

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

UNIVERSITÉ de TLEMCCEN

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

Département de biologie

Thèse

Présentée par

M^{me} BENSLAMA-SAMET Yasmine

En vue de l'obtention du

Diplôme de doctorat

Spécialité : Biologie moléculaire et génétique

Thème

Effets modulateurs du VNTR (-23HphI) du promoteur du gène de l'insuline et pratiques alimentaires dans le contexte du diabète de type 1 dans une population de l'extrême ouest Algérien.

Soutenu le **08 / 07 / 2023** , devant le jury composé de :

Présidente : Mme GUERMOUCHE Baya	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice : Mme BELKASSAM Nafissa	Docteur	Université de Sidi Bel Abbas.
Examinatrice : Mme MESLI TALEB BENDIAB Farida	Professeur	Université d'Oran1
Directrice de thèse : Mme DENNOUNI-MEDJATI Nouria	Professeur	Université de Tlemcen
Co-directrice : Mme DALI-SAHI Majda	Professeur	Université de Tlemcen

2022/2023



REMERCIEMENT

Je remercie avant tout, **ALLAH** le tout puissant, le clément et le miséricordieux qui a tracé mon chemin pour y parvenir et cueillir les fruits de mon dur et éprouvant labeur, et de m'avoir donné la force, le courage et la patience durant toutes ces années d'études pour l'achèvement de ma thèse.

Les travaux présentés dans cette thèse se sont déroulés en grande partie dans le laboratoire «Chimie Analytique et d'Électrochimie», de l'université de Tlemcen, Faculté SNV-STU ainsi qu'au niveau de l'unité «Inserm U1016 » Université de Paris, Faculté de Médecine.

Mes vifs remerciement vont à Mr **HAREK Yahia** professeur à l'université de Tlemcen, directeur du laboratoire de Chimie Analytique et d'Électrochimie, de l'université de Tlemcen, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et son aide pour la réalisation des travaux de recherche.

Je voudrais également adresser mes plus chaleureux remerciements à Mme **JULIER Cécile**, professeur à l'Université de Paris responsable de l'unité Inserm U1016 - Université de Paris Faculté de Médecine- qui nous a permis de réaliser la partie génétique de la taqman.

Je remercie très sincèrement **Mme GUERMOUCHE Baya**, Professeur à l'Université de Tlemcen et je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance de me faire l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici, l'assurance de ma profonde gratitude.

Je suis très honorée que **Mme MESLI TALEB BENDIAB Farida**, Professeur à l'Université d'Oran1 ait bien voulu examiner ce travail et faire partie du jury en qualité d'examinatrice.

Toute ma reconnaissance s'adresse à **Mme BELKASSAM Nafissa**, Docteur à l'Université de Sidi Bel Abbès pour avoir accepté de faire partie de mon jury et de prendre du temps pour évaluer mon travail malgré ses préoccupations.

Merci beaucoup à ma directrice de thèse **Mme DENNOUNI-MEDJATI Nouria**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour sa sympathie, sa disponibilité, ses orientations, ses encouragements, ses conseils et corrections pertinentes qui ont alimenté ma thèse. Je vous souhaite tout le succès que vous méritiez dans votre carrière et dans votre vie.

Un grand merci à ma co-directrice **Mme DALI-SAHI Majda**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour sa gentillesse, sa générosité, sa patience, ses interventions et sa disponibilité je vous souhaite vraiment le meilleur tant pour votre avenir professionnel que personnel.

« Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles ». Marie Curie

DÉDICACES

Je dédie cette humble thèse à la mémoire de ma très chère mère. Que Dieu le tout-puissant nous donne la force pour supporter son absence et surmonter ces moments difficiles, toi qui nous a tant aimés et tant donnés. Dans nos pensées tu resteras, dans nos cœurs tu vivras et dans notre vie nous nous souviendrons toujours de toi, de tes sacrifices, de ta bonté, de ta générosité, de ton sourire, de ta simplicité et surtout de ta sagesse.

Mon très cher père ; source de vie, d'amour et d'affection ; qui a consacré sa vie pour veiller à notre bien être vraiment les mots me manquent pour exprimer toute la reconnaissance, la fierté et le profond amour que je vous porte. Que dieu te protège et te garde pour nous.

*Mes chères sœurs «Sarah» et «Hanaa» et mon cher frère «Aymen Mohamed Salah»
qui ont de tout temps été aux petits soins avec moi pour m'offrir les
meilleures conditions possibles à terminer mes recherches.
Ma chère nièce «Razane» la petite fleur de la famille,*

*Mes chers tantes particulièrement « tata Fadila» et « sousou », oncles et cousins qui m'ont
toujours encouragée, soutenue et ont cru en moi.*

*Mon cher époux le conseiller dévoué, le compagnon fidèle et mon soutien moral « Mohamed » pour
sa tendresse, sa patience et ses sacrifices,
Ma belle-famille de m'avoir accueillie dans sa maison à bras grands ouverts. Je n'ai pas juste
gagné un partenaire de vie, mais aussi une deuxième famille sur qui je peux compter.*

*Ma meilleure amie de tous les jours et ma chère sœur «MEZJANE Fatima Zahra» pour tous
les hauts et les bas qu'on a passé ensemble, que notre amitié sera
plus solide et plus forte jour après jour.*

*À mes chers collègues et à tous les membres de l'équipe de biologie moléculaire et génétique
particulièrement : «Ammaria», «Nawel», «Moussa» et «Youcef» pour les moments
inoubliables et la bonne ambiance de travail.*

Résumé

Le gène de l'insuline constitue le deuxième gène de susceptibilité au diabète de type 1 après les gènes codant pour des antigènes de leucocytes humains HLA DR. Il comprend un nombre variable de répétition en tandem en amont du site de transcription. Ce nombre de répétition définit la susceptibilité au diabète de type 1.

L'analyse de la répartition des allèles des répétition en tandem à nombre variable du gène de l'insuline, dans les populations de l'extrême ouest Algérien pour les sujets diabétiques de type 1 et les sujets sains, est effectuée afin d'évaluer les éventuelles associations génotypiques.

Il s'agit d'une étude transversale de type cas-témoins portée sur un échantillon total de 766 individus dont 349 diabétiques et 417 témoins.

La fréquence génotypique du polymorphisme de la région promotrice du gène de l'insuline indique que les génotypes sont répartis de façon similaire entre la population diabétique et non diabétique avec AA= (9% vs 4%), AT= (26% vs 32%) et TT= (65% vs 64%).

Les résultats de la régression logistique binaire ont révélé que le génotype AT exerce un effet protecteur contre l'apparition du diabète de type 1 dans notre population (OR=0,33 ; IC=0,12-0,90 ; P=0,030). Tandis que les individus porteurs du génotype HLA DR3-DR4 ont 2 fois plus de risque d'avoir un diabète de type 1 dans notre population (OR=2,22 ; IC=1,03-4,80 ; P=0,042).

L'étude analytique révèle que l'hérédité du diabète de type 1 et de type 2, l'introduction précoce du lait de vache avant 6 mois et un allaitement maternel de moins de 9 mois constituaient un facteur de risque pour le diabète de type 1 au niveau de la population générale. En outre, l'allaitement artificiel déclenche la réponse auto-immune chez les diabétiques génétiquement prédisposés (HLADR3/DR4) présentant une fréquence de 13,58% dans notre population.

En effet, nous avons pu mettre en évidence l'homologie séquentielle et structurale entre les protéines du lait de vache (Bovine Serum Albumine et Béta Lacto Globuline) et les épitopes du soi (Tyrosine phosphatase et l'isoforme 65 kDa de l'acide glutamique décarboxylase) chez les individus prédisposés génétiquement HLA DR3-DR4.

Nous avons aussi souligné l'implication des micronutriments essentiels à l'équilibre glycémique à savoir l'apport alimentaire journalier en magnésium qui joue un rôle dans l'homéostasie glucidique ainsi que la sécrétion de l'insuline.

Mots clés : diabète de type 1, facteurs de risque, INS-VNTR, étude in silico, protéines du lait de vache, apport alimentaire, magnésium, équilibre glycémique.

Abstract

The insulin gene is the second most important susceptibility gene for type 1 diabetes after the genes encoding human leukocyte antigens HLA DR. It has a variable number of tandem repeats upstream of the transcription site. This number of repeats defines susceptibility to type 1 diabetes.

The analysis of the distribution of the alleles of the variable number of repeats in tandem of the gene of insulin; in the populations of the extreme west of Algeria for the diabetic subjects of type I and the healthy subjects; is carried out in order to evaluate the possible genotypic associations.

This is a cross-sectional case-control study on a total sample of 766 individuals, 349 of whom were diabetics and 417 controls.

The genotypic frequency of the insulin gene promoter region polymorphism indicates that they are similarly distributed between the diabetic and non-diabetic population with AA= (9% vs 4%), AT= (26% vs 32%) and TT= (65% vs 64%).

