLA de classe II choisis pour la prédiction *in silico* prédisposent fortement les enfants diabétiques caucasiens et qui sont DR3 (DRB1 * 03 : 01) / DR4 (DRB1 * 04 : 01/02 / 04/05 / 08) (Honeyman et al. 1997) et l'haplotype DRB1 * 15 : 01-DQ A1 * 01 : 02-DQB1 * 06 : 02(DR2) qui protège les caucasiens contre le DT1 (Noble et Valdes, 2011).

La détermination expérimentale des motifs pour chaque allèle est prohibitive en termes de temps et de ressources. La seule alternative pratique est d'utiliser une approche bioinformatique.

9.2.3.L'auto-antigène

Les études chez les diabétiques de type 1 visant à identifier les épitopes des cellules T autoréactives se sont concentrées autour de quatre protéines : proinsuline (PI), GAD65, I-A2 et ZnT8 (Di Lorenzo et al. 2007) car elles sont les cibles principales des auto-anticorps. En outre, d'autres contributeurs identifiés complètent la gamme connue d'épitopes CD4 provenant de la protéine de choc thermique (Hsp)-60 (Juwono et Martinus 2016) et de la protéine liée à la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase (IGRP) spécifique à l'îlot (Mukherjee et al. 2005) ainsi que de la Hsp70 chez l'homme (Abulafia-Lapid et al. 2003).

9.2.4.Antigènes viraux

Les glycoprotéines du VZV induisent de fortes réponses immunitaires humorales tant chez les individus infectés naturellement que chez les personnes vaccinées contre la varicelle

ou le zona (Dubey et al., 1988 ; Weinberg et al., 2009).

La guérison de la varicelle est associée au développement d'une immunité à médiation cellulaire T spécifique du VZV (Arvin et al., 1986). Des cellules T effectrices et mémoires spécifiques du VZV ont été identifiées (Patterson-Bartlett et al. 2007 ; Sadaoka et al. 2008). Ces cellules reconnaissent des épitopes des produits géniques de IE62, IE63, ORF4 et ORF1 des glycoprotéines de surface gB, gC, gE, gH et gI (Arvin et al. 1986 ; Diaz et al. 1989 ; Arvin et al. 2002).

L'hémagglutinine, glycoprotéine de la rougeole, est responsable de la liaison aux récepteurs cellulaires des cellules hôtes cibles. La molécule d'activation lymphocytaire (SLAM) exprimée sur les cellules du système immunitaire et la nectine4 exprimée aux jonctions adhérentes dans les épithéliums fonctionnent comme les principaux récepteurs de la rougeole (Tatsuo et al. 2000 ; Takeda et al. 2011).

Des études ont montré que les anticorps spécifiques de la protéine H sont principalement responsables de la protection contre l'infection par la rougeole (de Swart et al. 2005 ; de Swart et al. 2009). De plus, les résultats de de Swart indiquent que les anticorps spécifiques de la protéine H sont le principal corrélat de la neutralisation du virus de la rougeole induite par la vaccination (de Swart et al. 2005).

9.3. Profil de sécrétion des cytokines

9.3.1. IL4Pred

Le serveur web IL4Pred discrimine les peptides inducteurs et non-inducteurs d'IL-4. Uniquement les peptides qui se lient aux molécules HLA ont été introduits. Il est disponible gratuitement à l'URL : <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il4pred/> (Dhanda et al. 2013a).

9.3.2. IFNepitope

Le serveur web IFNepitope disponible gratuitement à l'URL : <http://osddlinux.osdd.net/raghava/ifnepitope/index.php> nous a permis de discriminer les peptides producteurs d'IFN- γ des peptides négatifs (Dhanda et al. 2013b).

9.4. Prédiction de la structure 3D des peptides homologues

PEP -FOLD est une approche qui prédit les structures peptidiques à partir de séquences d'acides aminés entre 9 et 36 résidus. Il est disponible gratuitement sur l'URL <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/> (Thevenet et al. 2012).

Les propriétés stéréochimiques des modèles prédits ont été extraites du serveur RAMPAGE <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>, qui fournit des informations précises sur les résidus présents dans les régions favorisées. Nous retenons les modèles prédits en considérant un score en pourcentage (> 75%) de résidus présents dans la région favorisée.

9.5. Établissement du mimétisme structurel

TM-align est un algorithme de comparaison de structures de protéines indépendant de la séquence. Il génère une superposition optimale des deux structures construites sur l'alignement détecté, ainsi que la valeur du TM-score (Zhang et Skolnick 2005). Nous avons utilisé TM-score pour établir l'évaluation quantitative de la similarité structurelle des peptides basée sur les valeurs RMSD) (Xu et Zhang 2010). Il s'agit d'un serveur web disponible gratuitement via le site <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>.

10. L'analyse statistique

Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne \pm écart type et les variables qualitatives par le nombre d'observation ainsi que le pourcentage à l'aide du logiciel excel/2007.

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel MINITAB/version 16 pour une analyse de régression logistique afin d'identifier les variables explicatives qui sont liées au diabète de type 1 à l'aide des facteurs mesurés (la variable de réponse est ici notée Y, qui dénombre les sujets diabétiques de type 1 et les témoins (T), (D) étant la valeur de référence).

Les variables quantitatives sont présentées en moyenne \pm écart type et leurs comparaisons ont été faites par le test de t de student, tandis que les variables qualitatives sont présentées en valeurs absolues et/ou pourcentages (%) et comparées à l'aide du test chi-deux, pour chaque test le seuil de significativité étant fixé à $p=0,05$.

TROISIEME PARTIE
Résultats
et
Discussion

Chapitre 1

Description de la population

Chapitre 1 : Description de la population

1. Introduction

Le taux d'incidence du DT1 en Algérie était classé intermédiaire dans les années 2000, il a été augmenté lors de ces dernières années sachant qu'à Constantine (Algérie), une incidence moyenne du DT1 de 14,33 a été enregistré en 2000-2004 alors qu'une étude épidémiologique multicentrique, menée à Alger en 2011, a montré une incidence qui équivaut à 25 [1].

Une revue systématique menée par Diaz-Valencia et *al* a rapporté une augmentation de l'incidence du DT1 chez les hommes que chez les femmes âgées de plus de 15 ans dans 44 des 54 études considérées [2].

Les changements des tendances d'incidence du DT1 dans le monde soutiennent les connaissances actuelles sur l'étiologie du diabète de type 1 qui stipule que l'interaction des facteurs génétiques et non-génétiques déclenchent la réaction auto-immune [3].

Cette augmentation de la prévalence du diabète de type 1 induit en contre parti l'augmentation des complications du diabète [4, 5]. Étant donné que la durée du diabète contribue grandement au développement des complications, il est inquiétant de constater que c'est les jeunes enfants qui sont touchés puisque le risque de maladie coronarienne et d'infarctus aigu du myocarde est 30 fois plus élevé chez les patients diagnostiqués avec un diabète de type 1 âgés de moins de 10 ans [6].

Dans la présente étude, on a établi des caractéristiques anthropométriques et biologiques qui vont nous permettre d'étudier pour les prochains chapitres l'étiopathologie du DT1 dans notre population en premier lieu et en deuxième lieu d'établir les profils hématologiques et lipidiques associés aux complications du diabète.

2. Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude descriptive portée sur une population de 717 diabétiques de type 1 et 959 témoins. Les enquêtes ont été conduites entre 2015 et 2019 au niveau de la ville de Tlemcen. Différents caractéristiques anthropométriques et biologiques ont été rapportées.

Les diabétiques de type 1 ont été inclus à l'étude suite au diagnostic établi par les spécialistes selon les recommandations de l'American Diabetes Association [7] et l'OMS [8].

Les témoins ont été recrutés parmi les enfants, adolescents, jeune adultes et adultes ayant consultés pour un motif autre que les pathologies auto-immunes.

Le recueil des données anthropométriques et biologiques a été rapporté à partir du questionnaire et/ou du dossier médical.

3. Analyses statistiques

Les données ont été traitées par le logiciel Excel 2007. Les résultats sont présentés en nombre d'observation et en pourcentage pour les variables qualitatives et en moyenne \pm écart type pour les variables quantitatives.

Le logiciel MINITAB/version 16 nous a permis d'établir la comparaison entre les variables quantitatives par le test de « t » de *student* alors que les variables qualitatives ont été comparées à l'aide du test chi-deux, pour chaque test le seuil de significativité étant fixé à $p=0,05$.

4. Résultats

Notre étude est réalisée sur un échantillon de 1676 individus dont 717 diabétiques de type 1 et 959 témoins répartis aux hasards sur trois zones d'études : la plaine, les monts et littoral de la wilaya de Tlemcen. Les sujets diabétiques et témoins sont issus majoritairement des plaines (78.66% vs 84.88%) respectivement alors que 19.94% des diabétiques sont issus des monts de Tlemcen contre 12.20% pour les témoins par ailleurs une minorité d'entre eux est issue du littoral de Tlemcen dont 1.40 % des diabétiques et 2.92% de témoins (tableau1).

L'âge moyen des diabétiques recrutés est de 22 ans \pm 15 ans et celui des témoins est de 26 ans \pm 18ans. L'âge moyen de la survenue du diabète est de 5 ans \pm 4 ans.

Pour la répartition des tranches d'âge, les adultes dont l'âge est supérieur à 25 ans sont les plus majoritaires tant têt pour la population des diabétiques (33.61%) que pour la population des témoins (45.15%). On note aussi une légère différence de fréquence des sujets diabétiques adolescents âgés entre 11-19 ans (30.68%) comparant aux témoins (18.04%).

D'autre part, la population des diabétiques et celle des témoins sont équilibrées en nombre d'enfants âgés entre 0-10 ans (24.69% vs 23.25%) et en nombre de jeunes adultes (20-25 ans) (11.02% vs 13.56%).

Pour la répartition des sexes, le nombre de sujets diabétiques de sexe masculin s'élève à 326 soit 45.47% contre 391 sujets de sexe féminin soit 54.53%.

Concernant le type d'habitat, la plupart des sujets diabétiques et témoins occupent des maisons collectives soit (70.56% contre 90%) respectivement alors que le reste occupe des maisons individuelles (29.44% contre 10%).

Dans notre population d'étude, la population des diabétiques et celle des témoins présentent généralement un indice de masse corporelle (IMC) normal compris entre [18-25 kg/ m²] leurs fréquences respectives sont équivalent à (46.04% vs 43.84%).

Parmi les cas, on a 30.22% d'individus (maigres) ayant un IMC inférieur à 18 kg/ m² contre 39.73% chez les témoins.

Les fréquences des cas et témoins en surpoids (IMC compris [25-30 kg/ m²]) sont respectivement égales à (11.15% contre 08.90%).

On note une différence de fréquence entre cas et témoins qui présentent une obésité (IMC>30 kg/ m²) puisqu'on a retrouvé 12.59% de cas contre 07.53% de témoins (tableau1).

Tableau 1. Les variables propres à la description de l'échantillon.

Variables descriptives		Cas		Témoins	
		Nombre des cas retrouvés	Nombre total des cas	Nombre des témoins retrouvés	Nombre total des Témoins
Géographie					
	Plaine	564 (78.66%)	717	814 (84.88%)	959
	Monts	143 (19.94%)		117 (12.20%)	
	Littoral	10 (1.40%)		28 (2.92%)	
Moyenne d'âge (ans)		22±15	717	26±18	959
Médiane (ans)		17		23	
Age (ans)			717		959
	0-10 ans	177 (24.69%)		223 (23.25%)	
	11-19 ans	220 (30.68%)		173 (18.04%)	
	20-25 ans	79 (11.02%)		130 (13.56%)	
	>25 ans	241 (33.61%)		433 (45.15%)	
Sexe			717		959
	Masculin	326 (45.47%)		339 (35.35%)	
	Feminin	391 (54.53%)		620 (64.65%)	
Age de survenu du DT1 (ans)		5±4	717	/	/
Type d'habitats	Collectif	163 (70.56%)	231	81 (90%)	90
	Individuel	68 (29.44%)		9 (10%)	
Indice de masse corporelle (IMC) (kg/m ²)	<18	84 (30.22%)	278	58 (39.73%)	146
	[18-25]	128 (46.04%)		64 (43.84%)	
	[25-30]	31 (11.15%)		13 (08.90%)	
	[30-35]	35 (12.59%)		11 (07.53%)	

kg/m² : kilogramme/metre²

Le tableau 2 indique que la fréquence des sujets diabétiques issus d'une famille consanguine (34.73%) est significativement plus élevée que celle des témoins qui est égale à 27.01%. Le taux de consanguinité dans notre population d'étude est égal à 30.31%. Cette différence est statistiquement significative avec un $p\text{-value} = 0,000$.

Pour les antécédents familiaux du diabète de type 1, on a retrouvé une fréquence de 50.77% pour les diabétiques qui est plus élevée à celle des témoins qui est égale à 46.82% néanmoins cette différence n'est pas significative.

D'autre part, on remarque que 68.97% des cas ont des antécédents familiaux du diabète de type 2 qui est significativement plus élevé comparant aux témoins (47.73%) avec un $p\text{-value} = 0,001$.

La fréquence des sujets diabétiques qui ont été allaités uniquement au sein (54.25%) est plus importante que celle des témoins 41.80%. La fréquence des sujets diabétiques ayant bénéficié d'un allaitement au lait de vache est inférieure à celle des témoins (18.87% vs 27.05%). Pour les sujets diabétiques ayant reçu un allaitement mixte (entre lait maternel et lait de vache) leur fréquence est de 26.89% contre 31.15% pour les témoins mais aucune différence significative n'a été enregistrée puisque le $p\text{-value}$ est égale à $p = 0,071$.

Concernant les antécédents d'infections virales, on a identifié un pourcentage élevé de diabétiques ayant contractés le virus de la varicelle (42.07%) par rapport aux sujets témoins (31.82%) sans que cette différence ne soit significative ($p=0,118$).

Par contre on a retrouvé une fréquence moindre de diabétiques ayant contractés la rougeole (19.31%) en comparaison avec celle des témoins (25%), cette différence n'est pas significative statistiquement (tableau2).

Tableau 2. Les variables servant à l'analyse comparative.

Variables servant à l'analyse comparative		Cas		Témoins		p-value
Consanguinité		249 (34.73%)	717	259 (27.01%)	959	<i>p = 0,001</i>
Degré de consanguinité	1	90 (12.55%) 151 (21.06%) 8 (11.16%)	717	129 (13.45%)	959	<i>p = 0,000</i>
	2			128 (13.35%)		
	3			2 (0.21%)		
Antécédents familiaux de DT1		364 (50.77%)	717	449 (46.82%)	959	<i>p = 0,110</i>
Antécédents familiaux de DT2		100 (68.97%)	145	42 (47.73%)	88	<i>p = 0,001</i>
Allaitement	Maternel	115 (54.25%)	212	51 (41.80%)	122	<i>p = 0,071</i>
	Artificiel	40 (18.87%)		33 (27.05%)		
	Mixte	57 (26.89%)		38 (31.15%)		
Antécédent d'infections virales	Varicelle	61 (42.07%)	145	28 (31.82%)	88	<i>p = 0,270</i>
	Rougeole	28 (19.31%)	145	22 (25%)	88	
Antécédent d'infection par la varicelle	Présence	61 (42.07%)	145	28(31.82%)	88	<i>p = 0,118</i>
	Absence	84(57.93%)	145	60(68.18%)	88	
Antécédent d'infection par la rougeole	Présence	28 (19.31%)	145	22 (25%)	88	<i>p = 0,305</i>
	Absence	117 (80.69%)	145	66 (75%)	88	

Dans cette population d'étude, les diabétiques inaugurent en moyenne la maladie à l'âge de 5 ± 4 ans. La moyenne de l'hémoglobine glyquée est égale à $9.22 \pm 2\%$.

La moyenne de la glycémie à jeun est supérieure dans la population diabétique 1.86 ± 1.04 g/l par rapport à celle des témoins 0.89 ± 0.16 g/l (tableau 3).

Tableau 3. Les paramètres du bilan glucidique.

Paramètres	Cas 717	Témoins 59
Age de révélation du diabète (ans)	5 ± 4	/
Hémoglobine glyquée HbA1C (%)	9.22 ± 2	/
Le taux de la glycémie à jeun (g/l)	1.86 ± 1.04	0.89 ± 0.16

g/L : gramme/Litre

L'étude des paramètres lipidiques des cas et des témoins n'indique aucune différence significative pour le taux de cholestérol total et de triglycéride. Cependant on constate une différence significative entre la moyenne du cholestérol-LDL sans que cette dernière ne dépasse le seuil normal qui est de 1.3g/l mais les témoins ayant un taux plus élevé en cholestérol-LDL (LDL-C) sont plus nombreux (11.86%) par rapport aux cas (1.94%). D'autre part la moyenne du cholestérol-HDL (HDL-C) est significativement élevée comparativement à celle des diabétiques (tableau 4).

Tableau 4. Les paramètres du bilan lipidique des cas et des témoins

Paramètres		Cas 103	Témoins 59	p-value
Cholestérol Total (g/L)	Moyenne- écart type	1.60±0.35	1.56±0.34	<i>P= 0,477</i>
	Individus avec un taux normal	92 (89.32%)	54 (91.53%)	<i>P= 0,651</i>
	Individus avec un taux élevé	11(10.68%)	5 (8.47%)	
Triglycéride (g/L)	Moyenne- écart type	1.25±0.55	1.12±0.39	<i>P = 0,082</i>
	Individus avec un taux normal	61 (59.22%)	29(49.15%)	<i>P= 0,214</i>
	Individus avec un taux élevé	42 (40.78%)	30 (50.85%)	
LDL-C (g/L)	Moyenne- écart type	0.95±0.29	0.82±0.32	<i>P=0,011</i>
	Individus avec un taux normal	101 (98.06%)	52 (88.14%)	<i>P=0,008</i>
	Individus avec un taux élevé	2 (1.94%)	7 (11.86%)	
HDL-C (g/L)	Moyenne- écart type	0.40±0.06	0.50±0.23	<i>P=0,002</i>
	Individus avec un taux normal	60(58.25%)	40(67.80%)	<i>P=0,229</i>
	Individus avec un taux bas	43(41.75%)	19(32.20%)	

g/L : gramme/Litre

Les autres variables du bilan lipidique et hématologiques (tableau 5,6) sont étudiés dans les chapitres 5 et 4.

Tableau 5. Les paramètres du bilan lipidique des diabétiques avec et sans complications macrovasculaires.

Paramètres		Cas avec complications macrovasculaires 22	Cas sans complications macrovasculaires 81	p-value
Cholestérol Total (g/L)	Moyenne- écart type	1.80±0.38	1.55±0.32	<i>P=0.008</i>
	Individus avec un taux normal	16 (73%)	76 (94%)	<i>P=0.004</i>
	Individus avec un taux élevé	6 (27%)	5 (6%)	
Triglycéride (g/L)	Moyenne- écart type	1.45±0.65	1.19±0.5	<i>P = 0.093</i>
	Individus avec un taux normal	8 (36%)	53(65%)	<i>P=0.014</i>
	Individus avec un taux élevé	14 (64%)	28(35%)	
LDL-C (g/L)	Moyenne- écart type	1.05±0.35	0.93±0.27	<i>P=0.147</i>
	Individus avec un taux normal	21 (95%)	80(99%)	<i>P=0.114</i>
	Individus avec un taux élevé	1 (5%)	1(1%)	
HDL-C (g/L)	Moyenne- écart type	0.42±0.06	0.4±0.058	<i>P=0.172</i>
	Individus avec un taux normal	14 (64%)	46(57%)	<i>P=0.564</i>
	Individus avec un taux bas	8(36%)	35(43%)	

g/L : gramme/Litre

Tableau 6. Paramètres hématologiques associés au DT1

Paramètres hématologiques	Taux	Cas 410	Témoins 690	p-value
Les globules blancs (GB x 10 ⁹ /L)	Taux normal	200 (48.78%)	593 (85.94%)	<i>p=0.0001</i>
	Taux bas	55 (13.41%)	19 (2.76%)	
	Taux élevé	155 (37.81%)	78 (11.30%)	
Monocytes (x 10 ⁹ /L)	Taux normal	211 (51.46%)	515 (74.64%)	<i>p= 0.033</i>
	Taux bas	11 (2.68%)	39 (5.65%)	
	Taux élevé	188(45.86%)	136 (19.71%)	
Eosinophiles (x 10 ⁹ /L)	Taux normal	166 (40.49%)	641 (92.90%)	<i>p=0.0001</i>
	Taux bas	244(59.51%)	49 (7.10%)	
Hématocrite (%)	Taux normal	155 (37.80%)	603 (87.39%)	<i>p=0.000</i>
	Taux bas	233 (56.83%)	78 (11.30%)	
	Taux élevé	22 (5.37%)	9 (1.31%)	
Vitesse de sédimentation à 1h/mm (VS 1h/mm)	Taux normal	33 (8.05%)	175 (25.36%)	<i>p=0.032</i>
	Taux élevé	377(91.95%)	515 (74.64%)	
Numération Plaquettaire (x 10 ⁹ /L)	Taux normal	355(86.59%)	690(100%)	<i>p=0.002</i>
	Taux bas	55(13.41%)	0(0%)	
Volume plaquettaire moyen (VPM) (fL)	Taux normal	266 (64.88%)	603 (87.39%)	<i>p=0.006</i>
	Taux élevé	144(35.12%)	87(12.61%)	

10⁹/L: giga/Litre ; **fL** :femtolitre

5. Discussion

L'étude descriptive a permis d'établir le profil de la population en étudiant des variables descriptives qui regroupent l'anthropométrie, la géographie et des variables comparatives qui étudie les facteurs de risque au diabète déjà rapporté par la littérature tel que la consanguinité, les antécédents familiaux au diabète, le type d'allaitement et les antécédents aux infections virales.

La population regroupe majoritairement des diabétiques et témoins habitants les monts et les plaines de Tlemcen.

La particularité de l'étude réside dans l'âge auquel les diabétiques inaugurent le diabète qui est de 5 ± 4 ans significativement diminué comparativement à la moyenne de $7,5 \pm 4,0$ ans enregistré pour la période 2012-2014 dans l'étude épidémiologique menée à Oran (extrême ouest Algérien) et significativement bas par rapport à la moyenne de $8,9 \pm 3,8$ ans retrouvé en 2002-2004 [1]. Ceci conforte les résultats de l'étude de Dali et Benmensour menée au niveau de la ville de Tlemcen qui rapporte que l'exposition au diabète de type 1 se situe au niveau du passage du stade nourrisson (âge < 2 ans) et au stade enfants-adolescents (2 à 21 ans) [9].

En ce qui concerne le sexe ratio, on a constaté que les sujets de sexe féminin sont plus importants comparant à ceux de sexe masculin contrairement à l'étude de Dali et Benmensour qui ont démontré qu'un enfant de sexe masculin a un risque d'exposition au diabète multiplié par 1.63 par rapport à un sujet féminin [9].

D'autre part, la majorité des diabétiques habitent les maisons collectives, ceci dit, il a été retrouvé que ce type d'habitat est un facteur d'exposition au diabète de type 1 [9].

En effet, l'obésité est malheureusement en expansion chez les enfants dans de nombreux pays du monde ; à cette constatation inquiétante, on explore la part des diabétiques en surpoids ou en obésité qui sont plus nombreux comparant aux témoins, cependant cette différence n'est pas significative.

Néanmoins, l'étude de Wilkinat al a rapporté que plus l'IMC d'un enfant est élevé plus il inaugure le diabète tôt [10], cependant ceci n'a pas été confirmé par les études de Betts et al et l'étude de Porter et Barrett [11, 12].

Les arguments en faveur de la part de la consanguinité dans la survenue du diabète de type 1 sont effectivement étayés. La consanguinité est indéniablement liée à la transmission du diabète de type 1 dans notre population d'étude [9, 13].

Cette association a été retrouvée dans la population Finlandaise où les apparentés au premier degré avaient 15 à 20% plus de risque de développer un DT1 par rapport à la population générale [14].

A propos de l'hérédité, l'étude univariée a montré que seul les antécédents familiaux au diabète de type 2 sont associés au diabète de type 1 prouvant que l'hérédité à la maladie est depuis longtemps indiscutable [15].

L'étude univariée montre que le type d'allaitement n'est pas associée au diabète de type 1 sachant que l'allaitement maternel exerce un effet protecteur contre la survenue de la maladie puisque le lait contient une variété de composants immuno-actifs et des cellules immunitaires viables [16] Les effets bénéfiques de l'allaitement maternel se poursuivent après le sevrage [17,18].

La courte durée de l'allaitement maternel et la consommation prolongée du lait de vache prédispose au diabète de type 1 car l'introduction de protéines étrangères dans la petite enfance est nuisible à la maturation du système immunitaire de l'intestin et à l'auto-immunité des cellules β [19]. Ceci a été affirmé par notre étude in silico menée par Benslama et al qui ont retrouvé un mimétisme moléculaire entre BSA et BLG qui partagent une homologie de séquence et de structure avec IA2 et GAD65 pour les diabétiques ayant la susceptibilité génétique HLADR3/DR4 [20].

Les antécédents aux infections virales ne s'avèrent pas associer au diabète de type 1 selon l'étude univariée par contre l'étude logistique et in silico détaillé dans le chapitre 3 a montré que les antécédents aux infections virales représentent un facteur de risque au DT1 associé aux antécédents familiaux aux diabètes.

L'étude des paramètres glucidiques indique une moyenne d'hémoglobine glyquée égale à $9.22 \pm 2\%$ qui est supérieure à 8% témoignant d'une dose d'insuline insuffisante et/ou d'erreurs dans le régime par contre une HbA1C supérieure à 10% est une preuve d'une injection non- effectuée et d'un régime non-suivi [21].

Concernant le profil lipidique, on n'a pas relevé une particularité en comparant ces paramètres entre les cas et les témoins mis à part que la moyenne du taux de cholestérol-HDL qui est significativement plus élevée comparant à celle des témoins. A cet effet, les données de la littérature suggèrent que plusieurs anomalies qualitatives des lipoprotéines sont décrites chez les patients atteints de diabète de type 1, notamment une augmentation du rapport cholestérol/triglycérides dans les VLDL, une augmentation des triglycérides dans les LDL-C et les HDL-C, des modifications de la composition de la couche périphérique des lipoprotéines, la glycation des apolipoprotéines, une oxydation accrue des LDL-C et une augmentation des particules sdLDL. Toutes ces anomalies peuvent être athérogènes. En outre, les particules de HDL-C des patients atteints de DT1 ont des propriétés antioxydantes et vasorelaxantes réduites les rendant moins efficaces pour favoriser l'efflux du cholestérol hors des cellules [22] .

Les paramètres lipidiques chez la population de diabétiques ayant les complications macrovasculaires en comparaison avec la population qui n'a pas inuguré ces complications et les paramètres hématologiques associées au diabète de type 1 seront discutés dans leurs chapitres respectifs (chapitres 5 et 4).

6. Conclusion

Plusieurs enseignements peuvent être tirés de cette étude descriptive notamment l'âge du diagnostic du diabète qui est diminué comparant à la population Oranaise voisine.

On a réaffirmé l'association entre le diabète de type 1 avec la consanguinité et les antécédents familiaux au diabète de type 2 dans la population de Tlemcen. Ceci nous mène à identifier la composante génétique en commençant par l'étude de le génotype de susceptibilité HLA DR3/DR4 et l'identification des facteurs environnementaux qui déclenchent la réponse auto-immune contre les cellules β pancréatiques.

L'hyperglycémie et la dyslipidémie retrouvées chez les diabétiques peuvent constituer des facteurs de risque important pour le développement des complications vasculaires chez les patients diabétiques d'où l'importance de l'étude du profil lipidique et hématologique afin de déceler les paramètres prédicteurs des complications macrovasculaires. Ceci avantagera les diabétiques car ces analyses sont peu couteuses.