Furthermore, the results of binary logistic regression revealed that the AT genotype exerts a protective effect against the development of type 1 diabetes in our population with (OR=0.33; CI=0.12-0.90; P=0.030). While individuals carrying the HLA DR3-DR4 genotype have 2 times the risk of developing type 1 diabetes in our population with (OR=2.22; CI=1.03-4.80; P=0.042).

The analytical study reveals that heredity of type 1 and type 2 diabetes, early introduction of cow's milk before 6 months of age, and breastfeeding less than 9 months of age were risk factors for type 1 diabetes in the general population. Furthermore, formula feeding triggers the autoimmune response in genetically predisposed diabetics (HLADR3/DR4) with a frequency of 13.58% in our population.

Indeed, we were able to highlight the sequence and structural homology between cow's milk proteins (Bovine Serum Albumin and Beta Lacto Globulin) and self-epitopes (Tyrosine phosphatase and the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase) in genetically predisposed individuals HLA DR3-DR4.

We also highlighted the involvement of micronutrients essential to glycemic control, namely daily dietary Mg intake which plays an important role in carbohydrate homeostasis and insulin secretion.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, risk factors, INS-VNTR, in silico study, cow's milk proteins, dietary intake, magnesium, glycemic control.

المخلص

جين الأنسولين هو الجين الثاني للإصابة بمرض السكري من النوع الأول بعد الجينات التي تشفر مستضدات الكريات البيض البشرية HLA DR. يتضمن عددًا متغيرًا من التكرارات الترادفية في بداية موقع النسخ. يحدد هذا العدد من التكرار قابلية الإصابة بمرض السكري من النوع الأول

تحليل توزيع الأليلات لعدد متغير من التكرارات الترادفية لجين الأنسولين ؛ في سكان أقصى غرب الجزائر لمرضى السكري من النوع الأول والمواضيع الصحية ؛ يتم إجراؤه لتقييم الارتباطات الوراثية المحتملة.

هذه دراسة مستعرضة للحالات والشواهد تضمنت عينة إجمالية من 766 فردًا ، بما في ذلك 349 مصابًا بالسكري و 417 شاهدًا.

يشير التكرار الوراثي لتعدد أشكال منطقة محفز الأنسولين إلى أنها موزعة بالمثل بين السكان المصابين بالسكري وغير المصابين بمرض السكري مع (9% مقابل 4% = AA ، (26% مقابل 32% = AT و (65% مقابل 64% = TT .

بالإضافة إلى ذلك، كشفت نتائج الانحدار اللوجستي الثنائي أن النمط الوراثي AT له تأثير وقائي ضد ظهور مرض السكري من النوع 1 في مجتمعنا مع (OR = 0.33 ؛ IC = 0.12-0.90 ؛ P = 0.030). في حين أن الأفراد الذين يحملون التركيب الوراثي HLA DR3-DR4 هم أكثر عرضة بمرتين للإصابة بمرض السكري من النوع الأول في مجتمعنا مع (OR = 2.22 ؛ CI = 1.03-4.80 ؛ P = 0.042).

كشفت الدراسة التحليلية أن وراثه داء السكري من النوع الأول والنوع الثاني ، والإدخال المبكر لحليب البقر قبل 6 أشهر ، والإرضاع من الثدي لمدة أقل من 9 أشهر كانت عوامل خطر للإصابة بمرض السكري من النوع الأول على مستوى عامة السكان. بالإضافة إلى ذلك ، تؤدي التغذية الاصطناعية إلى استجابة المناعة الذاتية لدى مرضى السكري المهيئين وراثيًا (HLADR3 / DR4) بمعدل 13.58% في مجتمعنا.

في الواقع، تمكنا من تسليط الضوء على التناسق المتسلسل والهيكلية بين بروتينات حليب البقر (Bovine Serum Albumin) و (Beta Lacto Globulin) و المستضدات الذاتية (Tyrosine phosphatase) و (isoform 65 kDa of glutamic acid decarboxylase) في الأفراد المهيئين وراثيًا لـ HLA DR3-DR4 .

لقد أكدنا أيضًا على مشاركة المغذيات الدقيقة الأساسية في توازن نسبة السكر في الدم، والمتمثلة في المدخول الغذائي اليومي من المغنيزيوم الذي يلعب دورًا في توازن الجلوكوز وإفراز الأنسولين. .

الكلمات المفتاحية: داء السكري من النوع الأول، عوامل الخطر، INS-VNTR، في دراسة السيليكو، بروتينات حليب البقر، المدخول الغذائي، المغنيسيوم ، التحكم في نسبة السكر في الدم.

Productions scientifiques

1. Publications

1.1. Articles

Y. Benslama, N. Dennouni-Medjati, M. Dali-Sahi, S. Kahloula, A. Behar, Y. Kachekouche, FZ. Meziane, Y. Harek. (2020) Dietary intake of magnesium in a type 1 diabetic pediatric population. *Magnesium Research*; 33 (2): 37-44.

Y. Benslama, N. Dennouni-Medjati, M. Dali-Sahi, S. Kahloula, FZ. Meziane, Y. Harek (2021) Childhood type 1 diabetes mellitus and risk factor of interactions between dietary cow's milk intake and HLA-DR3/DR4 genotype. *J Biomol Struct Dyn*. 1-9.

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.

Behar, N. Dennouni-Medjati, M. Dali-Sahi, Y. Harek, M. Belhadj, **Y. Benslama**, Y. Kachecouche (2020) Dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes in a female population of western Algeria. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 34(3), 254-258.

1.2. Communications (proceeding)

A. Behar, N. Dennouni-Medjati, M. Dali-Sahi, Y. **Benslama**, M. Belhadj, Y. Kachecouche, Y. Harek, (2019) Apport alimentaire du sélénium chez des diabétiques de type 1 de la ville de Tlemcen (extrême ouest Algérien) March 2019, *Nutrition Clinique et Métabolisme* 33(1):55.

2. Communications internationales

Y. Benslama, A. Behar, N. Dennouni-Medjati, M. Dali Sahi; Y. Harek. Apport nutritionnel en Magnésium des diabétiques de type 1 dans la population de Tlemcen (extrême ouest Algérien). *Journées francophone de nutrition*, 28-30 novembre 2018, Nice (France).

Y. Benslama, N. Medjati-Dennouni, M. Dali-Sahi, Y. Harek, FZ. Meziane, A. Behar (2020) Dietary intake of folic acid and calcium and glycemic control in a pediatric

population with type 1 diabetes. *3^{ème} congrès international « Biotech 2020 »*, 27 au 29 février, Fès (Maroc).

A. Behar, N. Dennouni-Medjati, M Dali Sahi, **Y. Benslama**, M. Belhadj, Y. Kachecouche, Y. Harek (2018) Apport alimentaire du sélénium chez des diabétique de type 1 de la ville de Tlemcen. *Journées francophone de nutrition* 28-30 novembre 2018. Nice (France).

FZ. Meziane, A. Behar, M. Dali Sahi, N. Dennouni-Medjati, **Y. Benslama** (2018) Analyse du statut en vitamine E chez des diabétiques de type 1. *Journées francophone de nutrition Nices Acropolis*, Nice 28-30 novembre 2018.

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. *3^{ème} congrès international BIOTECH 2020*, 27 au 29 février, Fès (Maroc).

A.Behar, N.Dennouni –Medjati, **Y.Benslama**, M.Dali-Sahi, M.Belhadj, FZ. Meziane, Y.Harek (2020) La carence en zinc de la femme enceinte et risque de prématurité. *3^{ème} congrès international BIOTECH 2020*, 27 au 29 février, Fès (Maroc).

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 septembre 2020, Bruxelles (Belgique).

3. Communications nationales

Y. Benslama, N. Medjati-Dennouni, FZ. Meziane, Majda Dali Youcef-Sahi, Yahia HAREK (2018) Effets modulateurs des VNTR du gène de l'insuline dans le contexte du diabète de type 1. *Doctoriales 8-Décembre 2018-Tlemcen* (Algérie).

Y. Benslama, N. Dennouni Medjati, M. Dali Sahi, Y. Harek, FZ. Meziane, A. Behar, (2019) Apports alimentaires en potassium et phosphore et équilibre glycémique chez des diabétiques de type 1. *7^{ème}s journées sur le diabète et les maladies vasculaires*. SNV Tlemcen. 29 et 30 Novembre 2019.

Y. Benslama, N. Medjati-Dennouni, M. Dali-Sahi, Y. Harek, A. Behar, FZ. Meziane, M. Belhadj, Y. Kachecouche (2019). Statut du Magnésium et Manganèse chez des enfants et adolescents diabétiques de type 1 de l'extrême ouest Algérien. *3^{ème} Séminaire National Biologie et Santé*. 07 décembre 2019.

FZ. Meziane, M. Dali Youcef-Sahi, N. Medjati-Dennouni, **Y. BENSLAMA**, Y. HAREK (2018) Intérêt méthodologique 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 8-Décembre 2018-Tlemcen (Algérie)*.

A.Behar, **Y.Benslama**, N.Dennouni-Medjati; M.Belhadj; M.Dali-Sahi; Y.Harek (2018) Le rôle du zinc dans le mécanisme d'immuno-inflammation chez les diabétiques de type 1 de la population de Tlemcen. *Doctoriales 8-Décembre 2018-Tlemcen (Algérie)*.

A. Behar, **Y.Benslama**, N.Dennouni-Medjati, M. Belhadj, M.Dali-Sahi, Y.Harek (2019) Apport alimentaire du Zinc chez des diabétiques de type 1 de la wilaya de Tlemcen. Treizième rencontre pédiatrique de Tlemcen. 01 et 02 Mai 2019, Tlemcen (Algérie).

Table des matières

Remerciements.....	II
Dédicaces.....	III
Résumé	IV
Abstract	V
المخلص	VI
Production scientifique	VII
Liste des tableaux	XII
Liste des figures.....	XIII
Liste des abréviations.	XIV
Introduction générale	16
Objectifs et justification de travail.....	24
Références bibliographiques	26
Partie 1 : Magnésium et diabète de type 1	36
1. Introduction	37
2. Matériel et méthodes.....	38
2.1 Échantillonnage.....	38
2.2 Enquête alimentaire et rappel des 24 heures.....	38
2.3 Estimation de l'apport alimentaire journalier en magnésium	38
2.4 Analyse statistique.....	39
3. Résultats	40
3.1. Caractéristiques de la population d'étude	40
3.2. Analyse d'association entre l'AAJ en Mg et les différents paramètres chez les diabétiques de type 1	41
3.3. Répartition de la population des diabétiques et des non-diabétiques en fonction de l'AAJ en Mg.....	42
3.4. Résultats de la régression logistique multinomiale en fonction de l'AAJ en Mg.....	43
4. Discussion	45
5. Conclusion	48
Références bibliographiques de la partie 1	49

L'article.....	52
Partie 2 : Mimétisme moléculaire et implication des protéines du lait de vache dans la pathogénèse du DT1	59
1.Introduction	60
2.Matériel et méthodes.....	60
2.1. Outils bio-informatiques et méthodes de calcul	60
1. NCBI et Blast.....	60
2. LALIGN.....	61
3. Outil d'analyse IEDB.....	61
4. Profil de sécrétion des cytokines (IL4 Pred Vs IFN épitope)	61
5. Prédiction de la structure 3D des peptides homologues.....	62
6. Le serveur RAMPAGE.....	62
7. Établissement du mimétisme structurel.....	62
3.Résultats	63
3.1. Étude analytique.....	63
3.2. Résultats de l'étude in silico.....	64
4. Discussion	74
5. Conclusion	76
Références bibliographiques de la partie 2.....	77
L'Article	79
Partie 3 : Polymorphisme du VNTR du promoteur de gène de l'insuline	89
1. Introduction.....	90
2. Matériel et méthodes	90
2.1. Les sources de données et recueil d'informations	90
2.2. Échantillonnage et période d'étude	91
2.3. Critères d'évaluation des patients	91
2.4. Critères d'évaluation des témoins	91
2.5. Prélèvement sanguin	92
2.6. Analyses statistiques	92
2.7. Extraction de l'ADN à partir du sang total par la technique NaCl « Salting out ».....	92
2.7.1 Dosage et contrôle qualité de l'ADN	93
2.8. Étude du polymorphisme (rs689) du VNTR du promoteur du gène de l'insuline (INS - 23/Hph1 A>T).....	93
2.8.1. Principe de la méthode	94
3. Résultats.....	95

3. Résultats de l'étude génétique du polymorphisme rs689 (INS -23/Hph1 A>T)	95
3.1. Association du polymorphisme INS-VNTR (-23/Hph I A/T) (rs689) aux différents facteurs environnementaux	97
3.2 Association entre le polymorphisme INS-VNTR et le polymorphisme HLA DR	100
3.3 Résultats de l'étude du modèle de la régression logistique binaire	102
4. Discussion	103
5. Conclusion	105
Références bibliographiques de la partie 3.....	106
Discussion générale	109
Références bibliographiques de la discussion générale	117
Conclusion et perspectives	122
Annexes.....	125
Questionnaire	126
Journal alimentaire des 24h.....	128
Tableau des quantités de référence pour les aliments.....	129
Préparation des solutions pour l'extraction de l'ADN à partir du sang total.....	130

Liste des tableaux

Partie 1

Tableau 1. Caractéristiques générales et apports alimentaires journaliers en magnésium de la population étudiée.

Tableau 2. Corrélation de Pearson entre l'apport alimentaire journalier en magnésium et différents paramètres dans la population diabétiques de type 1.

Tableau 3. Caractéristiques de la population étudiée selon les groupes d'apport en magnésium.

Tableau 4. Odds ratios (intervalles de confiance à 95 %) des différents modèles de régression logistique multinomiale.

Partie 2

Tableau 1. Tableau de contingence pour la description de la population étudiée.

Tableau 2. Variables associées au risque du diabète de type 1 par l'analyse de la régression logistique binaire.

Tableau 3. Identification de l'homologie de séquence entre les auto-antigènes et les protéines de lait de vache par le programme Blast.

Tableau 4. Vérification de l'homologie de séquence entre la protéine de lait de vache et l'auto-antigène par Lalign

Tableau 5. Identification des liants HLA DR3 / DR4 par l'IEDB

Tableau 6. Prédiction de la capacité d'induction d'IL4 et d'IFN- γ pour chaque peptide.

Tableau 7. Comparaison de la similarité structurelle prédite entre les peptides sélectionnés parmi les protéines de lait de vache et les auto-antigènes.

Partie 3

Tableau 1. Distribution des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme INS-VNTR (-23 Hph I A/T) (rs689).

Tableau 2. Résultats du test khi 2 en fonction de la présence du polymorphisme génotypique homozygote AA.

Tableau 3. Résultats du test khi 2 en fonction de la présence du polymorphisme génotypique hétérozygote AT.

Tableau 4. Résultats du test khi 2 en fonction de la présence du polymorphisme génotypique homozygote TT.

Tableau 5. Distribution des génotypes du polymorphisme INS-VNTR selon le polymorphisme HLA DR au niveau de la population totale.

Tableau 6. Distribution des géotypes du VNTR selon le polymorphisme HLA DR au niveau des cas.

Tableau 7. Distribution des géotypes du VNTR selon le polymorphisme HLA DR au niveau des témoins.

Tableau 8. Résultats de l'étude du modèle de régression logistique binaire (diabétique ou non) en fonction des polymorphismes INS-VNTR et HLA DR.

Tableau 9. Mesures d'associations entre la variable de réponse et les prévisions de probabilité.

Liste des figures

Partiel 1 :

Figure 1. Pourcentage de contribution à l'apport alimentaire journalier en magnésium dans les populations diabétiques et non diabétiques.

Partie 2 :

Figure 1. Superposition des épitopes peptides deux à deux par TM-align

Partie 3 :

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

Figure 2. Résultats du génotypage par sondes Taqman du SNP d'intérêt rs689.

Liste des abréviations

Abréviation

A : Adénine

AAJ en Mg : Apport Adéquat Journalier en Magnésium

ADA : American Diabetes Association

AIRE : Régulateur auto-immun

ARN : Acide Ribo Nucléique

ASO-PCR : Oligonucléotides spécifiques aux allèles

ATP : Adénosine-Triphosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

CAT : Catalase

Cellules β : Cellules béta pancréatiques

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CVB4 : Coxsackie Virus B 4

CTLA4 : Antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique

D Mg : Déficience en Mg

DT1 : Diabète de type 1

FID : Fédération Internationale de Diabète

GADA : Anticorps de l'acide glutamique décarboxylase

GLT : Glutathion

GWAS: Études d'association génétique pangénomiques

HbA1c : Hémoglobine Glyquée

IA-2A : Protéine de type tyrosine phosphatase

IAA : Auto-anticorps anti-insuline

IGF2: Insulin-Like Growth Factor2

IL2RA : Récepteur de l'Interleukine 2

LADA : Diabète auto-immun latent chez l'adulte

MagT1 : Canal du transporteur Mg²⁺

Mg: Magnésium

NIH: National Institute of Health

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PTPN22 : Protein Tyrosin Phosphatase N22

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

SLB : Solution de lyse de globules blancs

SNP : Polymorphisme de nucléotides simples

SOD : Superoxyde dismutase

T : Thymine

TH : Tyrosine hydroxylase

TRIGR: The Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk

ZnT8A : Anticorps du transporteur 8 du zinc

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Le diabète de type 1 (DT1) se développe assez tôt dans la vie et est souvent diagnostiqué durant l'enfance. Il s'agit d'une pathologie auto-immune qui entraîne la destruction de la cellule bêta pancréatique (β pancréatiques) productrice d'insuline. L'insuline est une hormone anabolique essentielle qui exerce de multiples effets sur le métabolisme du glucose, des lipides, des protéines et des minéraux, ainsi que sur la croissance. Cette dernière a pour rôle majeur de permettre au glucose de pénétrer dans les cellules musculaires et les cellules adipeuses, stimuler le foie pour stocker le glucose sous forme de glycogène et synthétiser les acides gras, stimuler l'absorption des acides aminés, inhiber la dégradation des graisses dans le tissu adipeux et stimuler l'absorption du potassium dans les cellules (**Yue et al., 2018; Saxby et al., 2020**).