7. Références

- [1] Niar S, Naceur M, Bessahraoui M, Bouchetara A, Zennaki A, Gharnouti M, et al. Épidémiologie du diabète de type 1 de l'enfant dans le département d'Oran (Algérie), de 1975 à 2014. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 2015;9(5):529-32.
- [2] Diaz-Valencia PA, Bougnères P, Valleron A-J. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC public health*. 2015;15(1):1-15.
- [3] Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(7):2403-7.
- [4] Hamman RF, Bell RA, Dabelea D, D'Agostino RB, Dolan L, Imperatore G, et al. The SEARCH for Diabetes in Youth study: rationale, findings, and future directions. *Diabetes care*. 2014;37(12):3336-44.
- [5] Dabelea D, Stafford JM, Mayer-Davis EJ, D'Agostino R, Dolan L, Imperatore G, et al. Association of type 1 diabetes vs type 2 diabetes diagnosed during childhood and adolescence with complications during teenage years and young adulthood. *Jama*. 2017;317(8):825-35.
- [6] Rawshani A, Sattar N, Franzén S, Rawshani A, Hattersley AT, Svensson A-M, et al. Excess mortality and cardiovascular disease in young adults with type 1 diabetes in relation to age at onset: a nationwide, register-based cohort study. *The Lancet*. 2018;392(10146):477-86.
- [7] American Diabetes Association 1997. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 28(1): S4-S34.
- [8] Use of glycosylated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Genève, World Health Organisation, 2011.
- [9] Dali-Sahi M, Benmansour D. évaluation du risque de survenue du diabète de type 1 sans une population consanguine de l'Ouest Algérien. *Lebanese Science Journal*. 2014;15(2):25.
- [10] Wilkin T. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(7):914-22.
- [11] Betts P, Mulligan J, Ward P, Smith B, Wilkin T. Increasing body weight predicts the earlier onset of insulin-dependant diabetes in childhood: testing the 'accelerator hypothesis'(2). *Diabetic medicine*. 2005;22(2):144-51.
- [12] Porter J, Barrett T. Braking the accelerator hypothesis? *Diabetologia*. 2004;47(2):352-3.
- [13] Khater S, Aouar A, Moqaddem Z, Hamdaoui H, Chabni N, Bendeddouche AS, et al. La consanguinité et le diabète de type 1 dans la population infantile de Tlemcen (Ouest Algérien). *مجلة أنثروبولوجية الألبان*. 614-25:1(16;2020).

[14] Karvonen M, Pitkäniemi J, Tuomilehto J. The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger. The Finnish Childhood Diabetes Registry Group. *Diabetes care*. 1999;22(7):1066-70.

[15] Kahn LB, Marshall JA, Baxter J, Shetterly SM, Hamman RF. Accuracy of reported family history of diabetes mellitus: results from San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes care*. 1990;13(7):796-8.

[16] Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*. 2003;21(24):3374-6.

[17] Campbell Jr D, Lorber M, Sweeton J, Turcotte J, Niederhuber J, Beer A. Breast feeding and maternal-donor renal allografts. Possibly the original donor-specific transfusion. *Transplantation*. 1984;37(4):340-4.

[18] Pereira PF, Alfenas RdCG, Araújo RMA. Does breastfeeding influence the risk of developing diabetes mellitus in children? A review of current evidence. *Jornal de pediatria*. 2014;90:7-15.

[19] Vaarala O. The gut immune system and type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;958(1):39-46.

[20] Benslama Y, Dennouni-Medjati N, Dali-Sahi M, Meziane FZ, Harek Y. Childhood type 1 diabetes mellitus and risk factor of interactions between dietary cow's milk intake and HLA-DR3/DR4 genotype. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2021:1-9.

[21] Niar S. Diabète de type 1 chez l'enfant et l'adolescent: Etude du recrutement de l'ouest Algérien. Thèse de doctorat en science médicales. Université d'Oran 2013.

[22] Feingold KR, Grunfeld C. Diabetes and dyslipidemia. *Endotext [Internet]*. 2000:2000-15.

Chapitre 2

**Epidémiogénétique du DT1,
génotype de prédisposition
(HLADR3/DR4) et gradient
géographique de prédisposition.**

Chapitre 2 : Epidémiogénétique du DT1, génotype de prédisposition (HLADR3/DR4) et gradient géographique de prédisposition

1. Résumé

Contexte/Objectif :

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune multifactorielle dans laquelle les gènes de l'antigène leucocytaire humain (HLA) de classe II contribuent fortement à la susceptibilité génétique. Notre étude vise à déterminer les génotypes à risque (HLADR3 et ou DR4), identifier d'autres facteurs significativement associés au DT1 et déterminer les marqueurs alléliques par l'étude des SNPs rs2187668 et rs3104413 taggant respectivement HLADR3/DR4.

Méthodes :

Il s'agissait d'une étude rétrospective (cas-témoin) réalisée à Tlemcen (extrême ouest de l'Algérie). Les sujets comprenaient 162 patients atteints de DT1 et 181 témoins sains. Le typage HLA classe II a été réalisé selon la méthode Taqman. Le génotypage des SNPs rs2187668 et rs3104413 taggant respectivement HLADR3/DR4 a été réalisé sur un échantillon de 98 cas par la méthode TaqMan (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Toutes les informations relatives à la maladie ont été recueillies à l'aide d'un questionnaire préétabli.

Résultats:

L'analyse descriptive de la composante génétique a montré une association significative entre le génotype HLADR3/DR4 et le DT1.

Le résultat de la régression nominale a révélé que les sujets porteurs du génotype HLADR3/DR4 ont deux fois plus de risque de développer le DT1.

Une association a été trouvée pour les sujets ayant au moins un allèle HLADR3 et le gradient géographique dont l'altitude est comprise entre 800 et 1400m de Tlemcen (des monts de Tlemcen).

Concernant les polymorphismes SNPs marqueur des allèles HLADR3/DR4, le génotype GC dans le polymorphisme rs3104413 et le génotype GA dans le polymorphisme rs2187668 sont les plus retrouvés chez les diabétiques avec des fréquences respectives de 54.08% vs 47.96%.

Conclusions : Les gènes HLA de classe II contribuent à la prédisposition génétique au DT1 par le génotype HLADR3/DR4. L'allèle HLADR3 a été associé particulièrement à la région géographique (monts de Tlemcen).

Mots clés

DT1, Facteurs de risque, HLADR3/DR4, SNPs, Monts de Tlemcen,

2. Introduction

Outre les gènes de l'antigène leucocytaire humain (HLA) impliqués dans la prédisposition au diabète de type 1, le gradient géographique semble d'une importance non négligeable. En effet, certaines régions affichent une prévalence importante du DT1, en opposition avec le gradient nord-sud habituellement observé : les pays scandinaves sont plus touchés par le diabète de type 1 que le sud de l'Europe [1,2].

En ce qui concerne la composante génétique est principalement présentée par les gènes de classe II HLA-DRB1 et HLA-DQB. Le risque de développer un DT1 chez les patients caucasiens est conféré par l'haplotype DRB1 * 03: 01 (DR3) -DQA1 * 05: 01-DQB1 * 02:01 (DQ2) et / ou l'haplotype HLA-DRB1 * 04 (DR4) - DQA1 * 03: 01-DQB1 * 03: 02 (DQ8), le risque le plus élevé étant attribué aux personnes présentant le composant hétérozygote DR3 / DR4 [3,4].

Cependant, l' haplotype HLA DRB1 * 15 : 01-DQA1 * 01 : 02-DQB1 * 06 : 02, protège contre le DT1 dans presque toutes les populations [5].

De plus, d'autres études suggèrent que les caucasiens sont protégés par d'autres haplotypes dont DRB1*11 :04-DQA1*05 :01-DQ B1*03 :01, DR B1*07 :01-DQA1*02 :01- DQB1*03 : 03, et DRB1 * 14 : 01-DQA1 * 01 : 01-DQB1 * 05 : 03 [4].

D'autre part, les études cliniques des différents déclencheurs environnementaux considérés comme des promoteurs de l'activation auto-immune se sont concentrées sur les infections virales [6,7], l'introduction précoce du lait de vache [8], le moment de la vaccination [9] et l'absence relative de la vitamine D. De nombreux facteurs tels que le microbiome, l'épigénétique, la microbiologie, les nutriments, le métabolisme et les gradients géographiques ont été proposés comme déclencheurs du DT1 [10-13].

Dans notre population d'étude, l'étude Dali-Sahi et Benmansour a montré que le gradient géographique (les monts de Tlemcen), la consanguinité, le groupe d'âge, le sexe ratio, la prise de poids, le type de logement et l'hypercholestérolémie étaient significativement liés au diabète de type 1[14]. De plus, notre étude a montré que les antécédents d'infection par le virus de la varicelle et la rougeole constituent un facteur de risque pour l'initiation d'une réponse auto-immune via le mimétisme moléculaire établi entre les épitopes de la glycoprotéine « gE » de la varicelle, « l'hémagglutinine » de la rougeole avec le peptide du soi « Hsp60 » qui ont la capacité de se lier aux molécules du CMH de classe II (HLA DR3/DR4)et ont le potentiel de détruire les cellules β pancréatiques car ces épitopes peuvent induire des cellules Th2, par contre seules « l'hémagglutinine » et « Hsp60 » peuvent activer la différenciation Th1 [15].

Ces études génétiques visant à déterminer la base moléculaire de la susceptibilité au DT1 requièrent un génotype HLA élevé en matière de coût. A cet effet plusieurs études ont entrepris la prédiction des allèles HLA utilisant le polymorphisme nucléotidique simple (SNP) variation au sein de la région. L'étude du polymorphisme rs3104413, qui est situé dans la région intergénique entre HLA-DRB1 et HLA-DQA1 dans la région HLA s'avère marqueur de l'allèle HLADR4 par le génotype G [16] alors que l'étude du polymorphisme rs2187668 situé au

niveau de l'intron 1 de HLA-DQA1 taggue l'allèle HLADR3 par le génotype A [17].

Cette étude vise à montrer que les allèles HLA de classe II (HLA DR3/DR4) sont des facteurs de risque pour le développement du DT1 et à évaluer les associations entre ces allèles, le gradient géographique et d'autres facteurs environnementaux. Evaluer la possibilité que les polymorphismes rs2187668 et rs3104413 peuvent prédire les allèles HLADR3/DR4 pertinents pour le DT1.

3. Méthodes

La présente étude a été conçue comme une étude cas-témoins. Les participants étaient constitués de 162 patients atteints de DT1 et 181 témoins se rendant à des visites de routine pour un contrôle médical. La population diabétique comprenait 89 (55 %) femmes et 73 (45 %) hommes, tandis que la population témoin comprenait 107 (59 %) femmes et 74 (41 %) hommes. Tous les participants ont fourni un consentement éclairé écrit.

L'étude a été menée conformément à la déclaration d'Helsinki et le protocole a été approuvé par le comité d'éthique et de recherche de l'Université de Tlemcen.

Les patients atteints de DT1 ont été diagnostiqués par un médecin sur la base des critères suivants : La présence de symptômes classiques d'hyperglycémie (polyurie, polydipsie, polyphagie et asthénie), et une insulino dépendance absolue et un test sanguin anormal de la glycémie (glycémie plasmatique à jeun) ≥ 126 mg/dl) et par un autre test, appelé HbA1C. Les sujets témoins ont été sélectionnés si leur glycémie était inférieure à 1,26 g/l et s'ils n'avaient jamais été traités par hypoglycémie. Ces critères ont été définis selon les recommandations de l'American Diabetes Association [18].

3.1 Génotypage HLA Classe II

Chaque participant a été invité à fournir un tube EDTA de 5ml de sang périphérique, qui a été congelé à -20° C au laboratoire. L'ADN a été extrait du sang total en utilisant des méthodes de salting out introduites par Miller et al [19]. La qualité de l'ADN et ses concentrations ont été déterminées par un spectrophotomètre UV-Visible (Biochrom WPA Biowave II).

Le typage HLA classe II a été effectué selon la méthode Taqman au niveau de l'institut Cochin (Inserm U1016- Université de Paris) par l'équipe du professeur Cécile Julier. Cette technique a été réalisée avec le thermocycleur Biorad CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 3 μ l : 1 μ l de Master Mix (Applied Biosystem), 0,0375 μ l de sondes (Applied Biosystem), 1 μ l d'ADN à une concentration de 5 ng/ μ l et complété avec de l'eau. Le programme de PCR était le suivant : 92° C-10 sec + (92° C-15 sec + 60° C-60 sec + lecture plaque) x (40 à 60 cycles) + 72° C -30 sec (courbe de fusion). Les génotypes sont assignés à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.1 en fonction de la fluorescence pour chaque allèle.

3.2 Génotypage des SNPs rs2187668 et rs3104413 taggant HLADR3/DR4

Les SNPs rs3104413 (C/G) et rs2187668 (A/G) SNP ont été génotypé par l'équipe du professeur Grant Morahan (Centre de recherche sur le diabète- Institut Haris Perkins en Australie) en utilisant Human Custom TaqMan Genotyping Assays 409 (Thermo Fisher

Scientific, Foster City, CA, USA). Les réactions ont été réalisées dans un volume total de 5 µl, en utilisant 2 ng d'ADN génomique, TaqMan Genotyping Master Mix 19 (Thermo Fisher Scientific), et Custom TaqMan Genotyping Assay 19. Les plaques ont été positionnées dans un thermocycleur PCR en temps réel (ViiA7 Système de PCR en temps réel ; Thermo Fisher Scientific) et chauffé pendant 10 min à 95 °C, suivi de 50 cycles de 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 min.

3.3 Analyses statistiques

Les analyses de données ont été réalisées avec Minitab 16 pour Windows. La comparaison entre les groupes de cas et les groupes témoins a été analysée à l'aide du test Chi-deux pour échantillons appariés. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

4. Résultats

Les résultats de l'analyse génétique a montré que la fréquence du génotype HLA DR3 / DR4 chez les patients DT1 (13,58%) est presque le double que celle des témoins (7,18%), de sorte que le génotype HLA DR3 / DR4 est associé au risque de diabète de type 1 avec p-value en faveur d'une significativité équivalent à 0,051. D'autre part, il n'y a pas de différence significative entre les cas et les témoins concernant la fréquence respective des génotypes DR3 / DR3 (8,64%, 7,18%), DR4 / DR4 (4,94%, 3,31%), DR3 / DRX (24,69%; 23,20%), DR4 / DRX (08,02%, 10,50%).

En ce qui concerne l'analyse de la fréquence des allèles, la fréquence de l'allèle HLA DR3 chez les diabétiques (0.28) est plus élevée par rapport aux témoins (0.22). La fréquence de l'allèle HLA DR4 est plus élevée chez les diabétiques par rapport aux témoins (0.16% vs 0.12), sans que cette différence ne soit significative ($P > 0,05$) (tableau1).

Tableau1. Associations entre DT1 et allèles HLA de classe II, les génotypes.

Génotypes, allèles HLA		Cas 162	Témoins 181	p-value
DR3/DR4	Présence	22(13.58%)	13(7.18%)	<i>p = 0.051</i>
	Absence	140(86.42%)	168(92.82%)	
DR3/DR3	Présence	14(8.64%)	13(7.18%)	<i>p = 0.616</i>
	Absence	148(90.24%)	168(92.82%)	
DR4/DR4	Présence	8(4.94%)	6(3.31%)	<i>p = 0.448</i>
	Absence	154(95.06%)	175(96.69%)	
DR3/DRX	Présence	40(24.69%)	42(23.20%)	<i>p = 0.747</i>
	Absence	122(75.31%)	139(76.80%)	
DR4/DRX	Présence	13(08.02%)	19(10.50%)	<i>p = 0.432</i>
	Absence	149(91.98%)	162(89.50%)	
DRX/DRX	Présence	65(40.12%)	88(48.62%)	<i>p = 0.114</i>
	Absence	97(59.88%)	93(51.38%)	
Fréquence de l'allèle DR3		28 %	22%	<i>p = 0.922</i>
Fréquence de l'allèle DR4		16%	12%	

HLA : Humain Leucocyte Antigene ; HLAD DR_{XX} : (ni DR3 ni DR4, les valeurs en gras sont significatives).

Concernant l'étude des facteurs environnementaux associés au DT1, notre étude montre que la consanguinité est plus fréquente chez les témoins (44,20 %) que chez les patients diabétiques de type 1 (32,72 %) avec une valeur p égale à 0,029, cela montre que la consanguinité n'est pas associée au DT1.

De plus 88,27 % des patients atteints de DT1 résident dans les monts de Tlemcen (Sebdou et Sidi El djilali), de sorte que ce gradient géographique est associé au DT1 (p = 0,0001).

D'autre part, il n'y a pas de différence significative entre les cas et les témoins concernant leurs antécédents familiaux au diabète de type 2 (tableau 2).

Tableau 2. Facteurs environnementaux associés au diabète de type 1.

Les facteurs environnementaux		Cas 162	Témoins 181	p-value
Consanguinité	Présence	53 (32.72 %)	80 (44.20 %)	<i>p = 0.029</i>
	Absence	109 (67.28 %)	101 (55.80%)	
Consanguinité 1 degré	Présence	24 (14.81 %)	42 (23.20%)	<i>p = 0.049</i>
	Absence	138 (85.19 %)	139 (76.80 %)	
Consanguinité 2 degré	Présence	29 (17.90 %)	38 (21.00 %)	<i>p = 0.471</i>
	Absence	133 (82.10%)	143 (79.00%)	
Antécédents familiaux au diabète de type 2	Présence	44 (27.16 %)	63 (34.81%)	<i>p = 0.127</i>
	Absence	118 (72.84%)	118 (65.19 %)	
Géographie	Plaines	14 (8.64 %)	38 (21.00%)	<i>p = 0.0001</i>
	Monts	143 (88.27 %)	117 (64.64%)	
	littoral	5 (3.09 %)	26 (14.36 %)	

Les valeurs en gras sont significatives.

L'étude de la population cas-témoins portant au moins un allèle HLADR3 ou HLADR4 a montré une association significative entre la prédisposition génétique par l'allèle HLADR3 (soit par le génotype HLA DR3/3 ou DR3/X ou DR3/DR4) et le gradient géographique de Sebdou et Sidi Djillali (une altitude comprise entre 800 et 1400m avec une latitude de 34.7425°) avec une valeur de p égale à 0.004. En revanche, aucune association significative n'a été trouvée entre les sujets ayant au moins un allèle HLADR4 porteur d'un des génotypes (DR4/4;DR4/X;DR3/DR4) et les facteurs environnementaux étudiés (tableau 3).

Tableau 3. Les facteurs environnementaux associés à l'allèle HLADR3 ou HLADR4 dans notre population étudiée.

Allèles		Allèle HLADR3 (DR3/3;DR3/X;DR3/DR4)			Allèle HLADR4 (DR4/4 ;DR4/X;DR3/DR4)		
		Cas (76) HLA DR3	Témoins (68) HLADR3	p-value	Cas (43) HLADR4	Témoins(38) HLADR4	p-value
Consanguinité	Présence	27 (35.53%)	26 (38.24 %)	<i>p = 0.736</i>	14 (32.56 %)	14 (36.84 %)	<i>p = 0.686</i>
	Absence	49 (64.47%)	42 (61.76%)		29 (67.44 %)	24 (63.16 %)	
Consanguinité é1 degré	Présence	14 (18.42%)	14 (20.59 %)	<i>p = 0.743</i>	5 (11.63 %)	8 (21.05 %)	<i>p = 0.249</i>
	Absence	62 (81.58%)	54 (79.41 %)		38 (88.37 %)	30 (78.95%)	
Consanguinité é 2 degré	Présence	13 (17.11%)	12 (17.65 %)	<i>p = 0.932</i>	9 (20.93 %)	6 (15.79 %)	<i>p = 0.552</i>
	Absence	63 (82.89%)	56 (82.35%)		34 (79.07 %)	32 (84.21%)	
Antécédent sfamiliaux deDT2	Présence	23 (30.26%)	22 (32.35 %)	<i>p = 0.787</i>	13 (30.23 %)	14 (36.84 %)	<i>p = 0.529</i>
	Absence	53 (69.74%)	46 (67.65 %)		30 (69.77 %)	24 (63.16 %)	
Géographie	Plaines	6 (7.89 %)	13 (19.12 %)	<i>p = 0.004</i>	5 (11.63 %)	7 (18.42 %)	<i>p = 0.541</i>
	Monts	68 (89.47%)	46 (67.65 %)		36 (83.72%)	28 (73.68%)	
	Littoral	2 (2.63 %)	9 (13.23 %)		2(4.65%)	3 (7.89%)	

Les valeurs en gras sont significatives.

Au niveau de la région géographique (les monts de Tlemcen), parmi la population des diabétiques et témoins ayant au moins un allèle HLADR3, on a constaté que la consanguinité étudiée au niveau des deux générations n'est pas liée à la préservation de l'allèle HLADR3, de même pour les antécédents familiaux au diabète car la fréquence de l'hérédité liée au diabète de type 2 est équilibrée entre cas et témoins (30.26% vs 30.43%)(tableau4).

Tableau 4. Les facteurs environnementaux associés à l'allèle HLADR3 dans la population cas-témoins habitants les monts de Tlemcen.

Facteurs environnementaux		Diabétiques habitants les monts prédisposés par au moins un allèle HLADR3 (76)	Témoins habitants les monts ayant au moins un allèle HLADR3 (46)	p-value
Consanguinité	Présence	27 (35.53%)	21 (45.65%)	<i>p=0.474</i>
	Absence	49 (64.47%)	25 (54.35%)	
Consanguinité 1 degré	Présence	14 (18.42%)	11 (23.91%)	<i>p=0.225</i>
	Absence	62 (81.58%)	35 (76.09%)	
Consanguinité 2 degré	Présence	13 (17.11%)	10 (21.74%)	<i>p=0.804</i>
	Absence	63 (82.89%)	36 (78.26%)	
Antécédents familiaux de DT2	Présence	23 (30.26%)	14 (30.43%)	<i>p=0.404</i>
	Absence	53 (69.74%)	32 (69.57%)	

Le modèle de régression logistique nominale a montré une association significative entre le polymorphisme HLADR3/DR4 et le diabète de type 1.

Les sujets porteurs du génotype HLA DR3/DR4 avaient deux fois plus de risque de développer un DT1 par rapport à la catégorie de référence HLADRXX (ni DR3 ni DR4) (OR=2,29;IC=1,07-4,88;P=0,032) (tableau 5).

Tableau 5. Odds ratios (intervalles de confiance à 95 %) du modèle de régression logistique nominale.

Génotypes	HLA DRXX	HLA DR4X	HLA DR3X	HLA DR34	HLA DR44	HLA DR33
Modèle 1 OR non ajusté	1,00 (référence)	OR (IC 95 % ; p-values) 0,93 (0,43-2,01; 0,846)	OR (IC 95 % ; p-values) 1,29 (0,75-2,21; 0,355)	OR (IC 95 % ; p-values) 2,29 (1,07-4,88;0,032)	OR (IC 95 % ; p-values) 1,81 (0,6-5,46;0,295)	OR (IC95 % ; p-values) 1,46 (0,64-3,31; 0,368)

p-value pour la régression logistique nominal

Les résultats préliminaires du génotypage des polymorphismes SNPs rs2187668 et rs3104413 sur la population des diabétiques ont montré que la fréquence du génotype GA du polymorphisme rs2187668 est plus prépondérante (47,96 %) comparant aux génotypes GG (37,75%) et AA (14,29%). Pour le polymorphisme SNPs rs3104413, on a noté une fréquence élevée du génotype GC (54,08%) par rapport aux génotypes CC et GG dont leurs fréquences respectives sont de l'ordre de (38,78% vs 07,14%). Il reste à génotyper ces SNPs dans la population de témoins pour pouvoir trancher s'ils peuvent être utilisés comme marqueurs des allèles HLADR3/DR4 dans notre population d'étude (tableau 6).

Tableau 6. Génotypage des SNPs rs2187668 et rs3104413 taggant HLADR3/DR4.

Polymorphisme HLA	Génotypes	Diabétiques 98
rs3104413	CC	38 (38.78%)
	GG	7 (07.14%)
	GC	53 (54.08%)
rs2187668	AA	14 (14.29%)
	GG	37 (37.75%)
	GA	47(47.96%)

5. Discussion

Le principal facteur de prédisposition génétique au diabète de type 1 est conféré aux allèles HLA particulier. Pour la population caucasienne, les allèles qui confèrent le plus haut risque sont DRB1/0301 et DRB1/0401 [3]. Dans notre population d'étude le génotype HLA DR3 / DR4 est étroitement associé au diabète de type 1 et sa fréquence est significativement plus élevée chez les diabétiques (13,58%) par rapport aux non-diabétiques (7,18%) et les individus porteurs du génotype HLADR3 / DR4 ont deux fois plus de risque de développer le DT1 par rapport aux personnes ayant HLADRXX.

En revanche, une étude menée au niveau de la population de la capitale algérienne révèle des fréquences phénotypiques élevées par rapport à notre population DR3 (79 % vs 28%) respectivement, DR4 (54% vs 16%) respectivement, ces génotypes sont fortement associés au DT1 [20].

En ce qui concerne les populations voisines de l'Afrique du Nord (Tunisie, Maroc) touchées par le diabète de type 1, la fréquence de l'allèle HLA DR3 est élevée (36%) dans la population tunisienne comparant à notre population qui est de l'ordre de (28%) contre (17,2%) dans la population marocaine. La fréquence de l'allèle DR4 est relativement élevée dans la population tunisienne (23,86%) comparant à notre population (16%) et à la population marocaine (17,6%).

Dans notre population, la fréquence des hétérozygotes DR3 / DR4 est de (13,58%) presque équilibrée avec celle de la population tunisienne (12,5%) par contre la fréquence trouvée dans la population marocaine est la plus élevée dans la population maghrébine qui équivaut à 30%. De plus, le génotype DR3 / DR4 est un facteur de risque de DT1 dans notre population d'étude, ainsi que dans la population marocaine et tunisienne [21,22].

Des études menées sur des populations européennes dans le bassin méditerranéen voisin, y compris l'Espagne et la France, ont indiqué que des variants alléliques communs aux loci HLA-DRB1, -DQA1 et -DQB1 de classe II sont associés au DT1 [23-25].

De plus, on a retrouvé que l'allèle HLADR3 prédispose les individus issus des monts de Tlemcen (Sebdou et Sidi Djillali) au DT1 (soit par le génotype HLA DR3/3 ou DR3/X ou DR3/DR4), ceci dit, cet allèle n'a pas été associé aux antécédents familiaux au diabète de type 2 ni à la consanguinité pratiquée au niveau des deux générations étudiées mais éventuellement par l'endogamie longuement pratiquée dans ces populations.

L'intensité de l'endogamie dans nos populations de l'extrême ouest Algérien dépend de l'éloignement géographique.

Nos résultats confirment la disparité épidémiogénétique des taux d'incidence du diabète de l'enfant à travers les différents gradients géographiques de l'extrême ouest Algérien.

Ces variations obéissent au gradient Nord-Sud. Il faut noter l'extrême particularité de la région de Tlemcen qui est à l'extrémité ouest du pays.

Notre étude montre une association significative entre le DT1 et le gradient géographique (altitude entre 800 et 1400 m et une latitude de 34.7425°) par rapport à la région côtière et la plaine de Tlemcen.

Selon plusieurs études, les taux d'incidence du DT1 suivent un gradient nord-sud et beaucoup plus élevé dans les pays scandinaves [2]. La variation de l'incidence a été constatée même au sein des pays [26, 27], augmentant avec la latitude nord en Chine (latitude 35°) [28], latitude l'est de l'Allemagne et du sud-ouest en Allemagne (latitude 51°) [29] et en Sardaigne (latitude 40°) [30].

Ce gradient latitudinal d'incidence du DT1 trouvé dans différentes régions du monde est proportionnel à la distance de l'équateur et inversement proportionnel au rayonnement ultraviolet (UV). Par conséquent, la baisse du pouvoir immunorégulateur des UV a été associée à la pathogenèse du DT1 affectant spécifiquement la synthèse de la vitamine D [31, 32].

Ensemble, une combinaison d'explications génétiques et environnementales semble nécessaire pour comprendre la géoépidémiologie du DT1. Ce travail a révélé que le génotype HLADR3/DR4 constitue un facteur de risque du DT1 pour notre population.

De plus, une forte liaison a été trouvée entre la prédisposition génétique par l'allèle HLADR3 et le gradient géographique (en région montagneuse avec une altitude comprise entre 800 et 1400m et une latitude de 34.7425° [33]) avec le DT1.

D'autre part, en réalisant que l'hétérozygote HLADR3/DR4 prédispose les sujets au DT1 dans notre population d'étude, on s'est proposé d'identifier d'éventuels marqueurs alléliques SNPs de HLADR3/DR4. Ainsi, nous avons effectué le génotypage des polymorphismes SNP rs3104413 et rs2187668 pour évaluer leurs capacités à prédire les allèles HLADR3/DR4 chez les enfants diabétiques de l'extrême ouest Algérien.

En réalisant un calcul de déséquilibre de liaison entre le locus HLA-DRB1 et les rs3104413 et rs2187668 créant dans certains cas, une association de marqueurs avec le phénotype de la maladie, qui peut être mesurée dans une population cas-témoins.

En étudiant un grand nombre de SNP, soit systématiquement sur l'ensemble du génome, soit dans toutes les régions pour lesquelles il semble exister une évidence de liaison, il est probable que sur la base des études d'association, de nombreux loci de maladies seront ainsi cartographiés avec précision.

Ceci a été effectué pour la population des enfants malades ; pour les témoins, le travail fait l'objet d'une collaboration avec le professeur Grant Morahan au niveau du Centre de recherche sur le diabète, Université d'Australie occidentale, Institut médical Harry Perkins.

Ces résultats peuvent être pertinents pour des études à grande échelle où le coût par individu peut être significativement diminué et en avantage pour les sujets dont les antécédents familiaux au DT1 et au DT2.

6. Conclusion

La géoépidémiologie du DT1 est un outil précieux qui peut apporter des réponses sur l'étiopathogénie des maladies auto-immunes en général et du diabète de type 1 en particulier. La principale conclusion que l'on peut tirer de ce travail est que les sujets porteurs du génotype HLADR3/DR4 ont deux fois plus de risque de développer le DT1 alors que l'allèle HLADR3 prédispose uniquement les sujets issus des monts de Tlemcen à une altitude de 800 à 1400 m.

Le génotypage des polymorphismes SNP rs3104413 et rs2187668 ou de d'autres SNPs marqueurs permettront une identification rapide des haplotypes HLA pertinents associés au DT1 et pouvant servir de marqueurs génotypique.

7. Références

- [1] LaPorte RE, Matsushima M, Chang Y-F. Prevalence and incidence of insulin-dependent diabetes. *Diabetes in America*. 1995; 2:37-46.
- [2] Samuelsson U, Westerberg L, Aakesson K, Birkebæk NH, Bjarnason R, Drivvoll AK, et al. Geographical variation in the incidence of type 1 diabetes in the Nordic countries: A study within NordicDiabKids. *Pediatric diabetes*. 2020;21(2):259-65.
- [3] Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Current diabetes reports*. 2011;11(6):533.
- [4] Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 2008;57(4):1084-92.
- [5] Valdes A, Thomson G, Graham J, Zarghami M, McNeney B, Kockum I, et al. D6S265* 15 marks a DRB1* 15, DQB1* 0602 haplotype associated with attenuated protection from type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2005;48(12):2540-3.
- [6] Jaidane H, Hober D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 2008; 34(6):537-48.
- [7] Filippi CM, von Herrath MG. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes*. 2008;57(11):2863-71.
- [8] Benslama Y, Dennouni-Medjati N, Dali-Sahi M, Meziane FZ, Harek Y. Childhood type 1 diabetes mellitus and risk factor of interactions between dietary cow's milk intake and HLA-DR3/DR4 genotype. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2021:1-9.
- [9] DeStefano F, Mullooly JP, Okoro CA, Chen RT, Marcy SM, Ward JI, et al. Childhood vaccinations, vaccination timing, and risk of type 1 diabetes mellitus. *Pediatrics*. 2001;108(6):e112-e.
- [10] Bougnères P, Valleron A-J. Causes of early-onset type 1 diabetes: toward data-driven environmental approaches. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(13):2953-7.
- [11] Cutfield WS. Escher's stairs and type 1 diabetes incidence in childhood. *Pediatric diabetes*. 2008; 9(3 Pt 1):175-7.
- [12] Hanberger L, Birkebaek N, Bjarnason R, Drivvoll AK, Johansen A, Skrivarhaug T, et al. Childhood diabetes in the Nordic countries: a comparison of quality registries. *Journal of diabetes science and technology*. 2014;8(4):738-44.
- [13] Patterson CC, Gyürüs E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E, et al. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989–2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*. 2012;55(8):2142-7.
- [14] Dali-Sahi M, Benmansour D. Évaluation du risque de survenue du diabète de type 1 dans une population consanguine de l'ouest Algérien. *Lebanese Science Journal*. 2014;15(2):25.
- [15] Meziane FZ, Dali-Sahi M, Dennouni-Medjati N, Boulenouar H, Kachekouche Y,

Benslama Y, et al. Molecular mimicry between varicella, measles virus and Hsp60 in type 1 diabetes associated HLA-DR3/DR4 molecules. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2020;14(6):1783-9.

[16] Nguyen C, Varney MD, Harrison LC and G. Morahan. Definition of high-risk type 1 diabetes HLA-DR and HLA-DQ types using only three single nucleotide polymorphisms. *Diabetes* 2013; 62(6): 2135-2140.

[17] Barker JM, Triolo TM, Aly TA, et al. Two single nucleotide polymorphisms identify the highest-risk diabetes HLA genotype: potential for rapid screening. *Diabetes* 2008; 57:3152–3155.

[18] Gabir MM, Hanson RL, Dabelea D, Imperatore G, Roumain J, Bennett PH, et al. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes care*. 2000;23(8):1108-12.

[19] Mwer S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids res*. 1988;16(3):1215.4

[20] Raache R, Hennachi R, Amroune H, Heniche A, Belanteur K, Benyahia A, et al. Gènes de susceptibilité HLA et rétinopathie diabétique chez la population algérienne. *Journal français d'ophtalmologie*. 2013;36(3):247-54.

[21] Stayoussef M, Benmansour J, Al-Irhayim A-Q, Said HB, Rayana CB, Mahjoub T, et al. Autoimmune type 1 diabetes genetic susceptibility encoded by human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes in Tunisia. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16(8):1146-50.

[22] Benseffaj N, Brick C, Atouf O, Bourhanbour AD, Sanae O, Essakalli M. Human leukocyte antigen (HLA) polymorphism and type 1 diabetes in the Moroccan population. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(95):16126-31.

[23] Escribano-de-Diego J, Sánchez-Velasco P, Luzuriaga C, Ocejo-Vinyals JG, Paz-Miguel JE, Leyva-Cobián F. HLA class II immunogenetics and incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in the population of Cantabria (Northern Spain). *Human immunology*. 1999;60(10):990-1000.

[24] Urcelay E, Santiago JL, de la Calle H, Martínez A, Méndez J, Ibarra JM, et al. Type 1 diabetes in the Spanish population: additional factors to class II HLA-DR3 and-DR4. *BMC genomics*. 2005;6(1):1-7.

[25] Zevaco-Mattei C, Reviron D, Atlan-Gepner C, Botti G, Simonin G, Lassmann-Vague V, et al. Relationship between HLA-DQ and-DR genotypes and clinical characteristics in a French population of Type 1 diabetic patients. *Diabetic medicine*. 1999;16(3):201-6.

[26] Dorman JS, McCarthy B, O'Leary L, Koehler A. Diabetes in America. National Diabetes Data Group of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 1995:165-78.

[27] Waldhör T, Schober E, Karimian-Teherani D, Rami B. Regional differences and temporal incidence trend of Type I diabetes mellitus in Austria from 1989 to 1999: a nationwide study.

- [28] Yang Z, Wang K, Li T, Sun W, Li Y, Chang Y-F, et al. Childhood diabetes in China: enormous variation by place and ethnic group. *Diabetes care*. 1998;21(4):525-9.
- [29] Rosenbauer J, Herzig P, Von Kries R, Neu A, Giani G. Temporal, seasonal, and geographical incidence patterns of type I diabetes mellitus in children under 5 years of age in Germany. *Diabetologia*. 1999;42(9):1055-9.
- [30] Casu A, Pascutto C, Bernardinelli L, Songini M. Type 1 diabetes among Sardinian children is increasing: the Sardinian diabetes register for children aged 0–14 years (1989–1999). *Diabetes care*. 2004;27(7):1623-9.
- [31] Shoenfeld N, Amital H, Shoenfeld Y. The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2009;5(2):99-105.
- [32] Ponsonby A-L, McMichael A, Van Der Mei I. Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology*. 2002;181:71-8.
- [33] « Monts de Tlemcen ». http://fr.getamap.net/cartes/algeria/tlemcen/_tlemcen_montsde/ consulté le 03 juillet 2021.

Chapitre 3

**Molecular mimicry between
varicella, measles virus and
Hsp60 in type 1 diabetes
associated HLA-DR3/DR4
molecules**

Chapitre 3: Molecular mimicry between varicella, measles virus and Hsp60 intype 1 diabetes associated HLA-DR3/DR4 molecules

1. Résumé.

2. Introduction

Le diabète de type 1 est une maladie chronique auto-immune dont les mécanismes étiologiques sont mal définis mais il est bien établi que c'est l'association de facteurs génétiques et environnementaux qui déclenchent la maladie.

Notre étude vise à déterminer les facteurs qui déclenchent la réponse auto-immune dans la population de l'extrême ouest Algérien "Tlemcen" et d'identifier le mécanisme par lequel les infections virales déclenchent la réponse auto-immune chez les diabétiques portant l'haplotype HLADR3/DR4

3. Méthodes

Nous avons inclus dans notre étude cas-témoins 233 sujets dont 145 sujets atteints du DT1 et 88 témoins. L'analyse logistique visait à identifier les facteurs de risque par la suite on a recouru à l'approche in silico pour élucider le mécanisme sous-jacent au déclenchement de la réaction auto-immune par l'étude du mimétisme moléculaire.

4. Résultats

L'analyse par la régression logistique binaire a retrouvé les antécédents familiaux aux diabète de type 1 et de type 2 et les antécédents d'infections par le virus de la varicelle et la rougeole qui sont significativement associés au DT1 ($p < 0.05$)

On a démontré le mécanisme de mimétisme moléculaire potentiel entre les régions antigéniques homologues de la glycoprotéine « gE » du virus de la varicelle, « l'hémagglutinine » de la rougeole et la protéine humaine « HSP60 » non seulement au niveau de la séquence, mais aussi au niveau de leurs structures 3D. De plus, on a montré que ces épitopes à réaction croisée se lient aux molécules CMH de classe II (HLA DR3/DR4) qui prédisposent au DT1 mais ne se lient pas aux molécules HLA de protection contre le DT1. En plus, ces épitopes homologues possèdent un potentiel d'induction des cellules Th2 mais seules « l'hémagglutinine » et « Hsp60 » peuvent activer la différenciation Th1 induisant ainsi la destruction des cellules β pancréatiques.

5. Conclusion

Notre étude préliminaire soutient l'hypothèse du mimétisme moléculaire entre le virus de la varicelle, la rougeole et la protéine humaine Hsp60 qui peut contribuer à la pathogenèse du DT1. De plus, on a déterminé la possibilité de la présence d'anticorps anti-Hsp60 qui peut être inclus parmi les anticorps à dépister lors du diagnostic du DT1.

De telles découvertes peuvent nous permettre d'adapter les marqueurs biologiques aux diabétiques de type 1 génétiquement prédisposés et d'établir une stratégie préventive pour les individus sains prédisposés génétiquement dans notre population de Tlemcen.



Contents lists available at ScienceDirect

Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dsx

Molecular mimicry between varicella, measles virus and Hsp60 in type 1 diabetes associated HLA-DR3/DR4 molecules

Fatima Zohra Meziane ^{a,*}, Majda Dali-Sahi ^a, Nouria Dennouni-Medjati ^a,
Houssam Boulenouar ^b, Youssouf Kachekouche ^a, Yasmine Benslama ^a, Yahia Harek ^a

^a Department of Biology, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, University of Tlemcen, Algeria

^b Cancer LAB, Medecin Faculty, University of Tlemcen, Algeria



ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2019

Received in revised form

5 August 2020

Accepted 11 August 2020

Keywords:

Type 1 diabetes

gE

Hemagglutinin

Hsp60

HLA DR3/DR4

Molecular mimicry

ABSTRACT

Background and aims: Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial autoimmune disease that combines genetics and environmental factors. The aim of this study is to determine the environmental risk factors and to investigate how virals infections are risks factors for type 1 diabetics whom have HLA DR3/DR4 predisposition in our population.

Methods: This study includes 233 subjects, 145 diabetics and 88 controls from regions of the extreme western of Algeria. All the informations related to the disease were collected using predesigned questionnaire.

Using *in silico* approach, we attempt to improve the understanding of this analytical result by molecular mimicry, which is associated with the breakdown of several autoimmune pathologies.

Results: The statistical study showed that history of varicella and measles infection and T1D related inheritance and type 2 diabetes are risk factors for T1D in the population of Tlemcen.

We have determined the homologous antigenic regions between the glycoprotein “gE” of the varicella virus, the “hemagglutinin” of measles and the human protein “HSP60” at the level of their sequence and 3D structure. These cross-reactive epitopes bind to MHC class II molecules (HLA DR3/DR4) that predispose to T1D but not to MHC class II molecules (HLA DR2) that protect against T1D.

This epitopes induce Th2 cells but only “hemagglutinin” and “Hsp60” can activate Th1 differentiation. This indicates their potential to destroy pancreatic cells **b**.

Conclusion: Our study can allow us to adapt biological markers to genetically predisposed T1D and to establish a preventive strategy for healthy genetic predisposed individuals in Tlemcen population.

© 2020 Diabetes India. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 (insulin-dependent) diabetes (T1D) is an autoimmune disease resulting in destruction of pancreatic β -cells [1]. Till now, T1D etiology is not fully understood. However, it is well known that the association between genetic susceptibility and environmental factors contribute to the development of type 1 diabetes. Adaptive immune response (HLA) genes still remain the major contributor to Type 1 Diabetes [2].

However, controversy still regarding which factors may be responsible for the disease’s susceptibility. These factors may differ substantially among populations which may raise the role of viral

infections in the pathogenesis of T1D. Several studies have associated Enteroviruses (Rotavirus, Coxsackie B) [3,4], viruses from the family of Paramyxoviridae (measles and mumps) [5,6] viruses from the family of Herpesviridae (Varicella-zoster virus, cytomegalovirus) [7,8] and viruses from the family of Togaviridae (rubella) [9] to the disease.

So, a mechanism of molecular mimicry has been proposed to explain the induction of autoimmunity by viral infections leading to the destruction of pancreatic beta cells [3]. *Vreugdenhil and al* showed that the amino acids sequence of the protein 2C (p2C) of coxsackie B4 virus share homology sequence with the GAD 65 protein of the human (PE-VKEK). This sequence is highly conserved in the group of CVB-like enteroviruses. In addition, the GAD65 and p2C peptides seem to be located in an identical position within the peptide binding groove, a condition required for T-cell cross-reactivity. Indeed these results support molecular mimicry

* Corresponding author. 13000, Tlemcen, Algeria.

E-mail address: tema-mez@outlook.fr (F.Z. Meziane).

between p2C of enteroviruses type coxsackie B and GAD 65 for diabetics who have genetic predisposition for HLA DR3 [10].

The aim of this study is to provide epidemiological arguments in favour of a link between the varicella virus and measles in the onset of T1D in children in the city of Tlemcen.

We though hypothesized that the molecular mimicry implemented during viral infection cause a cross-reaction inducing an autoimmune reaction against pancreatic B cells in diabetics who have the genetic predisposition HLA DR3/DR4.

To understand the molecular basis of this biological process, we carried out a study *in silico* by using different webserver to highlight the sequence homology between the varicella virus proteins, the measles virus proteins and the self-proteins, and then we test the capacity of homologous peptides to bind to HLA class II molecules that predispose T1D.

Finally, we checked the capacity of peptides that share sequence homology to induce the differentiation of naive LTs into Th1 and/or Th2 to confirm their molecular and structural mimetics.

2. Methods

Our case-control study included 233 subjects randomly distributed between different regions of the extreme western of Algeria. including 145 diabetics and 88 controls.

This survey was conducted from March 2018 to April 2019 in the hospital and health facilities in the city of Tlemcen. As all participants are all under 19, to join this case-control study, consents were obtained from their parents.

Information concerning age, gender, body weight, size, duration of diabetes, diabetes family history, the antecedents of breastfeeding, and consanguineous levels was collected by questionnaire.

2.1. Control cases selection

Subjects in this study were participants in a case-control study of the pathogenesis of type 1 diabetes; they were presented for routine visits for medical check-up. After taking the Institutional Ethics committee clearance. Subject selected for analysis were under 19 years old and they have been diagnosed by specialists according to criteria of American Diabetes Association established the diagnosis [11].

The recommendations as regards diagnosis, screening and the classification of diabetes, approved by NIH and by OMS have been selected, namely.

The presence of classic symptoms of hyperglycaemia and abnormal blood test of glycemia (fasting plasma glucose) ≥ 126 mg/dl) and by another test, called HbA1C. Control subjects were selected if their glycaemia was lower than 1,26 g/l and they had never been treated with hypoglycemics. This protocol was approved by l'ANDRS (the Institutional Ethics Committee Algeria) and Genetics HLA predispositions are clearly identified by SNPs analysis rs3104413 rs2187668 rs12722495, the genotype DR3/DR3, DR4/DR4 or DR3/DR4 was significantly related to T1D in our population article being published.

2.2. Statistical analysis

Analysis of data was performed using excel/2007 and Minitab 16 for Windows. A binary logistic regression study [12] was performed to determine a predictive model of type 1 diabetes using the measured factors (the response variable is here denoted Y, which counts diabetic subjects (D) and the controls (T), (D) being the reference value).

2.3. Materials and methods bioinformatics

2.3.1. Establishing sequence homology

2.3.1.1. NCBI (Protein Database). We downloaded protein sequences of HHV3 virus, for the measles virus we selected hemagglutinin glycoprotein for strain Edmonston and Hsp60 from *Homo sapiens*.

2.3.1.2. Blast and LALIGN. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [13] determines similarity between the sequences of virals proteins and human proteins.

William Pearson's Lalign is a sequence analysis program (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html). It finds multiple matching sub segments in two sequences. The lalign program implements the algorithm of Huang and Miller [14]. Based on the BLAST and Lalign results, different peptides sequences that were similar between the human and viral proteins, which were selected for analysis binders vs non-binders for HLA class II alleles: HLA-DR. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

2.3.2. Establishing binders vs. non-binders to HLA II molecules (HLA DR)

2.3.2.1. IEDB analysis tool. The IEDB (Immune Epitope Database) software includes the prediction of peptides that bind to MHC class II molecules (<http://www.iedb.org/>) [15].

The IEDB Recommended tool was used as it finds the best possible method for a given MHC molecule. The IEDB Recommended uses the Consensus approach, combining NN-align [16], SMM-align [17], CombLib [18] and Sturniolo [19] if any corresponding predictor is available for the molecule, otherwise NetMHCIIpan is used [20]; URL: <http://tools.iedb.org/mhcii/>. The binder who have the lower percentile rank than 10 (Recommended cut-off for binder MHC II) is the better binders [21,22].

2.3.2.2. Alleles used in the study. Human MHC proteins, also known as human leukocyte antigens (HLA), are glycoproteins, which bind small peptide fragments or epitopes, derived from both pathogen and host protein and present them at the cell surface for recognition by T cells [23e26].

The HLA class II alleles remains the major genetic contributor to type 1 diabetes [27e29]. The alleles chosen for *in silico* prediction are DR3 (DR B1 * 03: 01)/DR4 (DRB1 * 04: 01/02/04/05/08) which are strongly associated with Caucasian diabetic children [30] and the haplotype DRB1 * 15: 01-DQ A1 * 01: 02-DQB1 * 06: 02 (DR2) that protect for DT1 for Caucasian [31].

2.3.2.3. The autoantigen. The auto antigens implicated in the development of T1D: proinsulin (PI), GAD65, I-A2, and ZnT8 [32], the heat shock protein (Hsp)-60 [33], Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP) [34] Hsp 70 [35] are introduced into the study in order to specify their sequences and structural homology with the respective proteins of measles and varicella virus.

2.3.2.4. Viral antigens. The viral antigen of varicella [36e38] and both of effector and memory VZV-specific T cells have been identified [40,41]. These cells recognize epitopes of IE62, IE63, ORF4, ORF10, gB, gC, gE, gH, and gI surface glycoproteins [39,42,43]. There is some, albeit limited, information regarding the amino acids sequences of the epitopes recognized by VZV-specific T cells [44,45].

The measles glycoprotein hemagglutinin is responsible for binding to cellular receptors on the target host cells [46,47]. It is a type II membrane protein [48e50]. Various authors reported that this main protein is in favour of protection against measles virus

infection [51,52].

2.3.3. Cytokine secretion profile

2.3.3.1. IL4Pred vs IFNepitope. The web server IL4Pred was used to predict the interleukin 4 (IL-4) producing potential of the peptides which have affinity with class II HLA. The algorithm of IL4Pred discriminates IL-4 inducers and non-inducers by use of machine learning techniques and the binary pattern of the sequences as an input and is freely available through the URL: <https://webs.iitd.edu.in/raghava/il4pred/> [53].

Interferon-gamma (IFN- γ) producing potential of the peptides was checked via IFNepitope web server freely available through the URL: <http://osddlinux.osdd.net/raghava/ifnepitope/index.php> [54]. The algorithm of IFNepitope uses the combined strength of motif based techniques and SVM-based learning for discriminating IFN- γ inducing peptides from the negative ones.

2.3.4. 3D structure prediction of homologous peptides

PEP-FOLD is an approach that predict peptide structures from amino acid sequences between 9 and 36 residues. This method, based on structural alphabet SA letters to describe the conformations of four consecutive residues, couples the predicted series of SA letters to a greedy algorithm and a coarse-grained force field. <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/> [55].

The stereo-chemical properties of predicted models were retrieved from RAMPAGE server <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>, which provides accurate information about the residues present in the favoured, allowed and disallowed regions. We retain the predicted models by considering a percentage score (>75%) of residues present in the favoured region.

2.3.5. Establishing the structural mimicry of homologous peptides

TM-align is an algorithm freely available (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>) for sequence independent protein structure comparisons. It generates an optimal superposition of the two structures built on the detected alignment, as well as the TM-score value [56]. We used TM-score to establish the quantitative assessment of the peptides structural similarity based on the RMSD values [57].

3. Results

3.1. Statistical results

Our results show that the infection by the varicella virus seems to be a risk factor for developing type 1 diabetes. Thus, subjects infected by varicella virus have twice as likely to have a risk for developing type 1 diabetes (OR $\frac{1}{4}$ 2,11, IC 95% $\frac{1}{4}$ 1,01e4,41, p $\frac{1}{4}$ 0,048). The study of heredity linked to type 1 diabetes and 2 type diabetes in this population are exposure factors to type 1 diabetes because their respective P-value is top $\frac{1}{4}$ 0,033 and p $\frac{1}{4}$ 0,000.

In addition, our results show that subjects infected with the measles virus have a risk multiplied by 0.6 of developing T1D compared with non-infected subjects (OR $\frac{1}{4}$ 0,61; IC 95% $\frac{1}{4}$ 0,26e1,41, p $\frac{1}{4}$ 0,245). We have retained this factor in the provisional model because the adequacy summarized in Table 1 tests are more favourable to its retention than to its withdrawal.

The choice of the logistic model, all adequacy are favourable namely Pearson method, deviance method, Hosmer-Lemeshow method and methods of Brown (general alternative and symmetrical alternative) leads to an acceptable model with a P-value \blacksquare 0.05.

Table 1
Identification of sequence homology between gE, hemagglutinin and Hsp60 by Blast/lalign programme.

	Homologous sequences	Identities	Positives	Gaps
Blast	gE: 221 LKHTTCFQ 228	5/8(63%)	6/8(75%)	0/8(0%)
	Hema:376 LRMETCFQ 383			
	Hema:376 LRMETCFQ 384	5/9(56%)	7/9(77%)	0/9(0%)
	Hsp60: 2 LRLPTVFRQ 10			
Lalign	gE: 221 LKHTTCFQ 228	3/8(37.5%)	5/8(62.5%)	0/8(0%)
	Hsp60: 2 LRLPTVFR 10			

Key: gE: glycoproteins E, Hsp60: the heat shock protein (Hsp)-60, Hema: Hemagglutinin.

3.2. Bioinformatics results

The present study was conducted to explore the existence of viral peptides that share homology with human protein (Hsp60) able to provoke autoimmune diseases by binding to human MHC class II molecules and to induce the differentiation of the naïve CD4 T cells.

3.2.1. Viral peptide of gE and hemagglutinin share a sequence homology with human peptide (Hsp60)

On the basis of the statistical results, the BLAST analysis explored if the viral peptides of varicella and measles share sequence homology. An identity level of 63% and 75% similarity was found between the peptide of the varicella glycoprotein E "LKHTTCFQ" and the "LRMETCFQ" hemagglutinin of measles.

Next, the homologous hemagglutinin peptide of measles "LRMETCFQ" was aligned with human proteins. It is thus homologous with the Hsp60 peptide "LRLPTVFRQ" along an identity rate of 56% and a similarity rate of 77% (Table 1). Subsequently, the sequence homology analysis by the lalign software enabled us to identify the sequence homology between the gE peptide "LKHTTCFQ" and "LRLPTVFRQ" Hsp60 peptide with identity rate and similarity of 37.5% and 62.5% respectively (Table 1).

3.2.2. Viral epitopes showing molecular mimicry with human peptides are HLA binders that predispose to T1D

The ability of homologous peptides to induce this autoimmune disease was tested by binding to MHC class II molecules that predispose to T1D. As a result, we have taken a holistic approach using IEDB analysis resources. This *in silico* analysis reveals that viral peptides of varicella and measles share sequence similarity with their human homologous « Hsp60 peptide » and those are HLA binders with percentiles rank (<10) (Table 2) but it not binders for HLA class II that protect against T1D due to percentiles ranks >10 (Table 1; supplementary materials).

3.2.3. Cytokine secretion profile of homologue peptides

The Interleukin 12 (IL-12) and Interleukin 4 (IL-4) cytokines induce the differentiation of naïve CD4 T cells into T helper cells (Th1) and (Th2) cells respectively. In addition, co-stimulatory molecules, PRRs, peptides interaction with MHC molecules can influence the release of cytokines and the generation of Th1 and Th2 cells [58e60]. The alteration in the pattern of cytokine secretion induced by the viral peptides responsible for molecular mimicry may regulate the differentiation of Th1 and Th2 cells.

We predicted the cytokine secreting ability of the peptides by employing IFN epitope and IL4 pred web servers. We noticed that all mimicking peptides induce IL-4 expression and only hemagglutinin peptide and Hsp60 peptide induce IFN- γ expression (Table 3). So this mimicking peptides can induce the production of Th2 and Th1 cells.

Table 2
Demonstration that homologue peptides are HLA DR3/DR4 binders by the Immune Epitope Database (IEDB).