Il existe différentes hypothèses à l'origine de cette pathologie, parmi lesquelles des changements de l'immunité intestinale. C'est la dysbiose (altération de la composition normale du microbiote avec déséquilibre d'une espèce par rapport à une autre) via notamment une augmentation de la perméabilité intestinale favorisant une activation inflammatoire plus importante (**Lobionda et al., 2019**).

D'autres facteurs ont été évoqués comme les infections virales et l'introduction précoce du lait de vache et du gluten dans l'alimentation du nourrisson ainsi que certaines carences en micronutriments et oligoéléments (vitamine D, zinc, magnésium...etc) (**Reinert-Hartwall et al., 2014; Valera et al., 2015; Piescik-Lech et al., 2016**).

Plusieurs arguments expérimentaux et cliniques plaident en faveur d'une contribution des défaillances du système immunitaire au développement du diabète de type 1 (DT1). Le processus auto-immun, essentiellement déterminé, par une phase préclinique, conduisant à la destruction des cellules bêta pancréatiques (cellules β) (**Pociot et al., 2010**).

D'autre part, on détecte des auto-anticorps anti-îlot chez les patients DT1, forte association de la maladie avec des allèles HLA de Classe II de prédisposition, qui codent pour des fonctions immunitaires (**Ilonen et al., 2016**).

Les cellules immunitaires endommagent directement les cellules β et déclenchent l'apoptose induite par les radicaux libres et les cytokines (**Boldison et Wong, 2016**).

La réponse immunitaire instaure une réponse auto-immune vis-à-vis de la cellule bêta via les cellules dendritiques. Leur rôle est de récupérer les débris apoptotiques des cellules β et de les digérer pour en présenter des fragments peptidiques (les antigènes) à leur surface dans le cadre des molécules HLA (**Richmond et Harris, 2014**).

En réponse à des facteurs environnementaux mal connus, des cellules du système immunitaire inné s'accumulent au niveau du pancréas menant vers l'auto-immunité. Les lymphocytes T CD4+ ainsi activés changent donc leur voie de différenciation vers un phénotype de type effecteur ou pathogène. Ces lymphocytes T CD4+ activés commencent à orchestrer la réponse immunitaire, en stimulant les lymphocytes B à produire les auto-anticorps, en activant davantage d'autres cellules dendritiques et en attirant dans les ganglions pancréatiques des lymphocytes T CD8+ (cytotoxiques). Ces lymphocytes T CD8+ reconnaissent des antigènes bêta présentés sur la surface de la cellule dendritique et, en s'activant, deviennent capables de migrer vers les îlots et de les détruire (**Valle et al., 2013**).

Trois éléments sont donc essentiels au déclenchement de l'auto-immunité du DT1: des lymphocytes T auto-réactifs capables de reconnaître des antigènes de cellules β , la disponibilité de ces antigènes pour une telle reconnaissance, et un contexte inflammatoire dans le microenvironnement de cette rencontre (**Diana et al., 2013**).

En pratique clinique, les auto-anticorps des cellules des îlots de Langerhans, notamment l'auto-anticorps anti-insuline (IAA), l'anticorps de l'acide glutamique décarboxylase (GADA), la protéine de type tyrosine phosphatase (IA-2A) et l'anticorps du transporteur 8 du zinc (ZnT8A) sont utilisés pour diagnostiquer le DT1 et identifier les sujets à haut risque (**Zheng et al., 2018**).

En réalité, une phase d'auto-immunité infra-clinique débute plusieurs mois voire années à l'avance, et elle peut être détectée par la mesure des auto-anticorps (anti-insuline, GAD, IA-2 et ZnT8). Cette auto-immunité infra-clinique est déclenchée par des facteurs environnementaux agissant sur une prédisposition génétique (**Mallone., 2017**).

En regardant les gènes de prédisposition au DT1, on s'aperçoit que les allèles HLA DR/DQ de classe II spécifiques [DRB1*03-DQB1*0201 (DR3-DQ2) ou DRB1*04-DQB1*0302 (DR4-DQ8)] représentent le poids le plus important, alors que les autres gènes de prédisposition identifiés ont un rôle plus marginal (**Morran., 2015; Mallone., 2017**).

L'association de DQ2 et DQ8 est particulièrement rare dans la population générale, mais fréquente chez les diabétiques. Il faut également rappeler que l'allèle DQ2 est en déséquilibre de liaison avec l'allèle DR3, et l'allèle DQ8 avec l'allèle DR4, une notion utile pour interpréter les typages HLA (**Mallone., 2017**).

D'autres gènes de prédisposition mais pas de moindre importance vont agir au niveau de la tolérance centrale. C'est le cas du locus de susceptibilité INS VNTR, qui est une région régulatrice du gène de l'insuline (**Mallone., 2017**) et qui fait l'objet de notre étude.

Cette région est capable de contrôler l'expression d'insuline au niveau thymique. Les allèles de prédisposition induisent en effet une expression plus faible d'insuline dans le thymus, menant à une élimination moins efficace des lymphocytes T anti-insuline et à leur présence en quantité plus importante dans la circulation sanguine. D'autres gènes de prédisposition vont eux agir au niveau des mécanismes de tolérance périphérique. C'est le cas par exemple des allèles de prédisposition CTLA4 qui codent une molécule «freinant» l'activation du lymphocyte T (**Van Belle et al., 2011**).

L'INS VNTR (-23HphI) a fait l'objet d'une analyse approfondie pour déterminer son association avec le diabète de type 1, le diabète de type 2, la taille et le poids à la naissance et le syndrome des ovaires polykystiques (**Matějková-Běhanová et al., 2004**).

Le gène de l'insuline humaine (INS) est situé sur le chromosome 11p15.5 entre les gènes tyrosine hydroxylase (TH) et l'Insulin-Like Growth Factor2 (IGF2) et se compose de trois exons et deux introns. Les trois exons codent pour le peptide signal, la chaîne B, le peptide C et la chaîne A de la molécule d'insuline (**Julier, 1996 ; Pugliese, 2005**). Les niveaux d'expression de l'insuline sont régulés en partie par l'influence transcriptionnelle directe de l'INS-VNTR; localisé à 596 paire de base (pb) en amont du site d'initiation de la transcription du gène de l'insuline dans sa région promotrice (**Sabater et al., 2005**).

Le polymorphisme de l'INS-VNTR consiste en un nombre variable de répétitions en tandem hautement polymorphe de 14 pb répétées selon l'ordre **ACAGGGGT (G/C) (T/C) GGGG** (**Coletta et al., 2013**).

Il est largement divisé en trois groupes alléliques : les allèles courts de classe I consistant en 26-63 répétitions, les allèles intermédiaires de classe II (environ 80 répétitions) et les allèles longs de classe III consistant en 141-209 répétitions (**Cervin et al., 2008**).

Peu de données sont disponibles pour les allèles de classe II qui ont été trouvés principalement dans les populations noires et ont été rarement trouvés dans les populations caucasiennes dont les fréquences alléliques de classe I et de classe III sont de 0,71 et 0,29 respectivement (**Undlien and Berg, 2001 ; Khoshroo et al., 2017**).

Contrairement aux allèles les plus longs (classe III), la fréquence des allèles les plus courts (classe I) est augmentée chez les diabétiques par rapport aux témoins (**Pugliese et Miceli, 2002**).

Des études de population ont montré que les allèles VNTR de classe I confère 2 à 5 fois plus de risque de développer un DT1 alors que les allèles de classe III semble avoir un effet protecteur dominant et sont associés à une réduction de 60 à 70 % au risque de développement du DT1 (**Cimponeriu et al., 2010**).

Même en présence d'auto-anticorps et d'un génotype HLA à haut risque, les individus porteurs de cette classe allélique du VNTR présentent une réduction significative de la probabilité d'inaugurer la maladie (**Fabregat et al., 2015**).

L'allèle VNTR III est associé à une plus grande réserve fonctionnelle de cellules bêta en réponse à un stimulus hyperglycémique direct (**Fendler et al., 2011**). Des niveaux d'expression plus élevés de la proinsuline, dus à la présence de l'haplotype VNTR III dans le thymus, sont associés à une protection relative de 3 à 4 fois supérieure contre le DT1 (**Kyewski et Klein, 2006**).

Le mécanisme proposé pour expliquer l'effet protecteur du VNTR III dans le T1D est qu'une expression thymique plus élevée peut entraîner la suppression des cellules T réactives à la proinsuline au cours du développement (**Durinovic-Belló et al., 2010**).