Peptides introduced for prediction	Alleles that predisposes to Type 1 Diabetes	Peptide epitope found by IEDB	Method used	Percentile rank	Epitope core found by IEDB
gE QHICLKHTTTCFQDVVV	HLA-DRB1*04:02	QHICLKHTTTCFQDVV HICLKHTTTCFQDVVV	sturniolo	2.55	ICLKHTTTCF
	HLA-DRB1*04:08	QHICLKHTTTCFQDVV HICLKHTTTCFQDVVV	sturniolo	8.22	ICLKHTTTCF
	HLA-DRB1*03:01	QHICLKHTTTCFQDVV	Consensus (smm/nn/ sturniolo)	9.47	ICLKHTTTCF
Hema RTDDKLRMETCFQQACK	HLA-DRB1*04:08	RTDDKLRMETCFQQA TDDKLRMETCFQQAC DDKLRMETCFQQACK	sturniolo	1.63	LRMETCFQQ
	HLA-DRB1*04:02	RTDDKLRMETCFQQA TDDKLRMETCFQQAC	sturniolo	1.96	LRMETCFQQ
Hsp60 MLRLPTVFRQMRPVS	HLA-DRB1*04:02	MLRLPTVFRQMRPVS	sturniolo	0.40	LRLPTVFRQ
	HLA-DRB1*04:08	MLRLPTVFRQMRPVS	sturniolo	0.99	MLRLPTVFR
	HLA-DRB1*03:01	MLRLPTVFRQMRPVS	Consensus (smm/nn/ sturniolo)	8.05	MLRLPTVFRQMRPVS
	HLA-DRB1*04:04	MLRLPTVFRQMRPVS	Consensus (smm/nn/ sturniolo)	9.09	MLRLPTVFR

Key: gE: glycoproteins E, Hsp60: the heat shock protein (Hsp)-60, Hema: Hemagglutinin.

Table 3
Prediction of IL-4 and IFN- γ induction capacity for each peptide.

Alleles that predisposes to type 1 diabetes	Peptides epitopes found by IEDB	Epitopes cores introduced for prediction	Method and score for IL-4 prediction	Peptide ability to induce IL4	Methods and score for IFN- γ prediction	Peptide ability to induce IFN- γ
HLA-DRB1*04:02	gE: QHICLKHTTTCFQDVV gE:HICLKHTTTCFQDVVV	QHICLKHTTTCFQDVV	SVM 0.22	IL4 inducer	MERCI 1	(-)
HLA-DRB1*04:08	gE: QHICLKHTTTCFQDVV gE:HICLKHTTTCFQDVVV	HICLKHTTTCFQDVVV	SVM 0.22	IL4 inducer	MERCI 1	(-)
HLA-DRB1*03:01	gE: QHICLKHTTTCFQDVV					
HLA-DRB1*04:08	Hem: RTDDKLRMETCFQQA	RTDDKLRMETCFQQA	SVM 0.29	IL4 inducer	SVM 0.54094801	(b)
	Hem: TDDKLRMETCFQQAC	TDDKLRMETCFQQAC	SVM 0.27	IL4 inducer	SVM 0.36426436	(b)
	Hem: DDKLRMETCFQQACK					
	Hem: RTDDKLRMETCFQQA Hem: TDDKLRMETCFQQAC	DDKLRMETCFQQACK	SVM 0.28	IL4 inducer	SVM 0.32515534	(b)
HLA-DRB1*04:02	Hsp60: MLRLPTVFRQMRPVS	MLRLPTVFRQMRPVS	SVM 0.28	IL4 inducer	SVM 0.22331148	(b)
HLA-DRB1*04:08	Hsp60: MLRLPTVFRQMRPVS					
HLA-DRB1*03:01	Hsp60: MLRLPTVFRQMRPVS					
HLA-DRB1*04:04	Hsp60: MLRLPTVFRQMRPVS					

Key: IL-4: interleukin 4, IFN- γ : Interferon-gamma, Hema: Hemagglutinin.

3.2.4. Structure prediction of homologue peptides and establishing the structural mimicry

The 3D structures of gE peptide QHICLKHTTTCFQDVVV (Fig. 1A; supplementary materials), hemagglutinin peptide RTDDKLRMETCFQQACK (Fig. 1B; supplementary materials) and MLRLPTVFRQMRPVS Hsp60 peptide (Fig. 1C; supplementary materials) were predicted and their scrambled versions were generated through the PEP-FOLD de novo modelling server and validated using RAMPAGE web-based tool.

Through RAMPAGE analysis, the number of amino acids residues (in percentage) was obtained in the favoured region proving that the predicted model is acceptable.

All peptides have shown that the percentage of residues in the favoured region is greater than 75% (>75%). For the peptide gE it is

equal to 100% (14 residues), for the peptide Hemagglutinin it is equal to 93.3% (14 residues) and for Hsp-60 it is equivalent to 76.9% (10 residues); thus peptides were subjected to a prediction of structural mimicry.

As the sequence and structure of peptides binding to HLA molecules play a crucial role in the activation of T cells, we subsequently examined if the epitopes showing sequence similarity had a structural resemblance. The superposition of the epitopes 3D structure showed structural mimicry between them with RMSDs <1 (Å) (Table 4) (Fig. 1).

4. Discussion

Infection is one of the most likely candidates involved in the

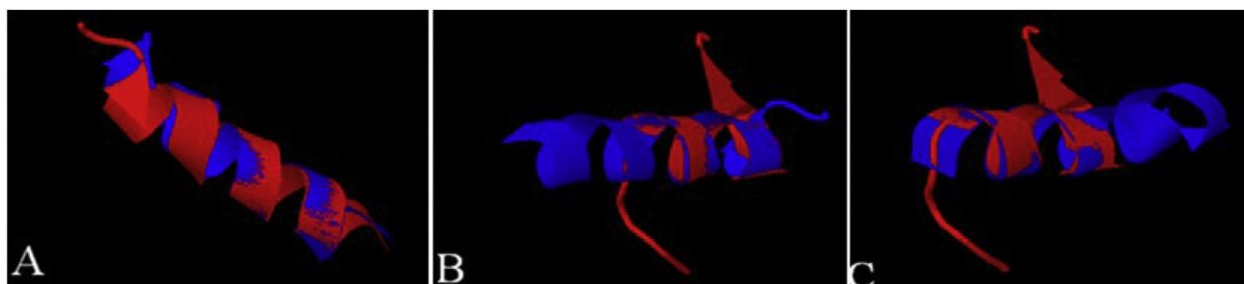


Fig. 1. Superposition peptides epitopes two by two by TM-align. A Superposition of epitope gE (blue) and hemagglutinine (red). B Superposition of epitope hemagglutinine (blue) and Hsp60 (red). C Superposition of epitope gE (blue) and Hsp60 (red).

Table 4
Autoreactive MHC class II binding viral epitopes showing structural similarity with human peptides. Diagram indicating the comparison of predicted structural similarity among the peptides selected from virales and human. The comparison was made in terms of root-mean-square deviation (RMSD).

Aligned residues of homologous peptides	RMSD (Å)	TM-score	TM-score	Figures
gE: QHICLKHTTCFQDVVV- Hema: RTDDKLRMETCFQQACK	0,85	0.51199	0.48188	Fig. 1A
Hema: RTDDKL—RMETCFQQACK— Hsp-60: —————MLRLPTVFRQMRP-VS	0,5	0.48868	0.55383	Fig. 1B
gE: —QHICLKHTTCFQDVVV— Hsp60: MLRLPTVFRQMRP—————VS	0,91	0.42846	0.45702	Fig. 1C

Key: RMSD:root-mean-square deviation, gE: glycoproteins E, Hsp60: the heat shock protein (Hsp)-60; Hema: Hemagglutinin.

development of type 1 diabetes. Infection can be involved in two stages of the development of type 1 diabetes. First as initiators of the diabetogenic process and then as triggering factors that non-specifically precipitate clinical diabetes [61].

The prediction model retains the viral infection factors “varicella and measles” and type 1 and type 2 diabetes family history as factors contributing to the occurrence of T1D with ORs of (2.11, 0.61).

Our results are in accordance with the study of Ali and al which reports that viral infection by the varicella virus and measles are risk factors of T1D [62].

Likewise, successive but independently encountered viral infections can precipitate autoimmunity. A shared viral epitope can lead to cross-activation of existing virus-specific memory T cells, to a modification of the T cell repertoire, and to subsequent induction of immunopathology [63e65].

On the one hand, we have been able to identify the epitopes and determine their sequence and structure homology (gE, hemagglutinin, Hsp60). They were identified to bind tightly to HLA class II HLA-DRB1 * 04: 02 molecules, HLA-DRB1 * 04: 08, HLA-DRB1 * 03: 01 and HLA-DRB1 * 04: 04 that are alleles of genetic predisposition to T1D in Caucasian populations [31].

On the other hand, we have shown that these cross-reactive epitopes can activate Th2 cells but only hemagglutinin and HSP60 can activate the differentiation of Th0 to Th1 cells.

The Hsp60 protein has already been mentioned in a previous study to be implicated in the etiopathology of T1D in molecular mimicry with respect to the regions of the enterovirus capsid proteins, one in the VP1 protein and the other in the VP0. This molecular mimicry results in cross-reactivity mediated by the antibodies [66].

Although Hsp60 is a ubiquitous molecule that can be the target of this autoimmune disease. It is present in a unique way in the beta cell secretory vesicles. In case of insulin secretion, these vesicles fuse with the beta-cell membrane, which causes the presentation of Hsp60 on the beta cell membrane and/or even secretion in the absence of mitochondrial stress, causing secretion differences

characteristic of other cells [67,68]. Experiments suggest that there may be specific tissue post-translational modifications of Hsp60. They have also shown how T cells are still able to proliferate in the presence of beta cells and in the absence of other antigen presenting cells. Comparable to our study, the result obtained from a study show that Hsp60 in beta cells could be specifically treated in this tissue, thereby allowing the beta cell to present Hsp60 to T cells and thus to present a specific immunogenic peptide such as p277 [68].

On the other hand, the measles virus has been incriminated in the pathogenesis of T1D by the induction of a cross reaction between the sequence (88-96aa) of the measles virus hemagglutinin glycoprotein and are homologous with the epitope peptide TPLVEDGVKQC (805e820) 2 tyrosine phosphatase (IA-2). These two peptides bind to HLA-DR4 (* 0401) and are deduced to present amino acids identical to the T cell receptor [5].

Epidemiological data strongly suggest that enteroviruses, such as coxsackievirus B4 (CVeB4), may be associated with T1D [10]. Similarly, our study provides a new hypothesis regarding the involvement of varicella virus and measles in the etiopathology of T1D and particularly in genetically predisposed diabetics (HLA DR3/DR4) via their mimetic epitopes of the glycoprotein gE and hemagglutinin exert a molecular mimicry with the human molecule Hsp60.

This study suggests a neutralization of the anti-virus activities of measles and varicella in HLA DR3/DR4 individuals prior to the development of type 1 diabetes.

Further studies are needed to clarify the relationship between Paramyxovirus - Herpesviridae and especially varicella and T1D pathogenesis, in order to develop strategies for the prevention of T1D.

5. Conclusion

Infection with varicella and measles, as well as family history of type 1 and type 2 diabetes, are considered as risk factors for the development of type 1 diabetes.

This *in silico* study confirms the sequence and structure homology between the glycoprotein gE of varicella and the measles hemagglutinin glycoprotein with the human molecule Hsp60.

These homologous peptides bind to HLA class II molecules (HLA DR3/DR4) that predispose to T1D and are not binders to protective class II HLA molecules (HLA DR15,HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02). In addition, they induce the differentiation of Th0 lymphocytes into Th2 and hemagglutinin and HSP60 activate the Th1. The obtained results are in favour of a molecular and structural mimicry between the varicella gE glycoprotein and the measles hemagglutinin glycoprotein with the molecule Hsp60 (immunogenic molecule) which becomes the target of self-reactive T cells.

5.1. Limitations of the study

In vitro tests must be undertaken in order to verify the bioinformatics predictions, which have enabled us to find epitopes, derived from the varicella virus and measles homologous to the autoantigen Hsp-60. It is also have the ability to induce an autoimmune reaction against pancreatic β cells in order to develop preventive strategies for the population of diabetics with the genetic predisposition HLA DR3/DR4.

Authors contribution

Fatima Zohra Meziane: Conceptualization, Methodology statistic and bioinformatics, Formal analysis, Writing. Madja Dali-Sahi: Supervision, Project administration. Nouria Dennouni-Medjati: Investigation, Visualization. Houssam Boulouar: Writing - review & editing. Youssouf Kachekouche: Formal statistic analysis. YasmineBenslama: Help with sampling. Yahia Harek: Writing - review & editing, validation.

Declaration of competing interest

Have not a direct or indirect interest (financial or nature) with a private, industrial or commercial organization relationship with the subject presented.

Acknowledgements

We wish to thank the coauthors for their collaboration.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.08.009>.

References

- [1] Dahlquist G. Environmental risk factors in human type 1 diabetes-an epidemiological perspective. *Diabetes Metab Res Rev* 1995;11:37e46.
- [2] Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 2008;57(4):1084e92.
- [3] Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987;50:819e20.
- [4] Blomqvist M, Juhela S, Erkkila S, Korhonen S, Simell T, Kupila A, et al. Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clin Exp Immunol* 2002;128:511e5.
- [5] Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC. T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med* 1998;4:231e9.
- [6] van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23:169e83.
- [7] Jenson AB, Rosenberg H, Notkins L. Pancreatic islet-cell damage in children with fatal viral infections. *Lancet* 1980;316:354e8.
- [8] Masuzawa M, Motojima S. A case of hypersensitivity syndrome caused by reactivation of Cytomegalovirus complicated with non-autoimmune Type 1 diabetes and painless thyroiditis. *Clin Endocrinol* 2004;52:124e8.
- [9] Imagawa A, Hanafusa T. Fulminant type 1 diabetes-an important subtype in East Asia. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:959e64.
- [10] Vreugdenhil GR, Geluk A, Ottenhoff TH, Melchers WJ, Roep BO, Galama JM. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia* 1998;41:40e6.
- [11] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 1997;28:4e34.
- [12] Nakache JP, Confais J. Statistique explicative appliquée: analyse discriminante, modèle logistique, segmentation par arbre 2003. Paris: éditions technip.
- [13] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403e10.
- [14] Huang X. The align program implements the algorithm of Huang and Miller. *Adv Appl Math* 1991;12:337e57.
- [15] Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 1990;276:172e4.
- [16] Nielsen M, Lund O, Nn-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinf* 2009;10:296.
- [17] Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinf* 2007;8:238.
- [18] Sidney J, Assarsson E, Moore C, Ngo S, Pinilla C, Sette A, et al. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome Res* 2008;4:2.
- [19] Sturniolo T, Bono E, Ding J, Radrizzani L, Tuerci O, Sahin U, et al. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 1999;17:555.
- [20] Andreatta M, Karosiene E, Rasmussen M, Stryhn A, Buus S, Nielsen M. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. *Immunogenetics* 2015;67:641e50.
- [21] Wang P, Sidney J, Dow C, Mothe B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol* 2008;4.
- [22] Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinf* 2010;11:568.
- [23] Atanasova M, Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I. MHC class II binding prediction by molecular docking. *Molecular informatics* 2011;30(4):368e75.
- [24] Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997;278:1447e50.
- [25] Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006;24:419e66.
- [26] Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra D. The immune system in health and disease. In: Janeway CA, editor. *Immunobiology*. London: Current Biology Publications; 1999. p. 115e62.
- [27] Farid NR, Sampson L, Noel P, Barnard JM, Davis AJ, Hillman DA. HLA-Derelated (DRw) antigens in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1979;28:552e7.
- [28] Undlien DE, Friede T, Rammensee HG, Joner G, Dahl-Jørgensen K, Sjøvik O, et al. HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes* 1997;46:143e9.
- [29] Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 2006;103:14074e9.
- [30] Honeyman M, Wasserfall C, Nerup J, Rossini A. Prediction and prevention of IDDM. *Diabetologia* 1997;40(Suppl 3):B58e61.
- [31] Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diabetes Rep* 2011;11:533e42.
- [32] Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. Translational mini-review series on type 1 diabetes: systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol* 2007;148:1e16.
- [33] Juwono J, Martinus RD. Does Hsp60 provide a link between mitochondrial stress and inflammation in diabetes mellitus? *J Diabetes Res* 2016;2016.
- [34] Mukherjee R, Wagar D, Stephens TA, Lee-Chan E, Singh B. Identification of CD4⁺ T cell-specific epitopes of islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein: a novel beta cell autoantigen in type 1 diabetes. *J Immunol* 2005;174:5306e15.
- [35] Abulafia-Lapid R, Gillis D, Yosef O, Atlan H, Cohen IR. T cells and autoantibodies to human HSP70 in type 1 diabetes in children. *J Autoimmun* 2003;20:313e21.
- [36] Dubey L, Steinberg SP, LaRussa P, Oh P, Gershon AA. Western blot analysis of antibody to varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1988;157:882e8.
- [37] Weinberg A, Zhang JH, Oxman MN, Johnson GR, Hayward AR, Caulfield MJ, et al. Varicella-zoster virus-specific immune responses to herpes zoster in elderly participants in a trial of a clinically effective zoster vaccine. *J Infect Dis* 2009;200:1068e77.
- [38] Kumagai T, Chiba Y, Wataya Y, Hanazono H, Chiba S, Nakao T. Development and characteristics of the cellular immune response to infection with varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1980;141:7e13.
- [39] Arvin AM, Koropchak CM, Williams BR, Grumet FC, Fong SK. Early immune response in healthy and immunocompromised subjects with primary varicella-zoster virus infection. *J Infect Dis* 1986;154:422e9.

- [40] Patterson-Bartlett J, Levin MJ, Lang N, Schodel FP, Vessey R, Weinberg A. Phenotypic and functional characterization of ex vivo T cell responses to the live attenuated herpes zoster vaccine. *Vaccine* 2007;25:7087e93.
- [41] Sadaoka K, Okamoto S, Gomi Y, Tanimoto T, Ishikawa T, Yoshikawa T, et al. Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. *J Infect Dis* 2008;198:1327e33.
- [42] Diaz P, Smith S, Hunter E, Arvin A. T lymphocyte cytotoxicity with natural varicella-zoster virus infection and after immunization with live attenuated varicella vaccine. *J Immunol* 1989;142:636e41.
- [43] Arvin AM, Sharp M, Moir M, Kinchington PR, Sadeghi-Zadeh M, Ruyechan WT, et al. Memory cytotoxic T cell responses to viral tegument and regulatory proteins encoded by open reading frames 4, 10, 29, and 62 of varicella-zoster virus. *Viral Immunol* 2002;15:507e16.
- [44] Jones L, Black AP, Malavige GN, Ogg GS. Persistent high frequencies of varicella-zoster virus ORF4 protein-specific CD4⁺ T cells after primary infection. *J Virol* 2006;80:9772e8.
- [45] Malavige GN, Jones L, Black AP, Ogg GS. Rapid effector function of varicella-zoster virus glycoprotein I-specific CD4⁺ T cells many decades after primary infection. *J Infect Dis* 2007;195:660e4.
- [46] Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 2000;406:893e7.
- [47] Takeda M, Tahara M, Nagata N, Seki F. Wild-type measles virus is intrinsically dual-tropic. *Front Microbiol* 2011;2:279.
- [48] Griffin D. In: Knipe DM, et al., editors. *Measles virus*; InFields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- [49] Lamb R, Parks G. *Fields virology*. In: Knipe DM, et al., editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- [50] Takeda M, Tahara M, Hashiguchi T, Sato TA, Jinnouchi F, Ueki S, et al. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM-and CD46-independent mechanism. *J Virol* 2007;81:12091e6.
- [51] de Swart RL, Yuksel S, Osterhaus AD. Relative contributions of measles virus hemagglutinin- and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization. *J Virol* 2005;79:11547e51.
- [52] de Swart RL, Yuksel S, Langerijs CN, Muller CP, Osterhaus AD. Depletion of measles virus glycoprotein-specific antibodies from human sera reveals genotype-specific neutralizing antibodies. *J Gen Virol* 2009;90:2982e9.
- [53] Dhanda SK, Gupta S, Vir P, Raghava G. Prediction of IL4 inducing peptides. *Clin Dev Immunol* 2013a;2013.
- [54] Dhanda SK, Vir P, Raghava GP. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. *Biol Direct* 2013b;8:30.
- [55] Thevenet P, Shen Y, Maupetit J, Guyon F, Derreumaux P, Tuffery P. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res* 2012;40:W288e93.
- [56] Zhang Y, Skolnick J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res* 2005;33:2302e9.
- [57] Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score? *Bioinformatics* 2010;26:889e95.
- [58] Charlton B, Lafferty KJ. The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1995;7:793e8.
- [59] Agrewala J, Wilkinson R. Differential regulation of Th1 and Th2 cells by p91e110 and p21e40 peptides of the 16-kD α -crystallin antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Exp Immunol* 1998;114:392e4.
- [60] Crane IJ, Forrester JV. Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2005;25(2).
- [61] Gamble DR. The epidemiology of insulin dependent diabetes with particular reference to the relationship of virus infection to its etiology. *Epidemiol Rev* 1980;2:49e70.
- [62] Ali BA, Elfoly MA, Ghazawy ER, Bersom RR. Environmental factors and the risk of type 1 diabetes mellitus-A case-control study. *J Diabetes Metabol* 2017;8(2).
- [63] Welsh RM, Selin LK. No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:417e26.
- [64] Christen U, von Herrath MG. Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Mol Immunol* 2004;40:1113e20.
- [65] Merkle D, Horvath E, Bruck W, Zinkernagel RM, Del la Torre JC, Pinschewer DD. Viral "deja vu" elicits organ-specific immune disease independent of reactivity to self. *J Clin Invest* 2006;116:1254e63.
- [66] Härkönen T, Puolakkainen M, Sarvas M, Airaksinen U, Hovi T, Roivainen M. Picornavirus proteins share antigenic determinants with heat shock proteins 60/65. *J Med Virol* 2000;62:383e91.
- [67] Brudzynski K, Martinez V, Gupta RS. Secretory granule autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus is related to 62 kDa heat-shock protein (hsp60). *J Autoimmun* 1992;5:453e63.
- [68] Birk OS, Elias D, Weiss AS, Rosen A, van-der Zee R, Walker MD, et al. NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. *J Autoimmun* 1996;9:159e66.

Chapitre 4

Les anomalies de la formule sanguine au cours du diabète de type 1 et risque cardiovasculaire

Chapitre 4 : Les anomalies de la formule sanguine au cours du diabète de type 1 et risque cardiovasculaire

1. Résumé

Contexte/Objectif : Le profil hématologique des personnes atteintes de diabète de type 1 (DT1) est déséquilibré, indiquant le risque de développer des maladies coronariennes. Notre étude a évalué l'association entre le diabète de type 1 et les anomalies de la formule sanguine considérée comme étant prédicteurs des risques cardiovasculaires.

Méthodes : L'étude a inclus **410** personnes atteintes de DT1 et **690** personnes non diabétiques au niveau de l'ouest Algérien. Les paramètres sanguins périphériques ont été évalués à l'aide d'un analyseur d'hématologie. Toutes les informations concernant la maladie ont été recueillies via un questionnaire préconçu.

Résultats : Le modèle logistique, a révélé que les sujets diabétiques avaient trois fois plus de risque d'avoir un taux élevé en globules blancs comparant aux témoins ($P = 0,005$) et il a retenu des taux élevés en éosinophiles, ce dernier est quatre fois plus associés au DT1 ($P = 0,0001$). En ce qui concerne le taux inférieur d'hématocrite, est étroitement lié aux personnes atteintes de DT1 avec un OR égal à seize ($P = 0,0001$). De plus, le taux élevé de monocytes, la vitesse de sédimentation des érythrocytes à 1h/mm, le volume plaquettaire moyen et le nombre bas de plaquettes étaient associés aux personnes atteintes du DT1.

Conclusion : Le profil hématologique associé au DT1 a révélé un déséquilibre d'un ensemble de paramètres reconnus comme étant à risque de développer des événements cardiovasculaires dont l'augmentation du volume plaquettaire moyen et le nombre élevé de leucocytes et d'éosinophiles et un faible nombre d'hématocrites.

Mots clés

Diabète de type 1, globules blancs, éosinophiles, hématocrite, risque cardiovasculaire.

2. Introduction

Le diabète de type 1 se caractérise par une glycémie élevée. Le taux élevé de glucose rigidifie la membrane érythrocytaire, altérant négativement le comportement naturel des érythrocytes, en particulier dans la microcirculation [1].

Les personnes diabétiques présentent souvent des anomalies hématologiques. Ceux-ci incluent l'anémie et d'autres problèmes de globules rouges. Les anomalies des globules blancs et des plaquettes sont également fréquentes chez les personnes atteintes de diabète [2, 3].

Ces changements hématologiques affectent les globules rouges, les globules blancs (GB) et le facteur de coagulation [4,5,6]. La taille des plaquettes est considérée comme un indicateur indirect de l'activité plaquettaire et donc un facteur important dans les complications micro et macrovasculaires du diabète [7]. Un volume plaquettaire moyen (VPM) plus élevé a été noté chez les personnes atteintes de DT1 et de diabète de type 2 et ces altérations sont liées au contrôle métabolique [7, 8].

A cet effet, le milieu métabolique du diabète modifie considérablement les fonctions plaquettaires, ainsi les paramètres morphologiques des plaquettes. La fonction plaquettaire peut être corrélée avec leur taille car les plaquettes plus grosses sont plus actives, contiennent plus de granules de sécrétion et produisent plus de thromboxane A2 qui favorise l'agrégation plaquettaire [9].

Un taux bas d'hématocrite et l'élévation de la vitesse de sédimentation des érythrocytes, coassociés à un nombre élevé de globules blancs et de leurs sous-types (par exemple, les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes et les éosinophiles) prédisent la présence d'une maladie coronarienne [10]. Il est maintenant bien établi qu'il existe une augmentation du risque cardiovasculaire des personnes atteintes de DT1 [11].

Les anomalies de la formule sanguine au cours du diabète sont fréquentes et constituent un facteur important dans l'augmentation du risque cardiovasculaire [12,13,14].

Les objectifs de cet article sont de décrire l'association entre le DT1, les anomalies hématologiques reconnues comme étant prédicteurs du risque cardiovasculaire.

3. Méthodes

Une étude cas-témoins a été menée à l'unité de Diabète Pédiatrique du CHU de Tlemcen. Les parents de tous les enfants de l'étude ont fourni un consentement éclairé écrit avant de participer à l'étude. L'étude a été menée conformément à la déclaration d'Helsinki et le protocole a été approuvé par le comité d'éthique et de recherche de l'Université de Tlemcen.

Le groupe de cas était composé de 410 personnes atteintes de DT1 avec un âge moyen de 10 ± 5 ans qui avaient été diagnostiqués avec DT1 selon les critères de l'OMS [15] et qui recevaient des soins au service pédiatrique du CHU sous insuline uniquement. Les données sur les comorbidités associées ont été collectées à partir du registre des patients, avec des données sur les soins hospitaliers et ambulatoires.

Des échantillons de sang ont été prélevés après une période de jeûne de 8 à 10 heures. Les numérations sanguines, y compris la numération des globules blancs et les différentiels, l'hémoglobine, les plaquettes, ont été analysées à l'aide de l'analyseur d'hématologie automatisé Beckman Coulter 750 par la méthode d'impédance.

Les cas ont été sélectionnés au hasard parmi les enfants fréquentant le service de diabète pédiatrique en utilisant une technique d'échantillonnage aléatoire systématique. Le groupe témoin était composé de 690 personnes non diabétiques d'un âge moyen de 16 ± 2 ans sélectionnés dans d'autres services pédiatriques du même hôpital. Le DT1 a été exclu des contrôles en consultant leurs antécédents leur glycémie au hasard.

3.1 Outils d'étude

Un questionnaire structuré a été construit en utilisant la technique Delphi par les chercheurs après avoir passé en revue la littérature sur les facteurs de risque environnementaux et le DT1 [16,17,18,19,20]. Le questionnaire a été élaboré et validé par des experts en épidémiologie et en pédiatrie. Il a été conçu pour les besoins de l'étude et les données ont été recueillies en interrogeant les parents des enfants. Il comprend les informations suivantes : (a) des données démographiques telles que le nom, l'âge, le sexe, la résidence, l'âge au moment du diagnostic de DT1 et le revenu familial ; (b) les caractéristiques parentales, telles que l'âge de la mère à l'accouchement, l'éducation, la profession, le tabagisme, la consanguinité et les antécédents de diabète pour les deux parents, et le poids à la naissance (kg).