L'expression thymique des auto-antigènes peut être cruciale pour le développement de l'auto-tolérance pendant la maturation du système immunitaire (**Pugliese, 2005**). Le fait que la sélection négative des thymocytes auto-réactifs soit dépendante de la dose, les allèles VNTR pourraient moduler la tolérance à l'insuline en affectant les niveaux d'expression d'insuline dans le thymus (**Pugliese, 2005**).

Conformément à cette hypothèse, les niveaux d'ARNm de l'INS dans le thymus étaient en corrélation avec les allèles VNTR de manière opposée à celle observée dans le pancréas. Les transcriptions d'INS avec des allèles VNTR de classe III sont transcrites à des niveaux beaucoup

plus élevés (2 à 3 fois) que celles des allèles VNTR de classe I (**Pugliese, 2005 ; Morran et al., 2015**).

De plus, le régulateur auto-immun (AIRE), un facteur de transcription du thymus, joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activation de l'INS VNTR (**Cai et al., 2011**).

Chez les souris knock-out AIRE, les gènes codant pour les molécules du soi, y compris l'insuline, ne sont pas exprimés dans les cellules épithéliales du thymus (**Anderson et al., 2002**). Ainsi, les variations de l'AIRE peuvent expliquer en partie la prédisposition génétique au DT1 (**Cai et al., 2011**).

La participation d'autres polymorphismes fonctionnels dans le déséquilibre de liaison avec l'INS VNTR a été évaluée en particulier par l'existence d'au moins 10 marqueurs de polymorphisme de nucléotides simples (SNP) non codants qui couvrent le segment de 4,1 kb du gène entier de l'insuline et de ses régions bordantes dont on cite les SNPs : -23HphI (A/T), -2221Msp (C/T) et +1140 A/C (**Marchand et Polychronakos, 2007; Ramos-Lopez et al., 2008; Zhang et al., 2015**).

Le SNP rs689 (-23HphI A/T) qui donne lieu à une variante d'épissage de l'Acide Ribo Nucléique (ARN) pré-messager de l'insuline pourrait être le marqueur de substitution le plus approprié à l'INS VNTR car son effet sur la susceptibilité au DT1 est similaire à celui de l'INS VNTR (**Marchand et Polychronakos, 2007 ; Zhang et al., 2015**).

En effet, l'allèle VNTR de classe I est associé à l'auto-immunité et est lié au SNP Adénine (A). En outre, l'allèle VNTR de classe III est associé à la protection contre l'auto-immunité et est lié au SNP Thymine (T) (**Fabregat et al., 2015**).

L'allèle de risque A pourrait probablement servir de marqueur pour une augmentation du risque du DT1 de 46,98 % et le risque du diabète auto-immun latent chez l'adulte (LADA) de 36,94 %, respectivement (**Zhang et al., 2015**).

Il a été prouvé que des mécanismes épigénétiques, tels que l'empreinte parentale peuvent affecter l'expression de l'INS dans le thymus. L'empreinte régule l'expression des gènes en réduisant au silence l'allèle maternel ou paternel, ce qui pourrait soutenir l'explication de l'hétérogénéité du DT1 entre la transmission paternelle (6-9) % et maternelle (2-4)% (**Pugliese, 2005 ; Dubois Laforgue, 2007**).

De plus, la variation de la méthylation du promoteur du gène de l'INS, région contenant un faible taux d'îlots de 5'-Cytosine-phosphate-Guanine-3' (**îlots CPG**), peut donc être suspectée de réguler la transcription de ce gène dans les cellules β pancréatiques et les cellules épithéliales thymiques médullaires (les deux tissus qui expriment ce gène) (**Todd, 2010**).

Des facteurs non-génétiques jouent également un rôle primordial dans le déclenchement du DT1. Le facteur responsable majeur pourrait être une infection virale avec une association préférentielle pour les entérovirus (**Marchand et Thivolet, 2016**). Ces agents infectieux jouent un rôle dans la création chez des sujets génétiquement prédisposés au DT1, d'une condition particulière dans laquelle l'inflammation locale chronique se produit par la persistance du virus infectant dans le tissu pancréatique et l'activation de l'auto-immunité soit par mimétisme moléculaire et/ou effet Bystander (**Principi et al., 2017**).

D'autres facteurs sont également impliqués dans l'accélération du DT1 à l'image du stress (**Nygren et al., 2015**), l'hypothèse hygiéniste (**Rewers et Ludvigsson, 2016**) et le microbiote intestinale (**Doré et al., 2017**).

Les pratiques alimentaires peuvent également contribuer à l'apparition du DT1 et/ou ses complications, tels que l'introduction précoce du lait de vache dans l'alimentation du nourrisson qui peut provoquer un profil inflammatoire des cellules β du fait d'une réaction croisée entre les protéines du lait de vache et les auto-antigènes situés sur les îlots (**Macchiaverni et al., 2012; Kharrazian et al., 2017**).

Plusieurs études ont montré que l'introduction précoce de protéines de lait de vache induit des réponses immunitaires humorales et cellulaires (**Pérez-Bravo et al., 2003 ; Virtanen et Knip , 2003; Luopajarvi et al., 2008**) , bien que le mécanisme d'action des facteurs nutritionnels sur le développement de l'auto-immunité contre les cellules β pancréatique soit encore mal connu.

L'exposition précoce au lait de vache modifie la perméabilité de la muqueuse intestinale ce qui entraîne une réduction de l'intégrité de la barrière physique, rendant ainsi le système immunitaire plus réactif (**Bosi et al., 2006**).

De plus, l'introduction de gluten dans l'alimentation d'un nourrisson avant trois mois augmente le risque de développer un DT1 (**Elenberg et Shaoul, 2014**). La carence en vitamine D

participe aussi à la pathogénèse du DT1 du fait de son effet régulateur du système immunitaire et des voies métaboliques liées au diabète **(Rewers et Ludvigsson, 2016)**.

Le diabète peut être cause et/ou conséquence du déficit nutritionnel qui peut augmenter le risque de complications micro- et macro-angiopathiques. Un déséquilibre en oligo-éléments qui résulte d'un apport insuffisant pourrait être responsable de modifications génétiques et épigénétiques entraînant un diabète sucré de type 1 **(Lin et Huang, 2015 ; Sallé, 2017)**.

Le Magnésium (Mg) est un puissant antioxydant qui provient exclusivement de l'alimentation. C'est le 4ème minéral le plus répandu dans l'organisme et le deuxième cation intracellulaire important après le potassium **(De Baaij et al., 2015)**. Il est impliqué dans plus de 600 réactions enzymatiques dans l'organisme et joue le rôle d'un co-facteur pour de nombreuses réactions enzymatiques comme dans la synthèse du glutathion ainsi que dans l'homéostasie du glucose et l'action de l'insuline **(De Baaij et al., 2015)**.

Il fonctionne avec l'Adénosine-Triphosphate (ATP) comme substrat de la kinase dans la cascade de signalisation de l'insuline. Par conséquent, une carence en Mg^{2+} affecterait la sécrétion d'insuline **(Gommers et al., 2019)**.

Plusieurs études ont suggéré le rôle du Mg dans différents aspects de la réponse immunitaire, tant dans les modèles animaux que dans les systèmes humains notamment dans l'inflammation, l'apoptose, l'expression des gènes des thymocytes **(Tam et al., 2003)**.

Des mutations dans le canal du transporteur Mg^{2+} (MagT1) ont été associées à une diminution des niveaux de lymphocytes T CD4. Ces résultats suggèrent que le Mg est essentiel pour le développement et la prolifération des lymphocytes T **(Li et al., 2011)**.

Le magnésium joue un rôle clé dans la liaison des antigènes aux macrophages **(Laires et al., 2008)**. Il module l'activation des leucocytes essentiellement les neutrophiles et les éosinophiles **(Bussiere et al., 2002)** et participe également à la régulation de l'apoptose **(Petrovic et al., 2016)**.

La diminution des concentrations extra et intracellulaires du Mg sensibilise les cellules immunocompétentes aux stimuli pro-inflammatoires. Collectivement, des facteurs qui ne provoqueraient pas normalement une réponse immunitaire entraînent une charge oxydative dans les phagocytes **(Zheltova et al., 2016)**.

Le magnésium est un cofacteur important des enzymes du métabolisme des acides nucléiques et stabilise leurs structures. Il contribue également à la réplication, la réparation et la protection de l'ADN contre les dommages oxydatifs ; participe et à la réparation de l'ADN **(Petrovic et al., 2016).**

L'homéostasie du magnésium est maintenue par une régulation via des hormones et des transporteurs spécifiques, tels que le médiateur de transport de cations métalliques divalents 2 (CNNM2), Les canaux potentiels des récepteurs transitoires 6 et 7 (TRPM6 et TRPM7), les transporteurs de solutés de la famille 41 membres 1-3 (SLC41A1, SLC41A2 et SLC41A3) **(Schmitz et al., 2007; Romani, 2011).**

Couplées aux découvertes de la génétique du diabète, de nouvelles découvertes liées à la génétique du transport et de l'homéostasie du magnésium ont fourni un terrain encore plus fertile pour examiner certaines voies de recherche prometteuses sur les interactions entre le magnésium et sa relation avec le développement du diabète et ses facteurs de risque (Hruby et al., 2013).

Objectifs et justification de travail :

Selon la Fédération Internationale de Diabète (FID), l'Algérie a été classée dans le "top 10" des pays ayant une incidence très élevée de DT1 en 2016, avec des chiffres de 26 pour 100 000 enfants et adolescents de moins de 20 ans, et 2900 nouveaux cas de moins de 15 ans **(Cho et al., 2018).**

De nombreuses raisons nous ont amené à porter la réflexion sur ce type de sujet. Ces raisons sont aussi pertinentes les unes que les autres. D'abord, notre démarche nous est suggérée par le manque de données enregistrées concernant les facteurs génétiques du diabète de type1 en Algérie en général et à l'extrême ouest Algérien en particulier.

Plusieurs objectifs avaient été fixés pour notre étude à savoir :

- La détermination du spectre allélique du polymorphisme VNTR (-23HpHI) du promoteur du gène de l'insuline impliqué dans la susceptibilité au diabète de type 1 et la comparaison des différentes fréquences alléliques de ce polymorphisme dans la population d'étude.

- La recherche de relation particulière entre les facteurs environnementaux notamment nutritionnels à l'instar des protéines du lait de vache et le diabète de type 1, dans des populations de l'extrême ouest Algérien.
- La détermination du profil alimentaire de la population générale ainsi que l'estimation de l'apport alimentaire journalier en magnésium et son implication dans le diabète de type 1.

Références bibliographiques:

A

Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins S et al., (2002) Projection of an immunological self-shadow within the thymus by the Aire protein. *Science* 298(5597):1395–1401.

Angelova P R and Abramov A Y (2018) Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*; 592(5): 692–702.

Avensac M (2018) Le magnésium dans la prise en charge du stress à l'officine. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en pharmacie. Université Toulouse III PAUL SABATIER.

B

Bokkon I (2012) Recognition of functional roles of free radicals. *Current Neuropharmacology*; 10 (4): 287.

Boldison J et Wong F S (2016) Immune and pancreatic β cell interactions in type 1 diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*; 27(12): 856-867.

Bosi E, Molteni L, Radaelli MG, Folini L, Fermo I et al., (2006) Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia*; 49: 2824–2827.

Bussiere FI, Mazur A, Fauquert J.L, Labbe A, Rayssiguier Y et al., (2002) High magnesium concentration in vitro decreases human leukocyte activation. *Magnes. Res.* 15, 43–48.

C

Cai CQ, Zhang T, Breslin MB, Giraud M, Lan MS (2011) Both polymorphic variable number of tandem repeats and autoimmune regulator modulate differential expression of insulin in human thymic epithelial cells. *Diabetes*;60(1):336–344.

Cervin C, Lyssenko V, Bakhtadze E, Lindholm E, Nilsson P et al., (2008) Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes*; 57:1433e7.

Cho NH, Shaw JE, Huang Y, da Rocha Fernandez JD, Ohirogge AW *et al.*, (2018) IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projection for 2045. *Diabete Res Clin Pract* ; 138:271–81.

Cimponeriu D, Apostol P, Radu I, Craciun A M, Serafinceanu C *et al.*, (2010) The insulin polymorphism -23Hph increases the risk for type 1 diabetes mellitus in the Romanian population. *Genetics and Molecular Biology*; 33(4): 610–614.

Coletta R R, Jorge A A, D'Alva C B, Pinto E M, Billerbeck A E C *et al.*, (2013). Insulin-like growth factor 1 gene (CA) n repeats and a variable number of tandem repeats of the insulin gene in Brazilian children born small for gestational age. *Clinics* ; 68(6) : 785-791.

Criswell L A, Pfeiffer A I, Lum R F, Gonzales B, Novitzke J *et al.*, (2005) Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet* 76(4) :561-571.

Couper JJ (2001) Environmental triggers of type 1 diabetes. *J Paediatr Child Health*; 37: 218–20.

D

De Baaij J H, Hoenderop J G *et* Bindels R J (2015) Magnesium in Man: Implications for health and disease. *Physiological reviews*; 95(1): 1-46.

Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B *et al.*, (2013) Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat Med*;19(1):65-73.

Doré J, Multon M C, Béhier J M, Affagard H, Andreumont A *et al.*, (2017) Microbiote intestinale : qu'en attendre au plan physiologique et thérapeutique ? *Thérapie*; 72(1) : 1-19.

Dubois-Laforgue D (2007) Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1. *Endocrinologie Nutrition*. Elsevier Masson: 1-18.

Durinovic-Belló I, Wu R P, Gersuk V H, Sanda S, Shilling, H G *et al.*, (2010) Insulin gene VNTR genotype associates with frequency and phenotype of the autoimmune response to proinsulin. *Genes & Immunity*; 11(2): 188-193.

E

Elenberg Y, Shaoul R (2014) the role of infant nutrition in the prevention of future disease. *Front Pediatr*; 2014; 2:73.

European Food Safety Authority (EFSA). Dietary Reference Values for nutrients. Summary Report. EFSA supporting publication 2017; e15121.

Everett CJ et King DE (2006) Serum magnesium and the development of diabetes. *Nutrition*; 22:679.

F

Fabregat M, Fernandez M, Javiel G, Vitarella G and Mimbacas A (2015) The genetic profile from HLA and non-HLA loci allows identification of atypical type 2 diabetes patients. *Journal of diabetes research*, 2015.

Fendler W, Wyka K, Cieřlik-Heinrich A, Polakowska E, Jastrębska J et al., (2011) The 5'VNTR proinsulin gene (INS) polymorphism and the functional reserve of β cells in the intravenous glucose tolerance test. *Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism*; 17(1): 5-9.

Forbes JM, Coughlan MT et Cooper ME (2008) Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*; 57:1446–1454.

G

Galli-Tsinopoulou A, Maggana I, Kyrgios I, Mouzaki K, Grammatikopoulou M G et al., (2014) Association between magnesium concentration and HbA1c in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes*;6:369–77

Gommers LMM, Hill TG, Ashcroft F M and de Baaij J H F (2019) Low extracellular magnesium does not impair glucose-stimulated insulin secretion. *Plos One*; 14(6) e0217925.

Graham J, Hagopian WA, Kockum I, Li LS, Sanjeevi CB, et al., (2002) Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes*; 51: 1346–55.

H

Halliwell B et Gutteridge J M (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.

Hruby A, McKeown NM, Song Y, Djoussé L (2013) Dietary magnesium and genetic interactions in diabetes and related risk factors: a brief overview of current knowledge. *Nutrients*. 6;5(12):4990-5011.

Hsu CY, Ho HL, Lin SC, Ho TDH et Ho DMT (2017) The MGMT promoter single-nucleotide polymorphism rs1625649 had prognostic impact on patients with MGMT methylated glioblastoma. *PLoS ONE*;12:9.

I

Ilonen J, Kiviniemi M, Lempainen J, Simell O, Toppari J et al., (2016) Finnish Pediatric Diabetes Register. Genetic susceptibility to type 1 diabetes in childhood - estimation of HLA class II associated disease risk and class II effect in various phases of islet autoimmunity. *Pediatr Diabetes*;17(22):8-16.

J

Julier C (1996) Génétique du diabète insulino-dépendant. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités*, 7(1), 13–19.

K

Kharrazian, D, Herbert M et Vojdani A (2017) Detection of Islet Cell Immune Reactivity with Low Glycemic Index Foods: Is This a Concern for Type 1 Diabetes? *Journal of Diabetes Research*; 2017 :1–12.

Khoshroo M, Khamseh M E, Zargar A, Malek M, Falak, R et al., (2017) The Relationship between insulin variable number of tandem repeats (INS-VNTR) -23 A/T and cytotoxic Tlymphocyte associated protein-4 (CTLA-4) +49 A/G polymorphisms with islet autoantibodies in persons with diabetes. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, 31, 83.

Kyewski B, Klein L (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol*; 24: 571–606.

L

Laires, M.J.; Monteiro, C (2008) Exercise, magnesium and immune function. *Magnes. Res*;21, 92–96.

Larsson HE, Hansson G, Carlsson A, Cederwall E, Jonsson B, Jönsson B, et *al.*, (2008) Children developing type 1 diabetes before 6 years of age have increased linear growth independent of HLA genotypes. *Diabetologia*; 51: 1623–30.

Lempainen J, Härkönen T, Laine AP, Knip M, Ilonen J, et *al.*, (2013) The Finnish Pediatric Diabetes Register Associations of polymorphisms in non-HLA loci with autoantibodies at the diagnosis of type 1 diabetes: INS and IKZF4 associate with insulin autoantibodies. *Pediatric Diabetes*; 14:490–496.

Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF et *al.*, (2011) Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature*; 475: 471–476.

Lin C C et Huang Y L (2015) Chromium, zinc and magnesium status in type 1 diabetes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*; 18(6), 588-592.

Lobionda S, Sittipo P, Kwon HY, Lee YK (2019) The Role of Gut Microbiota in Intestinal Inflammation with Respect to Diet and Extrinsic Stressors. *Microorganisms*. 19;7(8):271.

Luopajarvi K, Savilahti E, Virtanen SM, Ilonen J, Knip M et *al.*, (2008) Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood. *Pediatr Diabetes*; 9(5):434-41.

M

Macchiaverni P, RekimaA, TulicMK, Verhasselt V (2012) L'allaitement maternel peut-il prévenir les maladies allergiques par l'induction de tolérance orale ? *Revue française d'allergologie*; 52: 489-495.

Mallone R (2017) Le diabète de type 1 : une maladie auto-immune et de la cellule bêta Roberto INSERM U1016 MCEd n°86 :79-84.

Marchand L and Polychronakos C (2007) Evaluation of polymorphic splicing in the mechanism of the association of the insulin gene with diabetes. *Diabetes*; 56: 709–713.

Marchand L et Thivolet, C (2016) *Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1*. EMC Endocrinol; 13(4) : 1-12.

Maritim A C, Sanders R A et Watkins J B (2003) Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*; 17(1): 24-38.

Martino A, Mancuso T et Rossi A M (2010) Application of High-Resolution Melting to Large-Scale, High-Throughput SNP Genotyping: A Comparison with the TaqMan(R) Method. *Journal of Biomolecular Screening*, 15(6), 623–629.

Matějková-Běhanová M, Vaňková M, Hill M, Kučera P et *al.*, (2004) Polymorphism of INS VNTR is associated with glutamic acid decarboxylase antibodies and postprandial C-peptide in patients with onset of diabetes after 35 years of age. *Physiol. Res*, 53 :187-190.

McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J et *al.*, (2008) Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges *Nat Rev Genet*; 9(5):356-369.

Mohammedi K, Patente T A, Bellili-Muñoz N, Driss F, Le Nagard H et *al.*, (2016) Glutathione peroxidase-1 gene (GPX1) variants, oxidative stress and risk of kidney complications in people with type 1 diabetes. *Metabolism*; 65(2), 12–19.

Monnier L (2010) chapitre 2 Physiopathologie des états diabétiques Immunopathologie et génétique du diabète de type 1 in *Diabétologie*, 2^{ém} édition, Elsevier Masson.

Morran M P, Vonberg A, Khadra A et Pietropaolo M (2015) Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Molecular aspects of medicine*: 42:42-60.

N

Noble J A (2015). Immunogénétique du diabète de type 1 : un examen complet. *Journal of autoimmunity*; 64 : 101-112.

Nygren M, Carstensen J, Koch F, Ludvigsson J, Frostell A (2015) Experience of a serious life event increases the risk for childhood type 1 diabetes: the ABIS population-based prospective cohort study. *Diabetologia*; 58(6):1188-1197.

P

Patente TA, Mohammedi K, Bellili-Munoz N, Driss F, Sanchez M *et al.*, (2015) Allelic variations in the CYBA gene of NADPH oxidase and risk of kidney complications in patients with type 1 diabetes. *Free Radic Biol Med*; 86: 16–24.

Pérez-Bravo F, Oyarzun A, Carrasco E, Albala C, Dorman JS *et al.*, (2003) Duration of breast feeding and bovine serum albumin antibody levels in type 1 diabetes: a case-control study. *Pediatric Diabetes*; 4:157—161.

Petrovic J; Stanic D; Dmitrasinovic G; Plecas-Solarovic B; Ignjatovic S *et al.*, (2016) Magnesium Supplementation Diminishes Peripheral Blood Lymphocyte DNA Oxidative Damage in Athletes and Sedentary Young Man. *Oxidat. Med. Cell. Longev.* 2019643.

Piescik-Lech M, Chmielewska A, Shamir R, Szajewska H (2016) Systematic review: early infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* ;64:454-459.

Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich H A, Julier, C *et al.*, (2010) Genetics of type 1 diabetes: what's next?. *Diabetes*; 59(7), 1561–1571.

Principi N, Berioli M G, Bianchini S *et* Esposito S (2017) Type 1 diabetes and viral infections: What is the relationship? *Journal of Clinical Virology*; 96: 26-31.

Pugliese A (2005) The insulin gene in type 1 diabetes. *IUBMB life*, 57(7), 463-468.

Pugliese A and Miceli D (2002) The insulin gene in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 18:13-25.

R

Registre du diabète de type 1 chez l'enfant âgé de moins de 15 ans au niveau de la wilaya d'Alger. Année 2010.

Registre du diabète de type 1 chez l'enfant âgé de moins de 15 ans au niveau de la wilaya d'Alger. Année 2016.

Reinert-Hartwall L, Honkanen J, Harkonen T, O Simell, A Peet et *al.*, (2014) No association between vitamin D and beta-cell autoimmunity in Finnish and Estonian children. *Diabetes Metab Res Rev* ;30:749-760.

Rewers M and Ludvigsson J (2016) Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*; 387(10035): 2340–2348.

Richmond JM, Harris JE. Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Dec 1;4(12):a015339.

Romani AM (2011) Cellular magnesium homeostasis. *Arch Biochem Biophys*; 512:1–23.

Romanowicz H, Strapagiel D, Slomka M, Sobalska-Kwapis M, Kępka E et *al.*, (2017) New single nucleotide polymorphisms (SNPs) in homologous recombination repair genes detected by microarray analysis in Polish breast cancer patients. *Clin Exp Med*;17:541-546.

S

Sabater L, Ferrer-Francesch X, Sospedra M, Caro P, Juan M et *al.*, (2005) Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus. *J Autoimmun*; 25: 312–318.

Sallé A (2017) Le diabète, facteur de dénutrition et de carences en micronutriments ? *Nutr clin métab*; 32: 8-21.

Saxby N, Beggs S, Kariyawasam N, Battersby M, Lawn S (2020) Do guidelines provide evidence-based guidance to health professionals on promoting developmentally appropriate chronic condition self-management in children? A systematic review. *Chronic Illn.*;16(4):239-252.

Schmitz C, Deason F, Perraud AL (2007) Molecular components of vertebrate Mg²⁺-homeostasis regulation. *Magnes Res*; 20:6–18.

Shahbah D , Hassan T, Morsy S, El Saadany H, Fathy M (2017) Oral magnesium supplementation improves glycemic control and lipid profile in children with type 1 diabetes and hypomagnesaemia. *Medicine*; 96:11.

Shen G Q, Abdullah K G et Wang Q K (2009) The TaqMan Method for SNP Genotyping. *Single Nucleotide Polymorphisms*, 293–306.

Slebioda Z, Kowalska A, Rozmiarek M, Krawiecka E, Szponar E et al., (2017) The absence of an association between Interleukin 1 beta gene polymorphisms and recurrent aphthous stomatitis (RAS). Arch Oral Biol; 84:45-49.

Song S, Oh DY, Cho GJ, Kim DH, Park YS et al., (2017) Targeted next generation sequencing for identifying genes related to horse temperament. Genes Genom;39:1325-1333.

T

Tam M, Gomez S, Gonzalez-Gross M et Marcos A (2003) Possible roles of magnesium on the immune system. European journal of clinical nutrition; 57(10): 1193-1197.

Todd JA (2010) Etiology of type 1 diabetes. Immunity; 32: 457-467.

U

Undlien D E and Berg J P (2001) Common variants in the regulatory region of the insulin gene are associated with fasting plasma insulin levels in juvenile obesity. European journal of endocrinology; 144(5) : 457-459.

V

Vadva Z, Larsen C E, Propp, B E, Trautwein, M R, Alford D R et al., (2019) A New Pedigree-Based SNP Haplotype Method for Genomic Polymorphism and Genetic Studies. Cells; 8(8), 835.

Valera P, Zavattari P, Sanna A, Pretti S, Marcello A, et al., (2015) Zinc and other metals deficiencies and risk of type 1 diabetes: an ecological study in the high risk Sardinia island. PLoS One, 10(11), e0141262.

Valle A, Giamporcaro GM, Scavini M, Stabilini A, Grogan P et al., (2013) Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. Diabetes.62(6):2072-7.

Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG (2011) Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. Physiol Rev;91(1):79-118.

Virtanen S et Knip M (2003) Nutritional risk predictors of β cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. Am J Clin Nutr; 78:1053-67.

W

Wion E, Brantley M, Stevens J, Gallinger S, Peng H, et *al.*, (2003) Population-wide infant screening for HLA-based type 1 diabetes risk via dried blood spots from the public health infrastructure. *Ann N Y Acad Sci*; 1005: 400–03.