L'analyse des données a été réalisée à l'aide de Minitab 16 pour Windows. La comparaison entre deux groupes a été analysée à l'aide du test Chi-deux sur échantillons appariés. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Une étude de régression logistique binaire a été menée pour montrer les anomalies de la numération globulaire prédictors du risque cardiovasculaire associées au diabète de type 1 et en utilisant les facteurs mesurés (la variable de réponse est appelée ici Y, qui compte les sujets diabétiques (D) et les personnes atteintes de diabète (T), (D) étant la valeur de référence).

4. Résultats

Le tableau 1 résume les paramètres hématologiques principalement associés aux personnes diabétiques. Ainsi, le nombre de globules blancs (GB) était significativement plus élevé chez les diabétiques par rapport au groupe témoins ($P = 0,0001$) et le taux d'hématocrite significativement bas ($P = 0,0001$).

Les indices de morphologie plaquettaire sont significativement différents chez les enfants atteints de DT1 par rapport au groupe sans diabète, de sorte que la numération plaquettaire était plus faible chez les enfants atteints de DT1 par rapport au groupe de témoins ($p = 0,0001$) et le volume plaquettaire moyen (VPM) chez les personnes diabétiques était significativement plus élevée que dans le groupe de témoins ($P = 0,0001$).

D'autre part, les personnes diabétiques avaient des taux plus élevés de la vitesse de sédimentation érythrocytaire (VS1h/mm) avec $P = 0,0001$.

Tableau 1. Paramètres hématologiques associés au diabète de type 1.

Paramètres hématologiques associés au DT1	Taux	cas 410	Témoins 690	p-value
Les globules blancs (GB) (GB x 10 ⁹ /L)	Taux normal	227 (55,26 %)	593 (85,94 %)	<i>p = 0,0001</i>
	Taux faible	43 (10,53 %)	19 (2,76%)	
	Taux élevé	140 (34,21%)	78 (11,30 %)	
Monocytes (x 10 ⁹ /L)	Taux normal	227 (55,26 %)	677 (98,11 %)	<i>p = 0,011</i>
	Taux élevé	183 (44,74 %)	13 (01,89 %)	
Éosinophiles (x 10 ⁹ /L)	Taux normal	140 (34,21%)	440 (63,77%)	<i>p = 0,001</i>
	Taux faible	32 (7,89%)	53 (07,68%)	
	Taux élevé	238 (57,90 %)	197 (28,55%)	
Hématocrite (%)	Taux normal	129 (31,58 %)	603 (87,39 %)	<i>p = 0,0001</i>
	Taux faible	227 (55,26 %)	78 (11,30 %)	
	Taux élevé	54 (13,16 %)	9 (1,31 %)	
Vitesse de sédimentation à 1h/mm (VS 1h/mm)	Taux normal	32 (07.89%)	178 (25,8%)	<i>p = 0,0001</i>
	Taux élevé	378 (92,11 %)	512 (74,20 %)	
Numération plaquettaire (x 10 ⁹ /L)	Taux normal	334 (81,58 %)	690 (100%)	<i>p = 0,0001</i>
	Taux faible	76 (18,42 %)	0(0%)	
Volume plaquettaire moyen (VPM) (fL)	Taux normal	270 (65,79%)	624 (90,43%)	<i>p = 0,0001</i>
	Taux élevé	140 (34,21%)	66 (9,57 %)	

10⁹/L :giga/litre , **fL** :femtolitre

Le modèle logistique repris dans le tableau 2 retient des numérations élevées de leucocytes comme facteurs associés au diabète de type 1 par rapport aux personnes non diabétiques ainsi les sujets diabétiques ont 2,70 plus de risque d’avoir une numération leucocytaire élevée (OR = 2,70 IC à 95% = 1,35-5,38, p = 0,005).

De plus, les sujets diabétiques ont 4 fois plus de risque d’avoir un nombre plus élevé d'éosinophiles (OR = 3,99 ; IC à 95 % = 2,05-7,74, p = 0,0001).

De plus, en prenant compte les termes de l'hématocrite, les résultats montrent que le niveau bas d'hématocrite est fortement associé au DT1 (OR = 15,48 ; IC à 95 % = 4,26-56,27, P = 0,0001).

Tableau 2. Résultats de la régression logistique.

Prédicteurs	Coefficients	CoefErT	Z (Wald)	p-value	OR	IC Min (95%)	IC max (95 %)
Constant	-2.77220	0.509427	-5,44	0,000			
Taux élevé de GB	0.992177	0.351961	2,82	0,005	2,70	1,35	5.38
Taux élevé d'éosinophiles	1.38273	0,338371	4.09	0,000	3,99	2.05	7,74
Taux bas d'hématocrite	2.73960	0,658420	4.16	0,000	15.48	4.26	56.27

OR : rapport de cotes, **IC** : intervalle de confiance.

Enfin, toutes les adéquations sont favorables à savoir la méthode de Pearson, la méthode de Somme des carrés d'écart, la méthode de Hosmer-Lemeshow et les méthodes de Brown (alternative générale et alternative symétrique) conduisant à un modèle acceptable avec une valeur $p > 0,05$ (**tableau 2.1**)

Tableau 2.1. Les tests d'adéquation des ajustements

Méthodes	K-squire	Df	p-value
Pearson	5.03122	4	0,284
Somme des carrés d'écart	6.71709	4	0,152
Hosmer-Lemeshow	2.55876	4	0,634
Marron : Alternative générale	4.86258	2	0,088
Marron : Alternative symétrique	1.41741	1	0,234

Le tableau 3 montre les capacités prédictives de ce modèle ; nous avons trouvé un très fort pourcentage de paires concordantes (81,5%). Le D de Somers, le Gamma de Goodman-Kruskal et le Tau-a de Kendall sont le résumé du tableau des paires concordantes et discordantes.

Généralement, ces mesures sont comprises entre 0 et 1, où les valeurs les plus élevées reflètent les meilleures capacités de prévision de ce modèle. Dans ce cas, les deux premières mesures valant 0,75 et 0,86 impliquent une capacité de prévision très forte, Tau-a Kendall donne une capacité prédictive relativement bonne.

Tableau 3. Mesure des associations (entre la variable de réponse et les prévisions de probabilité).

Paires	Nombre	Pourcentage	Mesures récapitulatives	
Concordant	2142	81,5	D de Somers	0,75
Discordant	161	6.1	Gamma de Goodman-Kruskal	0,86
Ex aequo	324	12.3	Tau-a de Kendall	0,34
Le total	2627	100,0		

5. Discussion

Notre étude montre une association statistiquement significative entre le DT1 et un nombre élevé de globules blancs. Notre population DT1 a trois fois plus de risque d'avoir un nombre élevé de globules blancs que les personnes non diabétiques.

Tong et al, ont rapporté que l'augmentation du nombre de leucocytes était des indicateurs prédictifs du développement de complications micro et macro vasculaires chez les personnes diagnostiquées avec le DT2 [21].

D'autre part, l'étude de Madjid et al indique que quel que soit l'état de la maladie, la numération leucocytaire est un facteur de risque indépendant et un indicateur pronostique des futurs résultats cardiovasculaires [13].

De plus, les modèles logistiques retenus, le nombre élevé d'éosinophiles est quatre fois plus associé aux personnes DT1 par rapport au groupe sans diabète. En ce qui concerne le nombre de globules blancs, de monocytes et d'éosinophiles, il était significativement associé au DT1.

Selon Prentice et al, l'élévation du nombre de neutrophiles, d'éosinophiles et de monocytes est un indicateur pronostique de la maladie coronarienne [22].

Un faible taux d'hématocrite était associé au DT1 avec un OR égal à 15,5. Ainsi, selon l'étude de Brun et Orsetti, une diminution de l'hématocrite chez les personnes diabétiques se retrouve principalement dans les complications vasculaires [23].

La numération plaquettaire était plus faible et le VPM était plus élevée chez les enfants atteints de DT1. L'étude de Malachowska et al menée sur des personnes atteintes de DT1 ont obtenu les mêmes résultats [24]. Selon l'étude de Singer et al, la diminution des plaquettes est associée à une augmentation de l'activité plaquettaire et de leur renouvellement ou peut être due à une thrombopoïèse inefficace selon l'étude de Wolfsdorf [25,26].

D'autre part, l'étude menée par Ersoy et al., a considéré que le VPM peut être considéré comme un marqueur de l'athérosclérose précoce chez les enfants atteints de DT1 [27] et la méta-analyse a montré que le VPM est plus élevé comme marqueur prédictif du risque cardiovasculaire [28].

La majorité des personnes atteintes de diabète avaient des taux plus élevés de vitesse de sédimentation érythrocytaire (VS1), plusieurs études ont révélé que la vitesse de

sédimentation érythrocytaire est un médiateur potentiel de l'athérogenèse et l'hypertension d'où son utilité dans la recherche de maladies cardiovasculaires [10,29, 30].

6. Conclusion

En conclusion, le modèle prédictif a montré un déséquilibre des paramètres sanguins chez les diabétiques qui sont les principaux prédicteurs de la numération globulaire liés au risque potentiel d'événement cardiovasculaire. L'étude montre un nombre élevé de leucocytes et d'éosinophiles et un faible nombre d'hématocrites.

Cependant, il est recommandé un dépistage systématique et régulier du profil hématologique des personnes diabétiques.

7. Références

- [1] Cho YI, Mooney MP, Cho DJ. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol.* 2008;2 (6), 1130-1138. <https://doi.org/10.1177/193229680800200622>
- [2] Hillson R. Diabetes and the blood–red cells. *Practical Diabetes*, 2015, vol. 32, no 4, p. 124-126. <https://doi.org/10.1002/pdi.1939>
- [3] Valle A, et al. Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. *Diabetes.* 2013; 62:2072–7. <https://doi.org/10.2337/db12-1345>
- [4] Jung C-H, Lee W-Y, Kim B-Y, Park SE, Rhee E-J, Park C-Y, et al. The risk of metabolic syndrome according to the white blood cell count in apparently healthy Korean adults. *YONSEI MED J.* 2013;54(3):615-20. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.3.615>.
- [5] Kawamoto R, Tabara Y, Kohara K, Miki T, Kusunoki T, Abe M, et al. Hematological parameters are associated with metabolic syndrome in Japanese community-dwelling persons. *Endocrine.* 2013;43(2):334-41. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9662-7>
- [6] Wang Y-Y, Lin S-Y, Liu P-H, Cheung BM, Lai W-A. Association between hematological parameters and metabolic syndrome components in a Chinese population. *J Diabetes Complications.* 2004;18(6):322-7. [https://doi.org/10.1016/S1056-8727\(04\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S1056-8727(04)00003-0)
- [7] Glassman AB. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Ann Clin Lab Sci.* 1993;23(1):47-50.
- [8] Sharpe P, Trinick T. Mean platelet volume in diabetes mellitus. *Q J Med. QJM.* 1993;86(11):739-42. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068755>
- [9] Thompson CB, Eaton KA, Princiotta SM, Rushin CA, Valeri CR. Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Br J Haematol.* 1982; 50:509–19.
- [10] Madjid M, Fatemi O. Components of the complete blood count as risk predictors for coronary heart disease: in-depth review and update. *Tex. Heart Inst. J.* 2013;40(1):17.
- [11] Demirel F, Tepe D, Kara Ö, Esen İ. Microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J CLIN RES PEDIATR E.* 2013;5(3):145. <https://doi.org/10.4274/Jcrpe.994>.
- [12] Stankute I, Dobrovolskiene R, Danyte E, Razanskaite-Virbickiene D, Jasinskiene E, Mockeviciene G, et al. Factors affecting cardiovascular risk in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes. *J Diabetes Res.* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9134280>
- [13] Madjid M, Awan I, Willerson JT, Casscells SW. Leukocyte count and coronary heart

disease: implications for risk assessment. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(10):1945-56.<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.07.056>

[14] Barron HV, Cannon CP, Murphy SA, Braunwald E, Gibson CM. Association between white blood cell count, epicardial blood flow, myocardial perfusion, and clinical outcomes in the setting of acute myocardial infarction: a thrombolysis in myocardial infarction 10 substudy.

Circulation. 2000;102(19):2329-34.<https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.19.2329>

[15] Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Genève, World Health Organisation, 2011.

[16] Dali-Sahi M, Benmansour D. Evaluation du risque de survenue du diabète de type 1 dans une population consanguine de l'ouest Algérien. *Lebanese Sciences Journal.* 2014 ; 5, N° 2

[17] Craig ME, Nair S, Stein H, Rawlinson WD. Virus et diabète de type 1: Un nouveau regard sur une vieille histoire. *Pediatr. Diabète.* 2013; 14 : 149-158. doi: 10.1111 / pedi.12033.

[18] Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Bulsara MK, Cinek O, Rosenbauer J, Ludvigsson J, Jané M, Svensson J, Goldacre MJ. Âge maternel à la naissance et diabète de type 1 infantile: une analyse groupée de 30 études d'observation. *Diabète.* 2010; 59 : 486–494. doi: 10.2337 / db09-1166.

[19] Cardwell C, Stene L, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre M, Parslow R, Pozzilli P, Brigis G, Stoyanov D, et al. La césarienne est associée à un risque accru de diabète sucré de type 1 de l'enfance: une méta-analyse d'études observationnelles. *Diabétologie.* 2008; 51 : 726–735. doi: 10.1007 / s00125-008-0941-z.

[20] Cardwell CR, Stene LC, Ludvigsson J, Rosenbauer J, Cinek O, Svensson J, Perez-Bravo F, Memon A, Gimeno SG, Wadsworth EJ, et al. Diabète de type 1 de l'allaitement et de l'enfance. *Traitements diabétiques.* 2012; 35 : 2215-2225. doi: 10.2337 / dc12-0438.

[21] Tong PC, Lee K-F, So W-Y, Ng MH, Chan W-B, Lo MK, et al. White blood cell count is associated with macro- and microvascular complications in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care.* 2004;27(1):216-22.<https://doi.org/10.2337/diacare.27.1.216>

[22] Prentice RL, Szatrowski TP, Fujikura T, Kato H, Mason MW, Hamilton HH. Leukocyte counts and coronary heart disease in a Japanese cohort. *Am J Epidemiol.* 1982;116(3):496-509.<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113434>.

[23] Brun JF, Orsetti A. Hematocrit in type 1 diabetics. *CLIN HEMORHEOL MICRO.* 1989;9:361-6.<https://doi.org/10.3233/CH-1989-9220>

[24] Malachowska B, Tomasik B, Szadkowska A, Baranowska-Jazwiecka A, Wegner O, Mlynarski W, et al. Altered Platelets' morphological parameters in children with type 1 diabetes—a case-control study. *BMC Endocr. Disord.* 2015;15(1):17.<https://doi.org/10.1186/s12902-015-0011-8>.

[25] Singer J, Snir AW, Leshem-Lev D, Rigler M, Kornowski R, Lev EI. Effect of intensive glycemic control on platelet reactivity in patients with long-standing uncontrolled diabetes.

Thrombosis research. 2014;134(1):121-4.<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.05.010>

[26] Wolfsdorf JI. The International Society of Pediatric and Adolescent Diabetes guidelines for management of diabetic ketoacidosis: do the guidelines need to be modified? *Pediatric Diabetes*. 2014;15(4):277-86.<https://doi.org/10.1111/pedi.12154>

[27] Ersoy M, Duru HNS, Elevli M, Ersoy O, Civilibal M. Aortic intima-media thickness and mean platelet volume in children with type 1 diabetes mellitus. *Iran. J. Pediatr*. 2015;25(2). <https://doi.org/10.5812/ijp.368>.

[28] Chu S, Becker R, Berger P, Bhatt D, Eikelboom J, Konkle B, et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2010;8(1):148-56. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03584.x>

[29] Merad-boudia HN, Dali-Sahi M, Kachekouche Y, Dennouni-Medjati N. Hematologic disorders during essential hypertension. *Diabetes Metab Syndr: Clinical Research & Reviews*.2019;13(2):1575-9.<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.03.011>

[30] Kachekouche Y, Dali-Sahi M, Benmansour D, Dennouni-Medjati N. Hematological profile associated with type 2 diabetes mellitus.*Diabetes Metab Syndr: Clinical Research & Reviews*. 2018;12(3):309-12.<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.12.015>

Chapitre 5

Risque de complications macrovasculaires associées aux paramètres lipidiques et à la durée du diabète dans le diabète de type 1

Chapitre 5 : Risque de complications macrovasculaires associées aux paramètres lipidiques et à la durée du diabète dans le diabète de type 1

1. Résumé

Objectifs : L'objectif de cette étude était d'identifier les facteurs de risque dont les modifications des paramètres lipidiques qui favorisent le développement de complications macrovasculaires.

Méthodes :

Notre population d'étude est composée de 103 personnes atteintes de diabète de type 1. Il est composé de 22 adultes âgés [30-56 ans] qui présentent des complications macrovasculaires. Il y a 81 participants n'ayant eu aucune complication dont 23 adolescents [10-18 ans], 7 jeunes adultes [20-25 ans], 51 adultes [>25 ans].

Résultats : L'analyse descriptive des deux groupes a montré que 82 % des diabétiques ayant les complications macrovasculaires avaient une durée de diabète de plus de 10 ans, contre 48 % dans le deuxième groupe. 68 % des diabétiques avec complications avaient un IMC supérieur à 25 kg/m² et des taux élevés de cholestérol total et de triglycérides qui étaient significativement plus élevés.

La régression logistique binaire a montré que l'augmentation des taux de triglycérides et la durée du diabète sur 10 ans sont des facteurs de risque de complications macrovasculaires.

Conclusion :

La maladie macrovasculaire est une athérosclérose des gros vaisseaux dans laquelle le surpoids, l'obésité et des paramètres lipidiques élevés (cholestérol, triglycérides) jouent un rôle fondamental dans son établissement. La durée prolongée du diabète s'ajoute à ces différents facteurs en multipliant par quatre le risque de développer ces complications dans notre population.

Mots clés

Diabète de type 1, complications macrovasculaires, triglycérides, durée du diabète, surpoids, obésité.

2. Introduction

Le diabète de type 1 est une maladie complexe, qui se développe dans divers états de complications microvasculaires et macrovasculaires. Les complications microvasculaires sont spécifiques au diabète et comprennent la rétinopathie diabétique, la néphropathie et la neuropathie [1].

Les complications macrovasculaires comprennent la maladie coronarienne, la maladie de l'artère carotide, la maladie vasculaire périphérique et la maladie des vaisseaux cérébraux impliquant les grosses artères qui peut conduire aux troubles suivants (Angor et infarctus du myocarde, Accidents vasculaires cérébraux ischémiques transitoires ou permanents ,Maladie artérielle périphérique)[2, 3]. Ces complications ne sont pas spécifiques au diabète ; cependant, les patients diabétiques ont une athérosclérose accélérée et un risque plus élevé de maladie macrovasculaire par rapport à la population générale [1].

En plus de ces complications, les diabétiques se caractérisent par la présence d'altérations structurelles et fonctionnelles des artères de gros et moyen calibre, telles qu'une augmentation de l'épaisseur et de la rigidité de la paroi artérielle [4 , 5 , 6].

Bien que les complications vasculaires du DT1 surviennent rarement avant la puberté, il est reconnu que l'athérosclérose débute dans l'enfance et évolue avec une dyslipidémie [7].

De plus, la dyslipidémie chez les personnes atteintes de diabète de type 1 est associée à un développement précoce d'anomalies cardiaques et vasculaires [8] par l'augmentation du cholestérol LDL, les taux de triglycérides, les taux de cholestérol total et la diminution du cholestérol HDL [9].

L'association entre l'hypertriglycémie et l'athérosclérose n'est pas encore claire [10-13] cependant l'athérosclérose peut être un phénomène postprandial dans lequel les lipoprotéines résiduelles jouent un rôle fondamental [14-16] et l'augmentation des taux de triglycérides à jeun reflète des taux accrus de lipoprotéines résiduelles, cela permettra la prédiction du risque d'infarctus du myocarde (IM), de cardiopathie ischémique [17].

De nombreuses données confirment le rôle prédictif de l'âge, de la durée du diabète, de l'adiposité abdominale et de la dyslipidémie sur la mortalité cardiovasculaire [18, 19].

L'étude EURODIAB d'une cohorte de personnes atteintes de DT1 a déjà montré que la durée du diabète, le tabagisme, l'indice de masse corporelle (IMC), la pression artérielle et les triglycérides étaient associés au développement de la neuropathie [20].

Le but de notre étude était d'étudier les facteurs de risque et les modifications de certains paramètres lipidiques associés aux complications macrovasculaires chez les personnes atteintes de DT1 dans l'extrême ouest de l'Algérie (Tlemcen).

3. Méthodes

Cette étude a été conçue comme une analyse transversale des patients atteints de DT1 et a été menée à l'unité de diabète pédiatrique et à l'unité d'endocrinologie du CHU de Tlemcen. Tous les participants et leurs parents ont fourni un consentement éclairé avant de participer à l'enquête. L'étude a été réalisée conformément à la déclaration d'Helsinki et a été réalisée suite à la loi algérienne (25/2006, Résolution N ° 0,387), il a été approuvé par le comité

d'éthique et de recherche de l'Université de Tlemcen.

L'échantillon était composé de 103 participants atteints de DT1 et qui avaient développé le DT1 avant l'âge de 35 ans. Les participants ont été sélectionnés au hasard parmi les adolescents, les jeunes adultes et les adultes qui se sont présentés pour des visites médicales de routine à l'hôpital et aux centres sanitaires de la ville de Tlemcen (extrême ouest de l'Algérie), après avoir reçu l'autorisation du comité d'éthique institutionnel.

Le diagnostic du DT1 a été posé sur la base des critères de l'OMS par le médecin spécialiste [21]. Les patients recevaient des soins dans l'unité d'endocrinologie et de pédiatrie du CHU, ils étaient sous insulinothérapie. Les données sur les comorbidités associées ont été collectées à partir du registre des patients, avec des données sur les soins hospitaliers et ambulatoires.

Des échantillons de sang ont été prélevés après une période de 8 à 10 h à jeun. Les paramètres du profil lipidique ont été analysés à l'aide Roche modulaire P800 utilisant des méthodes standard. Le cholestérol total (CT), les triglycérides (TG) et les niveaux de HDL-C ont été mesurés. Les taux de LDL-C ont été calculés par la formule de Friedewald en utilisant les données des lipides disponibles [22]. Les taux sériques de CT supérieurs à 200 mg / dl, le taux de TG supérieur à 150 mg / dl, le taux de LDL-C supérieur à 130 mg / dl, ou le taux de HDL-C inférieur à 40 mg / dl ont été considérés comme la dyslipidémie [23].

3.1 Outils d'étude.

Un questionnaire structuré a été construit en utilisant la technique Delphi par les chercheurs après avoir examiné la littérature sur les facteurs de risque de complications du diabète pour les patients DT1 [24-27].

Le questionnaire a été élaboré et validé par des experts en épidémiologie et en pédiatrie. Il a été conçu à la fin de l'étude et les données ont été recueillies en interrogeant les parents, les jeunes adultes et les adultes de l'adolescent. Il comprend les informations suivantes : (a) des données démographiques telles que le nom, l'âge, le sexe, la résidence, l'âge au moment du diagnostic de DT1 et le revenu familial ; (b) les caractéristiques parentales, telles que l'âge de la mère à l'accouchement, l'éducation, la profession, le tabagisme, la consanguinité et les antécédents de diabète pour les deux parents, et le poids à la naissance (kg).

L'analyse des données a été réalisée à l'aide de Minitab 16 pour Windows. La comparaison entre deux groupes a été analysée à l'aide du test Chi-deux et test de student pour échantillon apparié. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Une étude de régression logistique binaire a été réalisée pour déterminer un modèle prédictif des personnes atteintes de DT1 en utilisant les facteurs mesurés (la variable de réponse est ici notée Y, qui compte les diabétiques de type 1 ayant des complications macrovasculaires (D) et les diabétiques de type 1 sans complications macrovasculaires (T), (D) étant la valeur de référence).

4. Résultats

Les caractéristiques anthropométriques de la population étudiée sont présentées dans le tableau 1.

Le groupe d'étude était composé de 103 sujets, dont 22 adultes âgés de 30 à 56 ans ont développé des complications macrovasculaires, alors que 81 n'ont pas développé ces complications, dont 23 adolescents, 7 jeunes adultes et 51 adultes. L'âge au moment du

diagnostic du diabète de type1 était inférieur à 35 ans.

La durée moyenne du diabète était de 15 ± 5 ans pour les diabétiques avec des complications et significativement plus élevée que le deuxième groupe de diabétiques (11 ± 7 ans). En outre, 82% des sujets ayant des complications avaient une durée du diabète plus de 10 ans, comparant à 48% des diabétiques qui ne présentent pas de complications, cette différence est statistiquement significative avec une valeur de p-value égale à 0,005.

Le surpoids et l'obésité étaient significativement plus élevés chez les patients présentant des complications avec un IMC moyen égal à 28 ± 7 (Kg/m^2) par rapport aux diabétiques sans complications $P=0,021$ (tableau1).

Tableau1. Caractéristiques anthropométriques de la population étudiée.

Les facteurs		Cas avec au moins une complication macrovasculaire 22	Cas sans complications macrovasculaires 81	p-value
Age (Années)		44 ± 9	32 ± 15	p=0.0001
Sexe %	Masculin	7 (32%)	40 (49%)	p =0.142
	Féminin	15 (68%)	41 (51%)	
Âge de découverte du diabète (années)		29 ± 9	21 ± 13	p =0.002
Durée du diabète (années)		15 ± 5	11 ± 7	p =0.004
Durée du diabète	>10 ans	18 (82%)	39 (48%)	p =0.005
	<10 ans	4 (18%)	42 (52%)	
Consanguinité %	Presence	11 (50%)	29 (36%)	p=0.226
	Absence	11 (50%)	52 (64%)	
Antécédents familiaux de diabète	Presence	16 (73%)	48 (59%)	p =0.248
	Absence	6 (27%)	33 (41%)	
IMC (Kg/m^2)		28 ± 7	24 ± 6	p=0.021
IMC (<18)		0 (0%)	12 (15%)	p= 0,003
IMC (18-25)		7 (32%)	47 (58%)	
IMC (25-30)		6 (27%)	9 (11%)	
IMC >30		9 (41%)	13 (16%)	

IMC : indice de masse corporelle, les valeurs en gras sont significatives

Le tableau 2 résume les paramètres lipidiques caractéristiques des patients atteints de DT1.

La population des diabétiques atteints de complications macrovasculaires renferme une fréquence élevée de patients ayant des taux élevés en cholestérol total et de triglycérides par rapport aux diabétiques sans complications qui sont de l'ordre de (27 % vs 6 %) (64 % vs 35 %) respectivement. Alors qu'aucune différence significative n'a été observée entre les deux populations diabétiques pour les taux de cholestérol LDL et HDL.

Tableau 2. Paramètres lipidiques caractéristiques de la population étudiée.

Paramètres		Cas avec au moins une complication macrovasculaire 22	Cas sans complications macrovasculaires 81	p-value
Cholestérol total (g/L)	Moyenne ± Ecart-Type	1.80±0.38	1.55±0.32	<i>p=0.008</i>
	Individus ayant des niveaux normaux	16 (73%)	76 (94%)	<i>p=0.004</i>
	Individus ayant des niveaux élevés	6 (27%)	5 (6%)	
Triglycéride (g/L)	Moyenne ± Ecart-Type	1.45±0.65	1.19±0.5	<i>p = 0.093</i>
	Individus ayant des niveaux normaux	8 (36%)	53(65%)	<i>p=0.014</i>
	Individus ayant des niveaux élevés	14 (64%)	28 (35%)	
LDL-C (g/L)	Moyenne ± Ecart-Type	1.05±0.35	0.93±0.27	<i>p=0.147</i>
	Individus ayant des niveaux normaux	21 (95%)	80(99%)	<i>p=0.114</i>
	Individus ayant des niveaux élevés	1 (5%)	1(1%)	
HDL-C (g/L)	Moyenne ± Ecart-Type	0.42±0.06	0.4±0.058	<i>p=0.172</i>
	Individus ayant des niveaux normaux	14 (64%)	46(57%)	<i>p=0.564</i>
	Individus ayant des niveaux bas	8(36%)	35(43%)	

g/L :gramme/litre **LDL-C** : Low Density Lipoprotein-cholestérol; **HDL-C** : High Density Lipoprotein -cholestérol ; Les valeurs en gras sont significatives.

Les résultats de notre modèle logistique présentés dans le tableau 3 montrent que le taux élevé de triglycéride est un facteur de risque de complications macrovasculaires avec un Odd Ratio de 1,67 (OR = 1,67; IC à 95% = 1,00 à 2,77, P = 0,049), et que les personnes ayant une durée de diabète de plus de 10 ans ont 4 fois plus de risque de développer ces complications (OR = 4,20; IC à 95% = 1,28 à 13,80, P = 0,018).

Tableau 3. Résultats de la régression logistique.

Prédicteurs	Coefficients	CoefErT	Z (Wald)	p-value	OR	IC Min (95%)	IC max (95 %)
Constant	-2.75983	0.588813	-4,69	0,000			
Taux élevés de triglycérides	0.511184	0,259264	1,97	0,049	1,67	1,00	2,77
Durée du diabète supérieure à 10 ans	1.43592	0.606430	2,37	0,018	4.20	1,28	13.80

OR : Odds Ratio ; **IC** : intervalle de confiance.

Enfin, tous les ajustements sont favorables à savoir la méthode de Pearson, la méthode de la déviance, la méthode de Hosmer-Lemeshow et les méthodes de Brown (alternative générale et alternative symétrique) conduisent à un modèle acceptable avec une valeur p de 0,05 (tableau 3.1).

Tableau 3.1. Les tests d'adéquation des ajustements

Méthodes	K-squire	Df	p-value
Pearson	1.20695	1	0,272
Somme des carrés d'écart	1.24818	1	0,264
Hosmer-Lemeshow	1.20695	2	0,547
Marron :Alternative générale	1.20695	2	0,547
Marron :Alternative symétrique	1.20668	1	0,272

Le tableau 4 montre les capacités prédictives de ce modèle ; nous avons trouvé un pourcentage élevé de paires concordantes (61,2%). Le D de Somers, le Gamma de Goodman-Kruskal et le Tau-a de Kendall sont le résumé du tableau des paires concordantes et discordantes.

Tableau 4. Mesure des associations (entre la variable de réponse et les prévisions de probabilité).

Paires	Nombre	Pourcentage	Mesures récapitulatives	
Concordant	1091	61,2	D de Somers	0,45
Discordant	286	16,0	Gamma de Goodman-Kruskal	0,58
Ex aequo	405	22,7	Tau-a de Kendall	0,15
Le total	1782	100,0		

5. Discussion

Les études des paramètres lipidiques ont accumulé des preuves biologiques concernant les triglycérides, l'athérosclérose et la thrombose indiquant l'importance potentielle des triglycérides dans l'étiologie de la maladie coronarienne [28].

Les résultats de notre étude indiquent l'association de taux élevés de cholestérol total et de triglycérides avec des complications macrovasculaires. Cela corrobore avec les résultats d'études antérieures qui ont montré que la concentration en triglycérides est un puissant prédicteur de maladies cardiovasculaires chez les diabétiques [29]. De plus, l'étude prospective de Fontbonne et al a révélé que la concentration en triglycérides était le prédicteur indépendant le plus fort de la mort coronarienne [30]. Des études épidémiologiques ont suggéré que la dyslipidémie et un faible taux de cholestérol HDL sont des facteurs de risque de complications cardiovasculaires [9, 31].

D'autre part, le modèle logistique montre que les diabétiques ayant des taux élevés de triglycérides ont presque deux fois plus de risques de développer des complications macrovasculaires.

De plus, d'autres études ont montré que l'augmentation des taux de triglycérides est un facteur de risque causal de maladies cardiovasculaires indépendamment du cholestérol HDL et LDL [31, 32]. De plus, l'étude d'Iso et al a montré que le taux de cholestérol total n'influçait pas la relation entre les triglycérides et les maladies coronariennes [33].

L'étude de Brewer et al a supposé que le taux élevé de TG augmente le risque de maladie coronarienne par les effets athérogènes des lipoprotéines résiduelles riches en TG, qui sont d'origine hépatique et intestinale, partiellement dégradées qui ont perdu des TG par l'action de la lipoprotéine lipase et ont pris des esters de cholestérol grâce à l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol [34].

De plus, les lipoprotéines riches en TG sont pro-inflammatoires et peuvent provoquer un dysfonctionnement endothélial [35], réguler positivement l'expression des molécules d'adhésion endothéliales et favoriser la chimiotaxie des macrophages. Elles sont particulièrement susceptibles de pénétrer dans la paroi artérielle où elles sont ingérées par les macrophages (par analogie avec les LDL oxydées), puis transformées en cellules spumeuses et peuvent ainsi provoquer l'athérosclérose [36-38].

En revanche, un taux élevé de TG supérieur à 150 mg/dL est un déterminant du risque de syndrome métabolique [39], cependant, dans notre population d'étude, le surpoids et l'obésité se sont avérés significativement associés aux sujets diabétiques ayant des complications macrovasculaires. .

En revanche, la durée du diabète supérieure à 10 ans est un facteur de risque imminent dans notre population d'étude car les diabétiques ont 4 fois plus de risque de développer des complications macrovasculaires.

Cela a été rapporté dans une population de DT2 où Zoungas et al ont retrouvé que la durée du diabète est associée au risque de complications macrovasculaires [40] et l'étude des Jerneld et Algvere a montré que la rétinopathie chez les patients traités à l'insuline a été corrélée à la durée de diabète [41].

Selon l'étude de Fox et al, le risque de maladie coronarienne est multiplié par 1,5 pour chaque augmentation de 10 ans de la durée du diabète. [42].

Les anomalies lipidiques observées chez les patients diabétiques peuvent être dues à l'altération du métabolisme lipidique associée au DT1, c'est pourquoi une surveillance particulière du profil lipidique doit être préconisée notamment chez les patients ayant un diabète de plus de 10 ans.

6. Conclusion

Les personnes atteintes de diabète de type 1 dans notre population d'étude ne sont pas à l'abri des risques macrovasculaires et microvasculaires habituels. Il apparaît que les troubles des paramètres lipidiques (augmentation du cholestérol total et des triglycérides) ainsi que le surpoids et l'obésité sont significativement plus élevés chez les personnes atteintes de diabète de type 1 avec complications macrovasculaires par rapport aux diabétiques n'ayant pas de complications. Ce risque est associé à des taux élevés de triglycérides et à une durée de diabète supérieure à 10 ans évaluée par régression logistique.

7. Références

- [1] Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017; doi.org/ 10.1038/nrdp.2017.16.
- [2] Collaboration ERF. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet*. 2010; doi.org/ 10.1016/S0140-6736(10)60484-9.
- [3] Cukierman T, Gerstein H, Williamson J. Cognitive decline and dementia in diabetes—systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia*. 2005; doi.org/ 10.1007/s00125-005-0023-4.
- [4] Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D, Group MRFITR. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes care*. 1993;doi.org/10.2337/diacare.16.2.434.
- [5] Mancia G, Giannattasio C. Structural arteriolar changes in diabetes mellitus. Oxford University Press. 1997; doi.org/ 10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a015396.
- [6] Kool MJ, Lambert J, Stehouwer CD, et al. Vessel wall properties of large arteries in uncomplicated IDDM. *Diabetes care*. 1995;doi.org/10.2337/diacare.18.5.618.
- [7] Bjornstad P, Wadwa RP. Risks and benefits of statin use in young people with type 1 diabetes. *Curr. Diabetes Rep*. 2014; doi.org/10.1007/s11892-014-0499-8.
- [8] Snell-Bergeon JK, Nadeau K. Cardiovascular disease risk in young people with type 1 diabetes. *J. Cardiovasc. Transl. Res*. 2012; doi.org/10.1007/s12265-012-9363-x.
- [9] Feingold KR, Grunfeld C. Diabetes and dyslipidemia. *Endotext* [Internet]. 2000.2000-15.
- [10] Austin MA, McKnight B, Edwards KL, et al. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: a 20-year prospective study. *Circulation*. 2000; doi.org/10.1161/01.cir.101.24.2777.
- [11] Mahley R, Jr Rall SC. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). The metabolic and molecular bases of inherited disease. 2001; doi.org/10.1036/ommbid.148.
- [12] Sarti C, Gallagher J. The metabolic syndrome: prevalence, CHD risk, and treatment. *J. Diabetes Complicat*. 2006; doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2005.06.014.
- [13] Brunzell J, Deeb SS. Familial lipoprotein lipase deficiency, apo C-II deficiency, and hepatic lipase deficiency. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 2001; doi.org/ 10.1036/ommbid.145.
- [14] Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*. 1979; doi.org/10.1161/01.cir.60.3.473.
- [15] Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, et al. Relation of triglyceride metabolism and

coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* ARTERIOSCL THROM VAS. 1992; doi.org/10.1161/01.atv.12.11.1336.

[16] Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Askalopoulou SS, et al. Clinical relevance of postprandial lipaemia. *Curr. Med. Chem.* 2005; doi.org/10.2174/0929867054546609.

[17] Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *Jama.* 2007; doi.org/ 10.1001/jama.298.3.299.

[18] Soedamah Muthu SS, Chaturvedi N, Witte D, et al. Relationship Between Risk Factors and Mortality in Type 1 Diabetic Patients in Europe. *Diabetes Care.* 2008; doi.org/10.2337/dc08-0107.

[19] Baigent C, Blackwell L, Emberson J, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet (London, England).* 2010; doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61350-5.

[20] Tesfaye S, Stevens L, Stephenson J, et al. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia.* 1996; doi.org/10.1007/s001250050586.

[21] Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Genève, World Health Organisation, 2011.

[22] Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin. Chem.* 1990; doi.org/10.1093/CLINCHEM/36.1.15.

[23] Tümer N, Yalcinkaya F, Ince E, et al. Blood pressure nomograms for children and adolescents in Turkey. *Pediatr. Nephrol.* 1999;doi.org/10.1007/s004670050636.

[24] M.Dali-Sahi, D.Benmansour. ÉVALUATION DU RISQUE DE SURVENUE DU DIABÈTE DE TYPE 1 DANS UNE POPULATION CONSANGUINE DE L'OUEST ALGÉRIEN. *Leban. sci. j.*2014 .

[25] Craig ME, Nair S, Stein H, Rawlinson WD. Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story. *Pediatr. Diabetes.* 2013;doi.org/10.1111/pedi.12033.

[26] Cardwell CR, Stene LC, Joner G, et al. Maternal age at birth and childhood type 1 diabetes: a pooled analysis of 30 observational studies. *Clin. Diabetol.* 2010;doi.org/10.2337/db09-1166.

[27] Cardwell CR, Stene LC, Ludvigsson J, et al. Breast-feeding and childhood-onset type 1 diabetes: a pooled analysis of individual participant data from 43 observational studies. *Diabetes care.* 2012; doi.org/10.2337/dc12-0438.

[28] Austin MA. Plasma triglyceride as a risk factor for coronary heart disease, The epidemiologic evidence and beyond. *Am. J. Epidemiol.* 1989;

doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115130.

[29] Jaiswal M, Schinske A, Pop-Busui R. Lipids and lipid management in diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; doi.org/10.1016/j.beem.2013.12.001.

[30] Fontbonne A, Eschwege E, Cambien F, et al. Hypertriglyceridaemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. *Diabetologia.* 1989; doi.org/10.1007/BF00265546.

[31] Stankute I, Dobrovolskiene R, Danyte E, et al. Factors affecting cardiovascular risk in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes. *J. Diabetes Res.* 2019; doi.org/10.1155/2019/9134280.

[32] Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a metaanalysis of population-based prospective studies. *Journal of cardiovascular risk.* 1996; doi.org/10.1177/174182679600300214.

[33] Iso H, Naito Y, Sato S, et al. Serum triglycerides and risk of coronary heart disease among Japanese men and women. *American journal of epidemiology.* 2001; doi.org/10.1093/aje/153.5.490

[34] Brewer Jr HB. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 1999; doi.org/10.1016/s0002-9149(99)00308-2.

[35] Nakamura T, Takano H, Umetani K, et al. Remnant lipoproteinemia is a risk factor for endothelial vasomotor dysfunction and coronary artery disease in metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2005; doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.01.012.

[36] Nordestgaard BG, Wootton R, Lewis B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo: molecular size as a determinant of fractional loss from the intima–inner media. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; doi.org/10.1161/01.atv.15.4.534.

[37] Shaikh M, Wootton R, Nordestgaard B, et al. Quantitative studies of transfer in vivo of low density, Sf 12-60, and Sf 60-400 lipoproteins between plasma and arterial intima in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1991; doi.org/10.1161/01.atv.11.3.569.

[38] Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007; doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890.

[39] Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* 1998; doi.org/10.1016/s0002-9149(98)00033-2.

[40] Zoungas S, Woodward M, Li Q, et al. Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2

diabetes. *Diabetologia*. 2014; doi.org/10.1007/s00125-014-3369-7.

[41] Jerneld B, Algvare P. Relationship of duration and onset of diabetes to prevalence of diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 1986; doi.org/10.1016/0002-9394(86)90069-3.

[42] Fox CS, Sullivan L, D'Agostino RB, Wilson PW. The significant effect of diabetes duration on coronary heart disease mortality: the Framingham Heart Study. *Diabetes care*. 2004; doi.org/10.2337/diacare.27.3.704.

Discussion Générale et Conclusion

1. Discussion générale

Grand nombre de maladies humaines sont des maladies dites complexes ou multifactorielles, résultant non pas de l'effet délétère d'une mutation fonctionnelle dans la population générale mais de l'interaction de plusieurs facteurs génétiques avec des facteurs environnementaux.

Pris séparément, chaque facteur n'a qu'une contribution modeste au risque génétique global pour une maladie complexe donnée. La difficulté réside dans l'identification des différents facteurs de susceptibilité et dans la détermination de la combinaison des allèles à risque pour laquelle le risque relatif de développer la pathologie sera le plus élevé.

Cette démarche a eu recours à un nombre considérable de données individuelles et familiales, l'utilisation de marqueurs génétiques soit hautement polymorphes, soit bi-alléliques pertinents (fonctionnels), un traitement informatique des données et enfin, une analyse par des méthodes statistiques adaptées à la problématique des maladies multifactorielles.

De plus, notre région d'étude est marquée par la consanguinité fréquemment retrouvée dans les populations de diabétiques (Dali-Sahi and Benmansour, 2014) confortant la transmission des facteurs héréditaires qui favorise le développement du diabète de type 1. Dans les pays Arabes, la consanguinité et les taux de mariage des cousins germains sont parmi les plus élevés rapportés dans le monde entier. Ceci se traduit par l'augmentation de l'homozygotie à la fois des haplotypes HLA et des gènes non HLA associés à la susceptibilité ou à la protection au diabète de type 1 faisant de la population Arabe une population de choix pour l'étude génétique du diabète de type 1 (Zayed 2016).

L'étude cas-témoins, avec une population de 717 cas et 959 témoins, a permis d'étudier l'influence des gènes HLADR3/DR4 et d'éventuels marqueurs microsatellites liés à la région HLA pouvant servir de marqueurs potentiels. D'autre part nous avons évalué l'influence des gènes HLADR3/DR4 sur la susceptibilité au diabète de type 1.

Dans cette étude, nous mettons en évidence une association génétique au DT1 où le génotype HLADR3/DR4 augmente deux fois le risque de développer le diabète de type 1.

Ce résultat conforte la notion déjà présente dans la littérature qui considère que le système HLA expliquerait 50% de la susceptibilité génétique au diabète (Charkaluk et al., 2002; Patterson et al., 2012) et les sujets porteurs des deux haplotypes HLA DR3-DQ2 et DR4-DQ8 ont un risque approximatif de 1 sur 20 de développer un diabète type 1 avant l'âge de 15 ans (Group 2006).

L'étude entreprise au niveau de la population Tunisienne a confirmé le rôle majeur joué par l'haplotype DRB1*04 DQB1*0302 (DR4-DQ8) et DRB1*03 DQB1*0201 (DR3-DQ2) dans la susceptibilité au diabète (Kamoun et al., 2002).

Alors que pour la population marocaine se sont les haplotypes DRB1*03-DQB1*02 (DR3-DQ2), DRB1*04-DQB1*03 (DR4-DQ8) et DRB1*04-DQB1*02 (DR4-DQ2) qui induisent une susceptibilité au DT1 tandis que les haplotypes DRB1*13-DQB1*06 (DR13-DQ6) et DRB1*15-DQB1*06 (DR15-DQ6) exercent un effet protecteur (Benseffaj et al., 2012).

D'autre part nos résultats révèlent que 89% des sujets qui résident dans la région géographique (les monts de Tlemcen) sont porteurs d'au moins un allèle de prédisposition génétique HLA DR3. Il est connu que l'allèle DRB1*03 (HLA DR3) prédispose la majorité des populations subsahariennes alors que DRB1*04 (HLADR4) est quasi absent (Mbanya et al., 2001; Fagbemi et al., 2017; Sunni et al., 2017).

En plus, nous avons cherché à trouver des marqueurs alléliques (SNPs) associés aux allèles HLADR3/DR4 justifiant le DT1 dans la population de l'extrême ouest Algérien à savoir rs2187668 et rs3104413 qui pourrait servir de marqueurs de prédiction, de prédisposition pour l'allèle HLADR3 et DR4 respectivement des six principales catégories de type DR pertinent pour le risque de DT1 : HLADR3/4; DR3/3 ou DR4/4; le port d'un seul DR3 et un type non DR3, non DR4 (DR3/X) ; le port d'un seul type DR4 et un type non DR3, non DR4 (DR4/X) ; et absence de DR3 et DR4 (DRX/X). On a noté une fréquence élevée du génotype GA et GC pour les polymorphismes rs2187668 et rs3104413 respectivement. Ce travail préliminaire nous a permis d'apporter des données non encore enregistrées quant à l'association de marqueur allélique SNPs et les haplotypes de prédisposition au diabète de type 1.

Hormis la prédisposition génétique d'autres paramètres peuvent apporter des réponses quant à l'étiopathogénèse du DT1.

Nos résultats indiquent que l'hérédité liée au diabète de type 1 et de type 2 sont des facteurs d'exposition au diabète de type 1 aux quels s'ajoutent les antécédents d'infection par les virus de la varicelle et la rougeole.

Des investigations ultérieures ont montré que les antécédents familiaux de DT1 et de diabète de type 2 étaient plus fréquents chez les diabétiques que les témoins (Dahlquist et al., 1989; Teupe and Bergis, 1991; Barone et al., 2008).

Des études ont rapporté une fréquence plus élevée de HLA-DR4 ou HLA-DR3/DR4 chez les personnes atteintes de DT2 (Rich et al., 1993; Tuomilehto-Wolf et al., 1993; Horton et al., 1999) et connus pour être associés au risque de DT1. Il a été montré qu'une transmission excessive d'haplotypes liés à DR4 des parents atteints de diabète de type 2 à leur progéniture atteinte de diabète de type 1 (Rich et al., 1991).

Par ailleurs, une étude japonaise a associé le DT1 et le DT2 au polymorphisme du nombre variable de répétitions en tandem (VNTR) situé dans le promoteur du gène de l'insuline (Nomura et al., 1986).

En effet, nos résultats corroborent avec la théorie virale puisque le modèle prédictif rapporte une association significative entre l'infection virale par le virus de la varicelle et la rougeole avec le DT1. Nous avons cherché à comprendre le mécanisme sous-jacent puisque de nombreuses publications rapportent cette théorie.

Les premières études menées au Royaume-Uni ont suggéré que l'infection par le sérotype CBV4 du virus coxsackie B (CBV) peut être liée au DT1 (Gamble et al., 1969 ; Gamble et al., 1973)

D'autres virus ont également été étudiés pour des preuves de mimétisme dans le diabète de type 1 tel que virus coxsackie B(CBV4) (Atkinson et al., 1994), le virus de la rubéole (Ou et al., 2000), du cytomégalovirus humain (Hiemstra et al., 2001).

Afin de réaliser un screening des molécules pouvant jouer un rôle dans la physiopathologie du DT1 et exerçant un mimétisme moléculaire, on a entrepris une étude *in silico* pour déterminer les homologues de séquence entre les protéines virales (varicelles et rougeole) avec celle du soi et vérifier que ses peptides homologues ont la capacité de se lier aux molécules HLA de prédisposition (HLADR3vsDR4) et ne se lient pas aux molécules HLA protecteurs et par la suite établir leurs capacité à induire la sécrétion des cytokines IL4 et IFN- γ suite à la différenciation des LTh0 en LTh1 et LTh2 pouvant être à l'origine de la destruction des cellules β pancréatiques. Ainsi on a retrouvé un mimétisme moléculaire des épitopes des glycoprotéines E (gE) du virus de la varicelle et de l'hémagglutinine du virus de la rougeole avec l'hôte HSP60, en particulier chez les diabétiques ayant une prédisposition génétique HLA DR3/DR4 et ces épitopes ont la capacité d'induire la différenciation des lymphocytes Th0 en Th2 alors que l'hémagglutinine et Hsp60 activent le Th1.

Par contre, peu d'études ont évoqué l'implication du virus varicelle-zona et de la rougeole dans l'infection et la destruction des cellules β pancréatiques (Jenson et al., 1980; Honeyman et al., 1998).

Néanmoins, les épitopes de la protéine de choc thermique humaine 60 (hsp60) déterminés dans notre étude s'ajoutent aux données de la littérature qui stipulent que le DiaPep277 est un épitope majeur des cellules T de la protéine (hsp60) (Eldor et al., 2009) [29]. Des essais de vaccination auto-antigène par le DiaPep277 ont montré son implication dans le système immunitaire inné mais aussi dans la modulation du système immunitaire adaptatif puisque les patients traités avec DiaPep277 ont produit plus d'IL-10 et IL-13 et moins d'IFN-gamma en réponse au peptide p277 par rapport au groupe placebo (Raz et al., 2001) [28].

En 2019, une diminution statistiquement significative de l'incidence du DT1 chez les jeunes enfants qui avaient été vaccinés contre le rotavirus a été signalée à la fois en Australie (Perrett et al., 2019) et aux États-Unis (Rogers et al., 2019), ceci encourage les chercheurs à développer des vaccins appropriés en déterminant les sérotypes des virus associés au DT1 dans les différentes régions géographiques.

Vue l'implication des virus dans l'étiopathologie du DT1, la recherche d'un vaccin s'avère primordial pour le traitement primaire et prévention secondaire du diabète de type 1, en stoppant le déclenchement de l'auto-immunité et en bloquant l'apparition de l'immunité qui médie le dysfonctionnement et la mort des cellules β notamment contre les entérovirus (Insel et al., 2015) puisque les mécanismes de prévention secondaire avec un vaccin à entérovirus pourraient inclure : (1) la prévention des infections consécutives des îlots de Langerhans ; (2) la prévention d'une infection systémique qui réactive la mémoire immunitaire entraînant une réponse immunitaire ciblée contre les îlots ou augmente les cytokines circulantes et l'inflammation qui génère une rechute ou une augmentation de l'auto-immunité des îlots.

Etant donné que l'âge au diagnostic dans notre population (5 ± 4 ans) recule vers un âge plus jeune, ça rend les diabétiques de plus en plus exposés aux complications cardiovasculaires qui deviennent la complication macrovasculaire la plus fréquente pour les diabétiques de type 1 (Melendez-Ramirez et al., 2010), avec 10 fois plus de risque de développer des événements cardiovasculaires (p.infarctus, accident vasculaire cérébral, angine de poitrine et besoin de revascularisation d'une artère coronaire) comparant aux personnes non diabétiques (Orchard et al., 2006).

Sur la base des résultats de plusieurs études épidémiologiques, il existe de plus en plus de preuves de l'utilité du profil hématologique en tant que marqueur pronostique pour les pathologies chroniques, principalement pour le diabète de type 2 où l'étude de Kachekouche et al ont démontré que le taux de basophiles, CCMH, le taux de plaquettes et la vitesse de sédimentation à 1 heure constituent des marqueurs de haut risque de DT2 (Kachekouche et al., 2018) alors que pour l'hypertension c'est le rapport des globules rouges, volume corpusculaire moyen, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, rapport des plaquettes et vitesse de sédimentation qui s'avèrent des paramètres hématologiques prédicteurs de l'hypertension dans notre population d'étude.

L'étude du profil hématologique pour les DT1 de notre population a révélé que le nombre de globules blancs et d'éosinophiles était significativement plus élevé pour les diabétiques comparant aux témoins ceci a été retrouvé chez les patients atteints de diabète de type 2 où le nombre de globules blancs périphériques tels que les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles sont augmentés (Gkrania-Klotsas et al., 2010).

De plus, un taux élevé de globules blancs a été corrélé à des complications micro- et macrovasculaires chez les patients diabétiques (Tong et al., 2004).

Les leucocytes jouent un rôle clé dans l'initiation et la progression des maladies coronariennes par le biais de l'inflammation qui a lieu au niveau des lésions athérosclérotiques et qui survient principalement dans les artères de gros et moyen calibre (Libby et al., 2002).

Une étude prospective sur 8 ans a confirmé qu'un nombre élevé de globules blancs, de granulocytes et de neutrophiles était associé à un risque accru de maladie coronarienne (Karino et al., 2015).

De plus, le nombre de monocytes était significativement plus élevé chez les DT1 et conformément à différentes études de la littérature, les monocytes chez les diabétiques de type 1 présentent une activation pro-inflammatoire et sécrètent des niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires et en plus, Bulum et al ont montré une capacité accrue d'attachement des monocytes aux cellules endothéliales, l'un des stades précoces de l'athérosclérose (Bulum et al., 2014).

Notre étude a révélé une association entre le diabète de type 1 et le taux d'hématocrite bas, malheureusement ce dernier a été significativement corrélé avec les scores de risque cardiovasculaire de Pocock et de Framingham à 5 ans (Spencer et al., 2007).

En plus, d'autres composants de la formule sanguine, tels que l'élévation de la vitesse de sédimentation des érythrocytes, du volume plaquettaire moyen (VPM) et le nombre de plaquettes bas complètent la série des paramètres associés au diabète de type 1 dans notre population.

D'autant plus que différentes études les préconisent pour améliorer la capacité à prédire le risque de maladie coronarienne car l'étude de Froom et al ont montré qu'une élévation modérée mais persistante de la vitesse de sédimentation érythrocytaire a été associée à un risque accru d'incident d'infarctus du myocarde chez les sujets jeunes (Froom et al., 1984) et une autre étude a révélé que la vitesse de sédimentation érythrocytaire était liée à l'étendue de l'athérosclérose coronarienne (Natali et al., 2003).

Parmi les indices plaquettaires, le VPM a été considéré comme un marqueur de l'athérosclérose précoce chez les enfants atteints de DT1 (Ersoy et al., 2015).

Le volume plaquettaire moyen est augmenté au cours de l'infarctus aigu du myocarde et souvent associé à une diminution transitoire en numération plaquettaire au cours des premières semaines qui le suivent (Kiliçli-Çamur et al., 2005), ainsi l'élévation de l'activité plaquettaire et de l'altération de leur morphologie peut être considérée comme un facteur de risque de maladies microvasculaires et macrovasculaires (Zuberi et al., 2008; Kakouros et al., 2011) puisque les plaquettes plus grosses sont plus actives, contiennent plus de granules sécrétoires et produisent plus de thromboxane A2 qui favorise l'agrégation plaquettaire (Thompson et al., 1982).

Outre le profil hématologique, la dyslipidémie est concomitante chez les patients diabétiques et joue également un rôle important dans l'augmentation du risque vasculaire associé au diabète de type 2 (Gündogan et al., 2009; Mullugeta et al., 2012). C'est sur la base de ces faits qu'on a jugé opportun d'évaluer l'impact du profil lipidique des diabétiques de type 1 sur le développement des complications macrovasculaires, ainsi on a retrouvé une association significative entre ces complications et l'hypertriglycémie et l'hypercholestérolémie totale aux quelles s'associe une durée de diabète supérieur à 10 ans.

L'étude de Snell-Bergeon and Nadeau a démontré que la dyslipidémie dans le DT1 est associée au développement précoce d'anomalies cardiaques et vasculaires (Snell-Bergeon and Nadeau, 2012). Les données précédemment publiées d'une étude sur les DT1 ont montré des associations positives entre la durée du diabète et le taux de cholestérol total, de cholestérol LDL et de triglycérides (Dobrovolskienė et al., 2013).

D'autre part, des taux élevés de triglycérides s'accompagnaient d'un taux élevé d'altérations microangiopathiques (Chillarón et al., 2014).

Le lien entre la durée du DT1, les complications microvasculaires et d'autres facteurs de risque de maladies cardiovasculaires ont été retrouvé dans plusieurs études (Fröhlich-Reiterer and Borkenstein, 2010; Demirel et al., 2013).

Le surpoids et l'obésité sont considérés comme des facteurs de risque cardiovasculaire en soi (Csábi et al., 2000), les résultats de notre étude concordent avec les données de la littérature puisqu'un IMC supérieur à 25 est significativement associé au risque de

complications macrovasculaires.

À cet égard, l'augmentation de l'IMC dans le DT1 est associée au développement de complications chroniques et un plus grand risque cardiométabolique comparant aux patients maigres atteints de DT1 (Corbin et al., 2018).

En plus, l'étude observationnelle menée chez les adultes atteints de DT1 ont constaté que l'obésité est un marqueur de l'athérosclérose subclinique (Rodrigues et al., 2011).

2. Conclusion et perspectives

L'incidence du diabète de type 1 ne cesse d'augmenter de façon alarmante dans le monde et l'âge au diagnostic recule vers un âge de plus en jeune.

Les études multicentriques ont affirmé le caractère plurifactoriel du diabète de type 1 en démontrant la complexité des événements pathogéniques qui le déclenchent.

Nous avons pu apporter des données non encore enregistrées dans la population de l'extrême ouest Algérien qui sont d'un grand intérêt dans l'établissement de la méthodologie d'analyse et de suivi du DT1 dans une population à risque afin de préciser les facteurs déclenchant ainsi que les facteurs protecteurs et apporter un savoir faire innovant quant à la prédiction, la prédisposition et les prévention.

Cette étude a permis de mieux les cerner puisque notre étude génétique a révélé que l'hétérozygote HLADR3/DR4 est un facteur de risque au développement du DT1 fréquemment retrouvé dans les populations caucasiennes et on a retrouvé une association particulière entre la prédisposition génétique par l'allèle HLADR3 et le gradient géographique des monts de Tlemcen (altitude entre 800 et 1400m, latitude de 34.7425°).

Ces données peuvent faire l'objet d'une modélisation mathématique permettant la prédiction du développement spatio-temporel des pathologies à allure épidémique.

Explorer par des facteurs spécifiques aux comportements de la population en matière de choix de conjoint, la consanguinité, l'endogamie participent à véhiculer à travers les générations les allèles de prédisposition dans ses deux formes de diabète (type 1 et type 2). Les antécédents familiaux au diabète de type 1 et de type 2 sont des facteurs de prédisposition qui multiplient le risque de survenu du DT1 par 2 à 10 fois.

La piste virale trouve aussi sa place quant à la survenue du diabète de type 1, les antécédents personnels d'infection par les virus de la varicelle et la rougeole sont des événements qui préludent à l'inauguration du DT1. Nous avons essayé d'apporter des réponses du processus immunopathologique mis en cause dans la gènèse de la réponse autoimmune.

Nous avons choisi d'entreprendre une étude *in silico* qui nous a permis de retrouver les épitopes de la « gE » de la varicelle et ceux de « l'hémagglutinine » de la rougeole qui sont homologues à ceux de la protéine humaine « Hsp60 » ayant la capacité de se lier aux HLA DR3 et DR4 qui prédisposent au diabète et ont la capacité d'induire le système immunitaire

Il ressort de ce travail que le diabète type 1 s'inaugure à un âge de plus en plus précoce dans nos populations, ce qui augmente le risque de complications sur 10 ans.

Il s'agit des complications dégénératives à moyen ou long terme qui peuvent menacer le pronostic fonctionnel voire vital des patients, nécessitant une prise en charge et un suivi rigoureux tout au long de la vie.

D'où l'intérêt de proposer des paramètres de diagnostic de routine dans les examens afin de prévenir les complications vasculaires et de mettre en place une veille épidémiologique dans les populations d'extrême ouest algérien.

En explorant la formule sanguine dans cette étude, on constate un nombre élevé de globules blancs significativement associé à la survenue du DT1. Elevation reconnue comme étant prédictive du développement des maladies coronariennes.

De même la dyslipidémie joue un rôle non négligeable dans l'étiologie des complications macrovasculaires, on a noté dans notre population que l'hypertriglycémie et une durée de diabète supérieure à 10 ans sont des facteurs de risque des complications macrovasculaires, d'autre part, autres paramètres sont associés aux complications notamment l'hypercholestérolémie et un IMC supérieur à 25 kg/m².

Ainsi, les patients à risque sont facilement identifiables lors des analyses du bilan hématologique et lipidique et pourraient éventuellement bénéficier d'un traitement préventif.

Il ressort de cette étude que, le mimétisme moléculaire qu'on a retrouvé doit être étudié in vitro car l'identification des épitopes contribue à la compréhension de la pathogenèse de la maladie, le développement de tests de diagnostic pour prédire la maladie et le développement de peptides thérapeutiques spécifiques pour la prévention de la maladie.

Il serait donc intéressant que l'identification des séquences immunodominantes de gE du virus de la varicelle et de l'hémagglutinine de la rougeole contribuera au développement d'un ou plusieurs vaccins sous-unitaires.

Il est primordial d'explorer les gènes d'expression dans la survenue du diabète de type 2 qui peuvent éventuellement s'exprimer précédemment dans le DT1 par l'étude des familles dont les enfants diabétiques de type 1 ont une fréquence élevée d'antécédents familiaux de DT2.

En revanche, d'autres études devront être entreprises sur une population cas-témoins à large échelle afin de déterminer dans un premier temps les polymorphismes des SNPs marqueurs (rs2187668, rs3104413) des allèles HLA DR3/DR4 qui sans doute diminueront les coûts d'analyse génétiques dans le but de rendre ces analyses accessibles aux enfants à risque de développer le DT1.

Le caractère polygénique du DT1 a été identifié dans notre population chez 15.2% de diabétiques qui ont une prédisposition génétique par le polymorphisme du VNTR du promoteur de l'insuline associé à au moins un allèle HLADR3 et ou DR4, ceci nous motive à explorer d'autres polymorphismes tel que celui situé au niveau du gène de la protéine tyrosine phosphatase, non-récepteur de type 22 (PTPN22) et celui du CTLA-4 identifié dans d'autres études comme étant les mieux associés à la susceptibilité au DT1.

Plus que jamais, il est impératif d'étudier le mode de vie et les habitudes alimentaires des diabétiques de type 1 pour les préserver de la dyslipidémie et l'hyperglycémie qui sont les agents étiologiques aggravant les complications micro et macrovasculaires.

Références Bibliographiques

- Abulafia-Lapid, R., Gillis, D., Yosef, O., Atlan, H., & Cohen, I. R. (2003). T cells and autoantibodies to human HSP70 in type 1 diabetes in children. Journal of autoimmunity **20**(4), 313-321.
- Adorini, L. and G. Penna (2009). "Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists." Dendritic cells: 251-273.
- Alexander, T., A. Thiel, O. Rosen, G. Massenkeil, A. Sattler, S. Kohler, H. Mei, H. Radtke, E. Gromnica-Ihle and G.-R. Burmester (2009). "Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **113**(1): 214-223.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology **215** (3), 403-410.
- Aly, T. A., Ide, A., Jahromi, M. M., Barker, J. M., Fernando, M. S., Babu, S. R., & Eisenbarth, G. S. (2006). Extreme genetic risk for type 1A diabetes. Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(38), 14074-14079.
- American Diabetes Association 1997. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, **28**(1): S4-S34.
- Andersen, H. U., D. Mauricio, A. E. Karlsen, T. Mandrup-Poulsen, J. H. Nielsen and J. Nerup (1996). "Interleukin-1 β -induced nitric oxide production from isolated rat islets is modulated by d-glucose and 3-isobutyl-1-methyl xanthine." European journal of endocrinology **134**(2): 251-259.
- Andreatta, M., Karosiene, E., Rasmussen, M., Stryhn, A., Buus, S., & Nielsen, M. (2015). Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. Immunogenetics **67**(11), 641-650.
- Arvin, A. M., Koropchak, C. M., Williams, B. R., Grumet, F. C., & Fong, S. K. (1986). Early immune response in healthy and immunocompromised subjects with primary varicella-zoster virus infection. Journal of Infectious Diseases **154**(3), 422-429.
- Arvin, A. M., Sharp, M., Moir, M., Kinchington, P. R., Sadeghi-Zadeh, M., Ruyechan, W. T., & Hay, J. (2002). Memory cytotoxic T cell responses to viral tegument and regulatory proteins encoded by open reading frames 4, 10, 29, and 62 of varicella-zoster virus. Viral immunology **15**(3), 507-516.
- Atanasova, M., Dimitrov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2011). MHC class II binding prediction by molecular docking. Molecular informatics **30**(4), 368-375.
- Atkinson, M. A., D. L. Kaufman, D. Newman, A. J. Tobin and N. K. Maclaren (1993). "Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes." The Journal of clinical investigation **91**(1): 350-356.
- Atkinson, M. A., M. A. Bowman, L. Campbell, B. L. Darrow, D. L. Kaufman and N. K. Maclaren (1994). "Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes." The Journal of clinical investigation **94**(5): 2125-2129.

- Awadalla, N. J., Hegazy, A. A., El-Salam, A., & Elhady, M. (2017). Environmental factors associated with type 1 diabetes development: a case control study in Egypt. International journal of environmental research and public health **14**(6), 615.
- Baekkeskov, S., H.-J. Aanstoot, S. Christgai, A. Reetz, M. Solimena, M. Cascalho, F. Folli, H. Richter-Olesen and P.-D. Camilli (1990). "Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase." Nature **347**(6289): 151-156.
- Baranda, F. S., E. Coto, J. M. Déaz, E. Martinez-Naves, V. A. Martínez and C. López-Larrea (1994). "HLA CLASS II AND SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE TO INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS IN A POPULATION FROM THE NORTHWEST OF SPAIN." International Journal of Immunogenetics **21**(4): 219-229.
- Barker, J. M., T. M. Triolo, T. A. Aly, E. E. Baschal, S. R. Babu, A. Kretowski, M. J. Rewers and G. S. Eisenbarth (2008). "Two single nucleotide polymorphisms identify the highest-risk diabetes HLA genotype: potential for rapid screening." Diabetes **57**(11): 3152-3155.
- Barone, B., M. Rodacki, L. Zajdenverg, M. Almeida, C. Cabizuca, D. Barreto, L. de Araújo, R. Kupfer, A. Milech and J. Oliveira (2008). "Family history of type 2 diabetes is increased in patients with type 1 diabetes." Diabetes research and clinical practice **82**(1): e1-e4.
- Bener, A., A. Alsaied, M. Al-Ali, A. S. Hassan, B. Basha, A. Al-Kubaisi, A. Abraham, M. Mian, G. Guiter and I. Tewfik (2009). "Impact of lifestyle and dietary habits on hypovitaminosis D in type 1 diabetes mellitus and healthy children from Qatar, a sun-rich country." Annals of nutrition & metabolism **53**(3/4): 215-222.
- Benseffaj, N., C. Brick, O. Atouf, A. D. Bourhanbour, O. Sanae and M. Essakalli (2012). "Human leukocyte antigen (HLA) polymorphism and type 1 diabetes in the Moroccan population." African Journal of Biotechnology **11**(95): 16126-16131.
- Beyerlein, A., R. Chmiel, S. Hummel, C. Winkler, E. Bonifacio and A.-G. Ziegler (2014). "Timing of gluten introduction and islet autoimmunity in young children: updated results from the BABYDIET study." Diabetes care **37**(9): e194-e195.
- Bilbao, J. R., B. Calvo, A. Aransay, A. Martin-Pagola, G. P. de Nanclares, T. Aly, I. Rica, J. Vitoria, S. Gaztambide and J. Noble (2006). "Conserved extended haplotypes discriminate HLA-DR3-homozygous Basque patients with type 1 diabetes mellitus and celiac disease." Genes & Immunity **7**(7): 550-554.
- Blomqvist, M., S. Juhela, S. Erkkilä, S. Korhonen, T. Simell, A. Kupila, O. Vaarala, O. Simell, M. Knip and J. Ilonen (2002). "Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life." Clinical & Experimental Immunology **128**(3): 511-515.
- Boyle, P. J. (2007). "Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators." The American journal of medicine **120**(9): S12-S17.
- Bugawan, T., W. Klitz, M. Alejandrino, J. Ching, A. Panelo, C. Solfelix, A. Petrone, R. Buzzetti, P. Pozzilli and H. Erlich (2002). "The association of specific HLA class I and II alleles with type 1 diabetes among Filipinos." Tissue antigens **59**(6): 452-469.

- Bulum, T., B. Kolarić and L. Duvnjak (2014). "Decreased serum monocytes and elevated neutrophils as additional markers of insulin resistance in type 1 diabetes." International Journal of Diabetes in Developing Countries **34**(3): 150-155.
- Cardwell, C. R., Stene, L. C., Joner, G., Bulsara, M. K., Cinek, O., Rosenbauer, J., ... & Patterson, C. C. (2010). Maternal age at birth and childhood type 1 diabetes: a pooled analysis of 30 observational studies. Diabetes **59**(2), 486-494.
- Cavallo, M., M. Baroni, A. Toto, A. Gearing, T. Forsey, D. Andreani, R. Thorpe and P. Pozzilli (1992). "Viral infection induces cytokine release by beta islet cells." Immunology **75**(4): 664.
- Charkaluk, M.-L., P. Czernichow and C. Lévy-Marchal (2002). "Incidence data of childhood-onset type I diabetes in France during 1988–1997: the case for a shift toward younger age at onset." Pediatric research **52**(6): 859-862.
- Cheng, M.-L., C.-M. Chen, P.-W. Gu, H.-Y. Ho and D. T.-Y. Chiu (2008). "Elevated levels of myeloperoxidase, white blood cell count and 3-chlorotyrosine in Taiwanese patients with acute myocardial infarction." Clinical biochemistry **41**(7-8): 554-560.
- Chillarón, J. J., J. A. F. Le-Roux, D. Benaiges and J. Pedro-Botet (2014). "Type 1 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk." Metabolism **63**(2): 181-187.
- Chirkov, Y. Y., A. S. Holmes, S. R. Willoughby, S. Stewart, R. D. Wuttke, P. R. Sage and J. D. Horowitz (2001). "Stable angina and acute coronary syndromes are associated with nitric oxide resistance in platelets." Journal of the American College of Cardiology **37**(7): 1851-1857.
- Dahlquist, G. G. and B. A. Källen (1996). "Time-space clustering of date at birth in childhood-onset diabetes." Diabetes Care **19**(4): 328-332.
- Dahlquist, G., L. Blom, T. Tuvemo, L. Nyström, A. Sandström and S. Wall (1989). "The Swedish childhood diabetes study—results from a nine year case register and a one year case-referent study indicating that type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus is associated with both type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and autoimmune disorders." Diabetologia **32**(1): 2-6.
- Dali-Sahi, M. and D. Benmansour (2014). "Évaluation du risque de survenue du diabète de type 1 sans une population consanguine de l'Ouest Algérien." Lebanese Science Journal **15**(2): 25.
- Danze, P., S. Penet and I. Fajardy (1997). La génétique du diabète insulino-dépendant. Intérêt dans la pratique biologique. Annales de Biologie Clinique.
- Dastagir, S. R., J. Postigo-Fernandez, C. Xu, J. H. Stoeckle, R. Firdessa-Fite and R. J. Creusot (2017). "Efficient presentation of multiple endogenous epitopes to both CD4+ and CD8+ diabetogenic T cells for tolerance." Molecular Therapy-Methods & Clinical Development **4**: 27-38.
- Davì, G. and C. Patrono (2007). "Platelet activation and atherothrombosis." New England Journal of Medicine **357**(24): 2482-2494.

- Davies, J. L., Kawaguchi, Y., Bennett, S. T., Copeman, J. B., Cordell, H. J., Pritchard, L. E., ... & Todd, J. A. (1994). A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. Nature **371**(6493), 130-136.
- De Swart, R. L., Yüksel, S., Langerijs, C. N., Muller, C. P., & Osterhaus, A. D. (2009). Depletion of measles virus glycoprotein-specific antibodies from human sera reveals genotype-specific neutralizing antibodies. Journal of general virology **90**(12), 2982-2989.
- De Swart, R. L., Yüksel, S., & Osterhaus, A. D. (2005). Relative contributions of measles virus hemagglutinin-and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization. Journal of virology **79**(17), 11547-11551.
- DeLong, T., R. L. Baker, J. He, G. Barbour, B. Bradley and K. Haskins (2012). "Diabetogenic T-cell clones recognize an altered peptide of chromogranin A." Diabetes **61**(12): 3239-3246.
- Demirel, F., D. Tepe, Ö. Kara and İ. Esen (2013). "Microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes mellitus." Journal of clinical research in pediatric endocrinology **5**(3): 145.
- Dhanda, S. K., Gupta, S., Vir, P., & Raghava, G. P. S. (2013). Prediction of IL4 inducing peptides. Clinical and Developmental Immunology, **2013**.
- Dhanda, S. K., Vir, P., & Raghava, G. P. (2013). Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. Biology direct **8**(1), 1-15.
- Di Lorenzo, T. P., Peakman, M., & Roep, B. O. (2007). Translational mini-review series on type 1 diabetes: systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. Clinical & Experimental Immunology **148**(1), 1-16.
- Diaz, P. S., Smith, S., Hunter, E., & Arvin, A. M. (1989). T lymphocyte cytotoxicity with natural varicella-zoster virus infection and after immunization with live attenuated varicella vaccine. The Journal of Immunology **142**(2), 636-641.
- Dobrovolskienė, R., G. Mockevičienė, B. Urbonaitė, N. Jurgevičienė, R. T. Preikša and R. Ostrauskas (2013). "The risk of early cardiovascular disease in Lithuanian diabetic children and adolescents: a type 1 diabetes register database based study." Diabetes research and clinical practice **100**(1): 119-125.
- Dorman, J. (1997). "Molecular epidemiology of insulin-dependent diabetes mellitus: WHO DiaMond Project. WHO DiaMond Molecular Epidemiology Sub-Project Group." Gaceta medica de Mexico **133**: 151-154.
- Dubey, L., Steinberg, S. P., LaRussa, P., Oh, P., & Gershon, A. A. (1988). Western blot analysis of antibody to varicella-zoster virus. Journal of Infectious Diseases **157**(5), 882-888.
- Eldor, R., Kassem, S., & Raz, I. (2009). Immune modulation in type 1 diabetes mellitus using DiaPep277: a short review and update of recent clinical trial results. Diabetes/metabolism research and reviews **25**(4), 316-320.
- Elias, D. and I. R. Cohen (1994). "Peptide therapy for diabetes in NOD mice." Lancet (London, England) **343**(8899): 704-706.

- Erlich, H., A. M. Valdes, J. Noble, J. A. Carlson, M. Varney, P. Concannon, J. C. Mychaleckyj, J. A. Todd, P. Bonella and A. L. Fear (2008). "HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families." Diabetes **57**(4): 1084-1092.
- Ersoy, M., H. N. S. Duru, M. Eelevli, O. Ersoy and M. Civilibal (2015). "Aortic intima-media thickness and mean platelet volume in children with type 1 diabetes mellitus." Iranian journal of pediatrics **25**(2).
- Fagbemi, K. A., T. C. M. Medehouenou, S. Azonbakin, M. Adjagba, R. Ossen, J. Ahoueya, A. Agbanlinsou, R. Darboux, L. Baba-Moussa and A. Laleye (2017). "HLA class II Allele, Haplotype, and genotype associations with type 1 diabetes in Benin: a pilot study." Journal of diabetes research **2017**.
- Farid, N. R., Sampson, L., Noel, P., Barnard, J. M., Davis, A. J., & Hillman, D. A. (1979). HLA-D-related (DRw) Antigens in Juvenile Diabetes Mellitus. Diabetes **28**(6), 552-557.
- Fédération Internationale du Diabète, ATLAS du DIABÈTE de la FID. (2010).
- Fédération Internationale du Diabète, ATLAS du DIABÈTE de la FID. (2019).
- Fröhlich-Reiterer, E. E. and M. H. Borkenstein (2010). "Microvascular and macrovascular complications in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus." Wiener medizinische Wochenschrift (1946) **160**(15-16): 414-418.
- Froom, P., S. Margaliot, Y. Caine and J. Benbassat (1984). "Significance of erythrocyte sedimentation rate in young adults." American journal of clinical pathology **82**(2): 198-200.
- Froom, P., S. Margaliot, Y. Caine and J. Benbassat (1984). "Significance of erythrocyte sedimentation rate in young adults." American journal of clinical pathology **82**(2): 198-200.
- Gamble, D., K. Taylor and H. Cumming (1973). "Coxsackie viruses and diabetes mellitus." British Medical Journal **4**(5887): 260-262.
- Gamble, D., M. Kinsley, M. FitzGerald, R. Bolton and K. Taylor (1969). "Viral antibodies in diabetes mellitus." British Medical Journal **3**(5671): 627-630.
- Gelber, C., L. Paborsky, S. Singer, D. McAteer, R. Tisch, C. Jolicoeur, R. Buelow, H. McDevitt and C. G. Fathman (1994). "Isolation of nonobese diabetic mouse T-cells that recognize novel autoantigens involved in the early events of diabetes." Diabetes **43**(1): 33-39.
- Ghosh, M. K., V. Nguyen, H. K. Muller and A. M. Walker (2016). "Maternal milk T cells drive development of transgenerational Th1 immunity in offspring thymus." The Journal of Immunology **197**(6): 2290-2296.
- Gkrania-Klotsas, E., Z. Ye, A. J. Cooper, S. J. Sharp, R. Luben, M. L. Biggs, L.-K. Chen, K. Gokulakrishnan, M. Hanefeld and E. Ingelsson (2010). "Differential white blood cell count and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of cross-sectional and prospective studies." PloS one **5**(10): e13405.

- Group, D. P. (2006). "Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999." Diabetic Medicine **23**(8): 857-866.
- Group, E. A. S. and T. E. A. S. S. Group (1998). "Familial risk of type I diabetes in European children." Diabetologia **41**: 1151-1156.
- Gündogan, K., F. Bayram, M. Capak, F. Tanriverdi, A. Karaman, A. Ozturk, H. Altunbas, C. Gökce and A. Kalkan (2009). "Prevalence of metabolic syndrome in the Mediterranean region of Turkey: evaluation of hypertension, diabetes mellitus, obesity, and dyslipidemia." Metabolic syndrome and related disorders **7**(5): 427-434.
- Haller, M. J., D. A. Schatz, J. S. Skyler, J. P. Krischer, B. N. Bundy, J. L. Miller, M. A. Atkinson, D. J. Becker, D. Baidal and L. A. DiMeglio (2018). "Low-dose anti-thymocyte globulin (ATG) preserves β -cell function and improves HbA1c in new-onset type 1 diabetes." Diabetes Care **41**(9): 1917-1925.
- Harrison, L. C. and M. C. Honeyman (1999). "Cow's milk and type 1 diabetes: the real debate is about mucosal immune function." Diabetes **48**(8): 1501-1507.
- Haskins, K., M. Portas, B. Bradley, D. Wegmann and K. Lafferty (1988). "T-lymphocyte clone specific for pancreatic islet antigen." Diabetes **37**(10): 1444-1448.
- Heidland, A., K. Sebekova and R. Schinzel (2001). "Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease." American Journal of Kidney Diseases **38**(4): S100-S106.
- Helmke, K., A. Otten and W. Willems (1980). "Islet cell antibodies in children with mumps infection." Lancet (London, England) **2**(8187): 211-212.
- Herold, K. C., S. E. Gitelman, U. Masharani, W. Hagopian, B. Bisikirska, D. Donaldson, K. Rother, B. Diamond, D. M. Harlan and J. A. Bluestone (2005). "A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3 γ 1 (Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes." Diabetes **54**(6): 1763-1769.
- Hiemstra, H. S., N. C. Schloot, P. A. van Veelen, S. J. Willemen, K. L. Franken, J. J. van Rood, R. R. de Vries, A. Chaudhuri, P. O. Behan and J. W. Drijfhout (2001). "Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(7): 3988-3991.
- Hober, D., L. Andréoletti, C. Hober, S. Belaïch, M.-C. Vantghem, J. Lefebvre and P. Wattré (1998). "Entérovirus et diabète de type 1."
- Honeyman, M., Wasserfall, C., Nerup, J., & Rossini, A. (1997). Prediction and prevention of IDDM. Diabetologia **40**(3), B58-B61.
- Honeyman, M. C., B. S. Coulson, N. L. Stone, S. A. Gellert, P. N. Goldwater, C. E. Steele, J. J. Couper, B. D. Tait, P. G. Colman and L. C. Harrison (2000). "Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes." Diabetes **49**(8): 1319-1324.

- Honeyman, M. C., N. L. Stone and L. C. Harrison (1998). "T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents." Molecular medicine **4**(4): 231-239.
- Honeyman, M. C., N. L. Stone, B. A. Falk, G. Nepom and L. C. Harrison (2010). "Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens." The journal of immunology **184**(4): 2204-2210.
- Horton, V., I. Stratton, G. F. Bottazzo, M. Shattock, I. Mackay, P. Zimmet, S. Manley, R. Holman and R. Turner (1999). "Genetic heterogeneity of autoimmune diabetes: age of presentation in adults is influenced by HLA DRB1 and DQB1 genotypes (UKPDS 43)." Diabetologia **42**(5): 608-616.
- Houston M. Dyslipidemia. In: Integrative Medicine [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2019 Apr 4].p.264-75.e5.Available from:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032335868200027X>
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. Disease models & mechanisms **2**(5-6), 231-237.
- Huang, X. (1991). The lalign program implements the algorithm of Huang and Miller. Advances in Applied Mathematics **12**, 337-357.
- Insel, R. A., J. L. Dunne, M. A. Atkinson, J. L. Chiang, D. Dabelea, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, K. C. Herold, J. P. Krischer and Å. Lernmark (2015). "Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association." Diabetes care **38**(10): 1964-1974.
- Jain, L., Vidyasagar, D., Xanthou, M., Ghai, V., Shimada, S., & Blend, M. (1989). In vivo distribution of human milk leucocytes after ingestion by newborn baboons. Archives of disease in childhood **64**(7 Spec No), 930-933.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra D. The immune system in health and disease. In: Janeway CA, editor. Immunobiology. London: Current Biology Publications; 1999. p. 115e62.
- Jenson, A. B., H. Rosenberg and A. L. Notkins (1980). "Pancreatic islet-cell damage in children with fatal viral infections." The Lancet **316**(8190): 354-358.
- Jones, D., N. Hunter and G. Duff (1990). "Heat-shock protein 65 as a β cell antigen of insulin-dependent diabetes." The Lancet **336**(8715): 583-585.
- Juwono, J., & Martinus, R. D. (2016). Does Hsp60 provide a link between mitochondrial stress and inflammation in diabetes mellitus? Journal of Diabetes Research **2016**.
- Kakouros, N., J. J. Rade, A. Kourliouros and J. R. Resar (2011). "Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective." International journal of endocrinology **2011**.
- Kamoun, H. A., S. Hmida, H. Kaabi, A. Abid, H. S. Houissa, M. Maamar, N. Mojaat, L. B. Hamed, A. Dridi and M. K. Zribi (2002). HLA polymorphism in type 1 diabetes Tunisians. Annales de genetique, Elsevier.

- Karino, S., B. J. Willcox, K. Fong, S. Lo, R. Abbott and K. H. Masaki (2015). "Total and differential white blood cell counts predict eight-year incident coronary heart disease in elderly Japanese-American men: the Honolulu Heart Program." *Atherosclerosis* **238**(2): 153-158.
- Kaufman, D., M. Erlander, M. Clare-Salzler, M. Atkinson, N. Maclaren and A. J. Tobin (1992). "Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus." *The Journal of clinical investigation* **89**(1): 283-292.
- Kawasaki, E., L. Yu, R. Gianani, C. F. Verge, S. Babu, E. Bonifacio and G. S. Eisenbarth (1997). "Evaluation of islet cell antigen (ICA) 512/IA-2 autoantibody radioassays using overlapping ICA512/IA-2 constructs." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82**(2): 375-380.
- Kiliçli-Çamur, N., N. Kiliçli-Camur, C. Konuralp and A. Eskiser (2005). "Could mean platelet volume be a predictive marker for acute myocardial infarction?" *Medical science monitor* **11**(8): CR387-CR392.
- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters* **276**(1-2), 172-174.
- LaPorte, R. E., Matsushima, M., & Chang, Y. F. (1995). Prevalence and incidence of insulin-dependent diabetes. *Diabetes in America* **2**, 37-46.
- Libby, P., P. M. Ridker and A. Maseri (2002). "Inflammation and atherosclerosis." *Circulation* **105**(9): 1135-1143.
- Maclaren, N., M. Lan, R. Coutant, D. Schatz, J. Silverstein, A. Muir, M. Clare-Salzer, J.-X. She, J. Malone and S. Crockett (1999). "Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2 β predict immune-mediated (type 1) diabetes in relatives." *Journal of autoimmunity* **12**(4): 279-287.
- Madjid, M. and O. Fatemi (2013). "Components of the complete blood count as risk predictors for coronary heart disease: in-depth review and update." *Texas Heart Institute Journal* **40**(1): 17.
- MAESTRO, B., J. CAMPIÓN, N. DÁVILA and C. CALLE (2000). "Stimulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells." *Endocrine journal* **47**(4): 383-391.
- Mäkinen, M., J. Mykkänen, M. Koskinen, V. Simell, R. Veijola, H. Hyöty, J. Ilonen, M. Knip, O. Simell and J. Toppari (2016). "Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in children progressing to autoimmunity and clinical type 1 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **101**(2): 723-729.
- Mäkinen, M., V. Simell, J. Mykkänen, J. Ilonen, R. Veijola, H. Hyöty, M. Knip, O. Simell, J. Toppari and R. Hermann (2014). "An increase in serum 25-hydroxyvitamin D concentrations preceded a plateau in type 1 diabetes incidence in Finnish children." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **99**(11): E2353-E2356.
- Mallone, R., E. Martinuzzi, P. Blancou, G. Novelli, G. Afonso, M. Dolz, G. Bruno, L. Chaillous, L. Chatenoud and J.-M. Bach (2007). "CD8⁺ T-cell responses identify β -cell autoimmunity in human type 1 diabetes." *Diabetes* **56**(3): 613-621.

- Marshall, A. L., Chetwynd, A., Morris, J. A., Placzek, M., Smith, C., Olabi, A., & Thistlethwaite, D. (2004). Type 1 diabetes mellitus in childhood: a matched case control study in Lancashire and Cumbria, UK. Diabetic Medicine, 21(9), 1035-1040.
- Mastrandrea, L., J. Yu, T. Behrens, J. Buchlis, C. Albin, S. Fournier and T. Quattrin (2009). "Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study." Diabetes care 32(7): 1244-1249.
- Masuzawa, M. and S. Motojima (2004). "A case of hypersensitivity syndrome caused by reactivation of Cytomegalovirus complicated with non-autoimmune Type 1 diabetes and painless thyroiditis." Clin. Endocrinol 52: 124-128.
- Mbanya, J., E. Sobngwi and D. Mbanya (2001). "HLA-DRB1,-DQA1,-DQB1 and DPB1 susceptibility alleles in Cameroonian type 1 diabetes patients and controls." European Journal of Immunogenetics 28(4): 459-462.
- Melendez-Ramirez, L. Y., R. J. Richards and W. T. Cefalu (2010). "Complications of type 1 diabetes." Endocrinology and Metabolism Clinics 39(3): 625-640.
- Merad-Boudia, H. N., M. Dali-Sahi, Y. Kachekouche and N. Dennouni-Medjati (2019). "Hematologic disorders during essential hypertension." Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews 13(2): 1575-1579.
- MWer, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16(3), 1215.
- Minai-Fleminger, Y. and F. Levi-Schaffer (2009). "Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation." Inflammation research 58(10): 631-638.
- Mukherjee, R., Wagar, D., Stephens, T. A., Lee-Chan, E., & Singh, B. (2005). Identification of CD4+ T cell-specific epitopes of islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein: a novel β cell autoantigen in type 1 diabetes. The Journal of Immunology 174(9), 5306-5315.
- Mullugeta, Y., R. Chawla, T. Kebede and Y. Worku (2012). "Dyslipidemia associated with poor glycemic control in type 2 diabetes mellitus and the protective effect of metformin supplementation." Indian Journal of Clinical Biochemistry 27(4): 363-369.
- Muraro, P. A., H. Robins, S. Malhotra, M. Howell, D. Phippard, C. Desmarais, A. d. P. A. Sousa, L. M. Griffith, N. Lim and R. A. Nash (2014). "T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis." The Journal of clinical investigation 124(3): 1168-1172.
- Natali, A., A. L'Abbate and E. Ferrannini (2003). "Erythrocyte sedimentation rate, coronary atherosclerosis, and cardiac mortality." European heart journal 24(7): 639-648.
- Nepom, G. T. and W. W. Kwok (1998). "Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM." Diabetes 47(8): 1177-1184.

- Neto, A. A., A. de Pádua Mansur, S. D. Avakian, E. Gomes and J. Ramires (2006). "Monocytosis an independent risk marker for coronary artery disease." Arquivos brasileiros de cardiologia **86**(3): 240-244.
- Nguyen, C., M. D. Varney, L. C. Harrison and G. Morahan (2013). "Definition of high-risk type 1 diabetes HLA-DR and HLA-DQ types using only three single nucleotide polymorphisms." Diabetes **62**(6): 2135-2140.
- Nielsen, M., & Lund, O. (2009). NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. BMC bioinformatics **10**(1), 1-10.
- Nielsen, M., Lundegaard, C., & Lund, O. (2007). Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. BMC bioinformatics **8**(1), 1-12.
- Noble, J. A. and A. M. Valdes (2011). "Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes." Current diabetes reports **11**(6): 533.
- Noble, J. A., A. M. Valdes, M. Cook, W. Klitz, G. Thomson and H. A. Erlich (1996). "The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families." American journal of human genetics **59**(5): 1134.
- Nomura, M., N. Iwama, M. Mukai, Y. Saito, R. Kawamori, M. Shichiri and T. Kamada (1986). "High frequency of class 3 allele in the human insulin gene in Japanese type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with a family history of diabetes." Diabetologia **29**(6): 402-404.
- Norris, J. M., K. Barriga, G. Klingensmith, M. Hoffman, G. S. Eisenbarth, H. A. Erlich and M. Rewers (2003). "Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity." Jama **290**(13): 1713-1720.
- Nussbaum, G., A. Zanin-Zhorov, F. Quintana, O. Lider and I. R. Cohen (2006). "Peptide p277 of HSP60 signals T cells: inhibition of inflammatory chemotaxis." International immunology **18**(10): 1413-1419.
- Olivares, R., P. Ducimetiere and J. R. Claude (1993). "Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease?" American journal of epidemiology **137**(1): 49-53.
- OMS Organisation Mondiale de la Santé 2007.
- Orchard, T. J., Costacou, T., Kretowski, A., & Nesto, R. W. (2006). Type 1 diabetes and coronary artery disease. Diabetes care, **29**(11), 2528-2538.
- Ott, P. A., M. T. Dittrich, B. A. Herzog, R. Guerkov, P. A. Gottlieb, A. L. Putnam, I. Durinovic-Bello, B. O. Boehm, M. Tary-Lehmann and P. V. Lehmann (2004). "T cells recognize multiple GAD65 and proinsulin epitopes in human type 1 diabetes, suggesting determinant spreading." Journal of clinical immunology **24**(4): 327-339.
- Ou, D., L. Mitchell, D. Metzger, S. Gillam and A. Tingle (2000). "Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type I diabetes mellitus." Diabetologia **43**(6): 750-762.

- Pal, S., Semorine, K., Watts, G. F., & Mamo, J. (2003). Identification of lipoproteins of intestinal origin in human atherosclerotic plaque.
- Patterson, C. C., E. Gyürüs, J. Rosenbauer, O. Cinek, A. Neu, E. Schober, R. C. Parslow, G. Joner, J. Svensson and C. Castell (2012). "Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989–2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase." *Diabetologia* **55**(8): 2142-2147.
- Patterson-Bartlett, J., Levin, M. J., Lang, N., Schödel, F. P., Vessey, R., & Weinberg, A. (2007). Phenotypic and functional characterization of ex vivo T cell responses to the live attenuated herpes zoster vaccine. *Vaccine* **25**(41), 7087-7093.
- Perrett, K. P., K. Jachno, T. M. Nolan and L. C. Harrison (2019). "Association of rotavirus vaccination with the incidence of type 1 diabetes in children." *JAMA pediatrics* **173**(3): 280-282.
- Pescovitz, M. D., C. J. Greenbaum, H. Krause-Steinrauf, D. J. Becker, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, J. B. Marks, P. F. McGee and A. M. Moran (2009). "Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function." *New England Journal of Medicine* **361**(22): 2143-2152.
- Postigo-Fernandez, J. and R. J. Creusot (2019). "A multi-epitope DNA vaccine enables a broad engagement of diabetogenic T cells for tolerance in Type 1 diabetes." *Journal of autoimmunity* **98**: 13-23.
- Rachid, O., A. Osman, R. Abdi and Y. Haik (2020). "CTLA4-Ig (abatacept): a promising investigational drug for use in type 1 diabetes." *Expert opinion on investigational drugs* **29**(3): 221-236.
- Raz, I., D. Elias, A. Avron, M. Tamir, M. Metzger and I. R. Cohen (2001). "β-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial." *The Lancet* **358** (9295): 1749-1753.
- Rich, S., L. French, J. Sprafka, J. Clements and F. Goetz (1993). "HLA-associated susceptibility to type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the Wadena City Health Study." *Diabetologia* **36**(3): 234-238.
- Rich, S., S. Panter, F. Goetz, B. Hedlund and J. Barbosa (1991). "Shared genetic susceptibility of type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: contributions of HLA and haptoglobin." *Diabetologia* **34**(5): 350-355.
- Richardson, S. J., A. Willcox, A. Bone, A. K. Foulis and N. G. Morgan (2009). "The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes." *Diabetologia* **52**(6): 1143-1151.

- Rodrigues, T. C., A. M. Veyna, M. D. Haarhues, G. L. Kinney, M. Rewers and J. K. Snell-Bergeon (2011). "Obesity and coronary artery calcium in diabetes: the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) study." Diabetes technology & therapeutics **13**(10): 991-996.
- Rogers, M. A., T. Basu and C. Kim (2019). "Lower incidence rate of type 1 diabetes after receipt of the rotavirus vaccine in the United States, 2001–2017." Scientific reports **9**(1): 1-8.
- Rosenberg, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A., & Walker, B. D. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. Science **278**(5342), 1447-1450.
- Roep, B. O., N. Solvason, P. A. Gottlieb, J. R. Abreu, L. C. Harrison, G. S. Eisenbarth, L. Yu, M. Leviten, W. A. Hagopian and J. B. Buse (2013). "Plasmid-encoded proinsulin preserves C-peptide while specifically reducing proinsulin-specific CD8+ T cells in type 1 diabetes." Science translational medicine **5**(191): 191ra182-191ra182.
- Rosenson, R. S., Davidson, M. H., Hirsh, B. J., Kathiresan, S., & Gaudet, D. (2014). Genetics and causality of triglyceride-rich lipoproteins in atherosclerotic cardiovascular disease. Journal of the American College of Cardiology **64**(23), 2525-2540.
- Rubinstein, P., M. Walker, B. Fedun, M. Win, L. Cooper and F. Ginsberg-Fellner (1982). "The HLA system in congenital rubella patients with and without diabetes." Diabetes **31**(12): 1088-1091.
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. Annual Review of Immunology **24**, 419-466.
- Sabbah, E., K. Savola, P. Kulmala, R. Veijola, P. Vä hä salo, J. Karjalainen, H. K. Å kerblom, M. Knip and C. D. i. F. S. Group (1999). "Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **84**(5): 1534-1539.
- Sadaoka, K., Okamoto, S., Gomi, Y., Tanimoto, T., Toyokazu, I., Yoshikawa, T., & Mori, Y. (2008). Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon- γ enzyme-linked immunospot assay. Journal of Infectious Diseases **198**(9), 1327-1333.
- Sakatani, T., M. Hadase, T. Kawasaki, T. Kamitani, S. Kawasaki and H. Sugihara (2004). "Usefulness of the Percentage of Plasma Lymphocytes as a Prognostic Marker in Patients With Congestive Heart Failure Comparison With Brain Natriuretic Peptide." Japanese heart journal **45**(2): 275-284.
- Schmidt, D., J. Verdaguer, N. Averill and P. Santamaria (1997). "A mechanism for the major histocompatibility complex–linked resistance to autoimmunity." The Journal of experimental medicine **186**(7): 1059-1075.
- Sheehy, M., S. Scharf, J. Rowe, M. N. De Gimenez, L. Meske, H. Erlich and B. Nepom (1989). "A diabetes-susceptible HLA haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and-DQ alleles." The Journal of clinical investigation **83**(3): 830-835.

Shoenfeld, N., H. Amital and Y. Shoenfeld (2009). "The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease." Nature clinical practice Rheumatology **5**(2): 99-105.

Sidney, J., Assarsson, E., Moore, C., Ngo, S., Pinilla, C., Sette, A., & Peters, B. (2008). Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. Immunome research **4**(1), 1-14.

Singal, D. and M. Blajchman (1973). "Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus." Diabetes **22**(6): 429-432.

Snell-Bergeon, J. K. and K. Nadeau (2012). "Cardiovascular disease risk in young people with type 1 diabetes." Journal of cardiovascular translational research **5**(4): 446-462.

Snell-Bergeon, J. K., J. Smith, F. Dong, A. E. Barón, K. Barriga, J. M. Norris and M. Rewers (2012). "Early childhood infections and the risk of islet autoimmunity: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)." Diabetes care **35**(12): 2553-2558.

Solvason, N., Y.-P. Lou, W. Peters, E. Evans, J. Martinez, U. Ramirez, A. Ocampo, R. Yun, S. Ahmad and E. Liu (2008). "Improved efficacy of a tolerizing DNA vaccine for reversal of hyperglycemia through enhancement of gene expression and localization to intracellular sites." The Journal of Immunology **181**(12): 8298-8307.

Spencer, C., D. Felmeden, A. Blann and G. Lip (2007). "Haemorheological, platelet and endothelial indices in relation to global measures of cardiovascular risk in hypertensive patients: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial." Journal of internal medicine **261**(1): 82-90.

Stadinski, B. D., T. DeLong, N. Reisdorph, R. Reisdorph, R. L. Powell, M. Armstrong, J. D. Piganelli, G. Barbour, B. Bradley and F. Crawford (2010). "Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes." Nature immunology **11**(3): 225-231.

Stayoussef, M., J. Benmansour, A.-Q. Al-Irhayim, H. B. Said, C. B. Rayana, T. Mahjoub and W. Y. Almawi (2009). "Autoimmune type 1 diabetes genetic susceptibility encoded by human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes in Tunisia." Clinical and Vaccine Immunology **16**(8): 1146-1150.

Sturniolo, T., Bono, E., Ding, J., Raddrizzani, L., Tuereci, O., Sahin, U., & Hammer, J. (1999). Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. Nature biotechnology **17**(6), 555-561.

Sunni, M., J. A. Noble, L. Yu, Z. Mahamed, J. A. Lane, A. M. Dhunkal, M. D. Bellin, B. Nathan, J. Kylo and M. J. Abuzzahab (2017). "Predominance of DR3 in Somali children with type 1 diabetes in the twin cities, Minnesota." Pediatric diabetes **18**(2): 136-142.

Tait, B., B. Drummond, M. Varney and L. Harrison (1995). "HLA-DRB1* 0401 is associated with susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus independently of the DQB1 locus." International Journal of Immunogenetics **22**(4): 289-297.

Takeda, M., Tahara, M., Nagata, N., & Seki, F. (2012). Wild-type measles virus is intrinsically dual-tropic. Frontiers in microbiology **2**, 279 : 2528-2538.

Orchard, T. J.,

- Takiishi, T., H. Korf, T. L. Van Belle, S. Robert, F. A. Grieco, S. Caluwaerts, L. Galleri, I. Spagnuolo, L. Steidler and K. Van Huynegem (2012). "Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice." The Journal of clinical investigation **122**(5): 1717-1725.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., & Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. Nature **406**(6798), 893-897.
- Teupe, B. and K. Bergis (1991). "Epidemiological evidence for double diabetes." Lancet (British edition) **337**(8737): 361-362.
- Thévenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P., & Tuffery, P. (2012). PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. Nucleic acids research **40**(W1), W288-W293.
- Thompson, C. B., K. A. Eaton, S. M. Princiotta, C. A. Rushin and C. R. Valeri (1982). "Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function." British journal of haematology **50**(3): 509-519.
- Thorsby, E. and K. Rønningen (1993). "Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus." Diabetologia **36**(5): 371-377.
- Tian, J., D. Zekzer, Y. Lu, H. Dang and D. L. Kaufman (2006). "B cells are crucial for determinant spreading of T cell autoimmunity among β cell antigens in diabetes-prone nonobese diabetic mice." The Journal of Immunology **176**(4): 2654-2661.
- Todd, J. A., J. I. Bell and H. O. McDEVITT (1988). "HLA antigens and insulin-dependent diabetes." Nature **333**(6175): 710-710.
- Tong, P. C., K.-F. Lee, W.-Y. So, M. H. Ng, W.-B. Chan, M. K. Lo, N. N. Chan and J. C. Chan (2004). "White blood cell count is associated with macro- and microvascular complications in Chinese patients with type 2 diabetes." Diabetes care **27**(1): 216-222.
- Tsai, J. C. R., S. H. Sheu, H. C. Chiu, F. M. Chung, D. M. Chang, M. P. Chen, S. J. Shin and Y. J. Lee (2007). "Association of peripheral total and differential leukocyte counts with metabolic syndrome and risk of ischemic cardiovascular diseases in patients with type 2 diabetes mellitus." Diabetes/metabolism research and reviews **23**(2): 111-118.
- Tuboly, S., Bernath, S., Glavits, R., Kovacs, A., & Megyeri, Z. (1995). Intestinal absorption of colostral lymphocytes in newborn lambs and their role in the development of immune status. Acta Veterinaria Hungarica **43**(1), 105-115.

- Tuomilehto-Wolf, E., J. Tuomilehto, G. A. Hitman, A. Nissinen, J. Stengård, J. Pekkanen, P. Kivinen, E. Kaarsalo and M. J. Karvonen (1993). "Genetic susceptibility to non-insulin dependent diabetes mellitus and glucose intolerance are located in HLA region." British Medical Journal **307**(6897): 155-159.
- Umemoto, S., N. Suzuki, K. Fujii, A. Fujii, T. Fujii, T. Iwami, H. Ogawa and M. Matsuzaki (2000). "Eosinophil counts and plasma fibrinogen in patients with vasospastic angina pectoris." The American journal of cardiology **85**(6): 715-719.
- Undlien, D. E., T. Friede, H.-G. Rammensee, G. Joner, K. Dahl-Jørgensen, O. Sövik, H. E. Akselsen, I. Knutsen, K. S. Rønningen and E. Thorsby (1997). "HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection." Diabetes **46**(1): 143-149.
- Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Genève, World Health Organisation, 2011.
- Valdes, A., G. Thomson, J. Graham, M. Zarghami, B. McNeney, I. Kockum, A. Smith, M. Lathrop, A. Steenkiste and J. Dorman (2005). "D6S265* 15 marks a DRB1* 15, DQB1* 0602 haplotype associated with attenuated protection from type 1 diabetes mellitus." Diabetologia **48**(12): 2540-2543.
- Van der Auwera, B., C. Van Waeyenberge, F. Schuit, H. Heimberg, C. Vandewalle, F. Gorus, J. Flament and B. D. Registry (1995). "DRB1* 0403 protects against IDDM in Caucasians with the high-risk heterozygous DQA1* 0301-DQB1* 0302/DQA1* 0501-DQB1* 0201 genotype." Diabetes **44**(5): 527-530.
- van Halteren, A. G., O. M. Tysma, E. van Etten, C. Mathieu and B. O. Roep (2004). "1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis." Journal of autoimmunity **23**(3): 233-239.
- Vlassara, H., M. Brownlee, K. R. Manogue, C. A. Dinarello and A. Pasagian (1988). "Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling." Science **240**(4858): 1546-1548.
- Von Herrath, M., S. C. Bain, B. Bode, J. O. Clausen, K. Coppieters, L. Gaysina, J. Gumprecht, T. K. Hansen, C. Mathieu and C. Morales (2021). "Anti-interleukin-21 antibody and liraglutide for the preservation of β -cell function in adults with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial." The Lancet Diabetes & Endocrinology **9**(4): 212-224.
- Vreugdenhil, G., A. Geluk, T. Ottenhoff, W. Melchers, B. Roep and J. Galama (1998). "Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule." Diabetologia **41**(1): 40-46.
- Vuorinen, T., G. Nikolakaros, O. Simell, T. Hyypiä and R. Vainionpää (1992). "Mumps and Coxsackie B3 virus infection of human fetal pancreatic islet-like cell clusters." Pancreas **7**(4): 460-464.

- Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothé, B., Sette, A., & Peters, B. (2008). A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS computational biology* **4**(4), e1000048.
- Wang, P., Sidney, J., Kim, Y., Sette, A., Lund, O., Nielsen, M., & Peters, B. (2010). Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC bioinformatics* **11**(1), 1-12.
- Wanstrat, A. and E. Wakeland (2001). "The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes." *Nature immunology* **2**(9): 802-809.
- Warnick, G. R., Knopp, R. H., Fitzpatrick, V., & Branson, L. (1990). Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clinical chemistry*, **36**(1), 15-19.
- Weaver, D. J., B. Liu and R. Tisch (2001). "Plasmid DNAs encoding insulin and glutamic acid decarboxylase 65 have distinct effects on the progression of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." *The Journal of Immunology* **167**(1): 586-592.
- Weinberg, A., Zhang, J. H., Oxman, M. N., Johnson, G. R., Hayward, A. R., Caulfield, M. J., ... & US Department of Veterans Affairs (VA) Cooperative Studies Program Shingles Prevention Study Investigators. (2009). Varicella-zoster virus-specific immune responses to herpes zoster in elderly participants in a trial of a clinically effective zoster vaccine. *The Journal of infectious diseases* **200**(7), 1068-1077.
- Wenzlau, J. M., O. Moua, Y. Liu, G. S. Eisenbarth, J. C. Hutton and H. W. Davidson (2008). "Identification of a major humoral epitope in Slc30A8 (ZnT8)." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1150**(1): 252-255.
- Wheeler, J. G., M. E. Mussolino, R. F. Gillum and J. Danesh (2004). "Associations between differential leucocyte count and incident coronary heart disease: 1764 incident cases from seven prospective studies of 30 374 individuals." *European heart journal* **25**(15): 1287-1292.
- Williams, Ç. H., S. Oikarinen, S. Tauriainen, K. Salminen, H. Hyöty and G. Stanway (2006). "Molecular analysis of an echovirus 3 strain isolated from an individual concurrently with appearance of islet cell and IA-2 autoantibodies." *Journal of Clinical Microbiology* **44**(2): 441-448.
- Wolden-Kirk, H., Overbergh, L., Christesen, H. T., Brusgaard, K., & Mathieu, C. (2011). Vitamin D and diabetes: its importance for beta cell and immune function. *Molecular and cellular endocrinology* **347**(1-2), 106-120.
- Xu, J., & Zhang, Y. (2010). How significant is a protein structure similarity with TM-score=0.5?. *Bioinformatics* **26**(7), 889-895.
- Ye, L., L. Li, B. Wan, M. Yang, J. Hong, W. Gu, W. Wang and G. Ning (2017). "Immune response after autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1 diabetes mellitus." *Stem cell research & therapy* **8**(1): 1-10.

Zhang, Y., & Skolnick, J. (2005). TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. Nucleic acids research **33**(7), 2302-2309.

Zuberi, B., N. Akhtar and S. Afsar (2008). "Comparison of mean platelet volume in patients with diabetes mellitus, impaired fasting glucose and non-diabetic subjects." Singapore medical journal **49**(2): 114.

Annexe

Questionnaire

Nom et Prénoms : Date :

Localité :

Code la famille : Code du patient : Origine

ethnique : Age : sexe :

Groupe sanguin :

I- Les données socioéconomiques :

Type d'habitation : Niveau

d'instruction : Age et Profession : père :

mère :

Fratricie :

Nombre de frère**Nombre de sœurs****Range dans la fraterie****II- Famille**

Consanguinité : oui : non : Degré de consanguinité :

Phénotypes des parents (diabète, autres pathologies ou trait remarquables) : Père :

Mère :

Tabagisme : 1. Oui 2. Non Antécédents familiaux de diabète :

Traitement lors de la grossesse :

Diabète gestationnel de la mère :

III- Le cas index :**1) Le diabète :**

Poids (kg) : Taille (cm) :

Tour de taille (cm) : Périmètre crânien :

A la naissance : poids : Taille : Périmètre

crânien : Terme gestationnel : Age au diagnostic :

Pathologie associées :

Supplémentassions en vitamine D : de à :

Type de l'allaitement : Maternel : artificiel : mixte :

Antécédent personnel :

Fracture : oui : nonInfections virales:

2) Autres complications

Cardiologie : Néphrologie :

Neurologie : Thyroïde :

Œil : Audition : Peau :

IV)-Paramètres biologiques :

Glycémie :

IGF1 :

Hémoglobine glyquée :.....

Vitmine D :

Urée :

Peptide C :

Créatinine :

Triglycéride:

Cholestérol :

Anticorps Anti GAD:

anticorps Anti GAD

Anti insulín:

anti-IA2 :

Formulaire de consentement

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique Université de Tlemcen

Département de biologie

Madame Monsieur

Vous participez à un projet de recherche sur le diabète de type 1. Dans le cadre de ce projet, une collecte de données personnelles est proposée.

Données personnelles utilisées uniquement à des fins de recherche scientifique. Toutes les informations sont conservées dans la plus stricte confidentialité.

Les informations ne sont pas publiées, ainsi que le nom et le prénom.

Après avoir lu ces informations et avoir pu poser toutes les questions que j'ai jugées utiles au médecin qui me suit.

J'accepte la collecte de données conformément aux finalités

décrites ci-dessus. Patient(e) :

Prénom :

Nom :

Date :

Signature :

Une copie originale signée de ce formulaire de consentement doit être conservée par le patient.