Y

Yang JH, Cutler AJ, Ferreira RC, Reading J L, Cooper N J et *al.*, (2015) Natural variation in interleukin-2 sensitivity influences regulatory T-cell frequency and function in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes*; 64:3891–3902.

Yaribeygi H, Lhaf F, Sathyapalan T et Sahebkar A (2019) Effects of novel antidiabetes agents on apoptotic processes in diabetes and malignancy: implications for lowering tissue damage. *Life Sciences*; 231,116538.

Yue Y, Tang Y, Tang J, Shi J, Zhu T, et *al.*, (2018) Maternal infection during pregnancy and type 1 diabetes mellitus in offspring: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect.*;146(16):2131-2138.

Yu S, Li X, Liu X, Wang Y, Yu F et *al.*, (2018) Characteristic and influencing factors of Taqman genotyping calling error. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*; 32(9):e22613.

Z

Zhang N, Huang W, Dong F, Liu Y, Zhang B, Jing L et *al.*, (2015) Insulin gene VNTR polymorphisms– 2221MspI and– 23HphI are associated with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: a meta-analysis. *Acta diabetologica*; 52(6):1143-1155.

Zheltova A A, Kharitonova M V, Iezhitsa I N, et Spasov A A (2016) Magnesium deficiency and oxidative stress: an update. *BioMedicine*, 6(4).

Zheng P, Li Z et Zhou Z (2018) Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*;e3043.

Partie 1 : Magnésium et diabète de type 1

1. Introduction :

Le magnésium (Mg) est un minéral essentiel pour l'activité des centaines d'enzymes qui englobent 80 % des fonctions métaboliques connues (**Workinger et al., 2018**). Le diabète sucré est considéré comme le trouble métabolique communément associé à une carence en magnésium (Mg) (**Rude et al., 1999**). Plusieurs études expérimentales, épidémiologiques et cliniques soutiennent l'hypothèse selon laquelle le magnésium joue un rôle important dans la modulation de l'absorption du glucose par l'insuline et la sécrétion d'insuline (**Rumawas et al., 2006; Günther et al., 2010; Volpe et al., 2013; Gommers et al., 2019**).

L'hypomagnésémie est associée à de nombreuses manifestations cliniques, notamment l'hypertension, les maladies coronariennes et le diabète (**De Baaij et al., 2012; Volpe et al., 2013; de Baaij et al., 2015; Stritt et al., 2016**). Des études épidémiologiques ont montré une association entre l'alimentation et une diminution de l'incidence du DT1 et/ou ses complications (**Everett et al., 2006**).

Les apports alimentaires en magnésium ont diminué dans le monde entier au fil du temps (**Lopez-Riadura et al., 2004**). Le groupe d'experts de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) propose un apport adéquat (AI) en magnésium de 230 mg/jour pour les enfants de 3 à 9 ans.

Pour le groupe d'âge entre 10 et 18 ans, les AI proposés vont de 250 mg/jour pour les filles à 300 mg/jour pour les garçons (**EFSA, 2013**). Les principales sources alimentaires de magnésium comprennent les céréales non raffinées, les épinards, les noix, légumineuses, pommes de terre blanches, produits laitiers, viande, la volaille et le poisson (**Sales et al., 2006; Volpe et al., 2013**).

Les objectifs de cette étude analytique visent à :

- Déterminer l'apport alimentaire journalier en magnésium (AAJ en Mg) chez les enfants et les adolescents diabétiques de type 1 et de les comparer aux témoins dans la région de Tlemcen (ouest de l'Algérie).
- Évaluer une éventuelle corrélation possible entre le contrôle glycémique et l'AAJ en Mg.
- Calculer le pourcentage de contribution de chaque groupe alimentaire à l'AAJ en Mg.

2. Matériel et méthodes

2.1 Échantillonnage

Il s'agit d'une étude cas-témoins portant sur un échantillon de 201 individus âgés de 3 à 17 ans. Les sujets diabétiques de type 1 composés de 96 personnes ont été recrutés pour une évaluation biochimique, ils étaient sous traitement à l'insuline. Le groupe témoin était composé de 105 individus sains.

2.2 Enquête alimentaire et rappel des 24 heures

L'enquête alimentaire consistait en un rappel des vingt-quatre heures (rappel de 24 heures). C'est une méthode rétrospective d'évaluation du régime alimentaire qui consiste à interroger les personnes sur leur consommation d'aliments et de boissons au cours de la journée précédente.

Le rappel des 24 heures avait été réalisé au cours d'un entretien pendant lequel l'enquêteur interrogeait le participant ou ses parents sur les différents aliments consommés ainsi que sur les horaires des différentes prises. Des images en couleur d'échantillons d'aliments avec le poids indiqué avaient été fournies pour aider les participants à faire leurs choix avec plus de précision. Enfin, l'ensemble des réponses avaient été passées en revue pour être complétées si besoin.

2.3 Estimation de l'apport alimentaire en magnésium :

L'AAJ en Mg avait été estimé sur la base des quantités consommées grâce à la table de composition nutritionnelle des aliments «CIQUAL 2017» mise en ligne gratuitement par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES, France). Elle est utilisée par un large spectre d'individus notamment les concepteurs de logiciels nutritionnels, les professionnels de l'agroalimentaire pour l'étiquetage nutritionnel, et par les équipes de recherche en épidémiologie nutritionnelle.

Afin de réduire l'influence de l'erreur de mesure fréquemment associée à l'enquête alimentaire liée soit à une sous-estimation ou une surestimation de la consommation, nous avons ajusté les estimations pour l'apport énergétique. Les participants ayant un apport énergétique total des repas se situant en dehors de l'intervalle de 500-5000 kcal /jour avaient été exclus de l'étude.

Afin d'apprécier la contribution de chaque groupe d'aliment à l'AAJ en Mg, les aliments avaient été répartis en différents groupes. Les produits céréaliers et féculents incluaient les biscottes, la semoule (couscous), les céréales pour le petit déjeuner, les pâtes, le riz et le pain (pain blanc, pain maison, pain complet). Les produits laitiers incluaient le yaourt, le lait fermenté, le fromage blanc, les petits suisses, les desserts laitiers contenant au moins 50% de lait, le lait consommé seul ou dans des boissons chaudes. Le groupe de viandes comprenait les viandes rouges tels que le bœuf, le veau et l'agneau et les viandes blanches tels que le poulet et la dinde. Le groupe des poissons est constitué de sardine et de thon. Le groupe des fruits comprenait les fruits seuls, des desserts contenant au moins 50% de fruits, ainsi que les jus de fruits. Les légumes incluaient les légumes seuls, les plats à base de légumes contenant au moins 50% de légumes et les soupes de légumes. Les légumineuses comprenaient les lentilles, les fèves, les haricots, petit pois et pois chiche. Le groupe des fruits oléagineux comprenait : les amandes, les noix, les noisettes et les graines de tournesol. Les pâtisseries étaient constituées de tartes, tartelettes, croissants, gâteaux, cakes sucrés et mille feuilles.

Pour évaluer la contribution de chaque groupe d'aliments à l'AAJ en Mg, les aliments ont été divisés en différents groupes.

2.4 Analyse statistique

Après vérification de la normalité des paramètres étudiés, les résultats ont été présentés sous forme de moyennes +/- écarts-types pour les variables quantitatives et en pourcentages pour les variables qualitatives.

Les comparaisons entre les variables qualitatives ont été effectuées à l'aide du test chi-deux. Le test t de Student et l'analyse de variance à facteur unique ont été utilisés pour la comparaison entre les variables quantitatives.

Une analyse bivariée a été utilisée pour étudier l'association entre les différentes variables en calculant le coefficient de corrélation de Pearson.

Des modèles de régressions logistiques multinomiales ont été réalisés. L'odds ratio (OR) et l'intervalle de confiance (IC) à 95 % ont été calculés afin d'évaluer l'impact de la maladie et d'examiner les associations entre l'AAJ en Mg et le DT1.

Nous avons considéré l'apport adéquat (AI) en magnésium basé sur les valeurs de l'EFSA (EFSA, 2017). En raison du manque de données sur la variabilité de l'AI, nous avons arbitrairement attribué +/- 10 mg à l'AI, afin d'obtenir les valeurs pour le groupe de référence.

Nous avons inclus trois modèles pour la régression logistique multinomiale : modèle 1 avec un OR non ajusté, modèle 2 ajusté uniquement en fonction du sexe et modèle 3 ajusté en fonction de l'âge, du sexe et de l'IMC.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 23.0. Pour les différents tests effectués, les résultats ont été considérés comme significatifs pour $P < 0,05$, très significatifs pour $P < 0,01$, et hautement significatifs à $P < 0,001$.

3. Résultats :

3.1. Caractéristiques de la population d'étude

Les caractéristiques des sujets sont présentées dans le **tableau 1**. L'âge moyen des diabétiques était significativement différent de celui des témoins ($9,90 \pm 3,60$ ans contre $11,17 \pm 3,32$ ans). La population diabétique comprenait 43 garçons (44,8 %) et 53 filles (55,2 %) contre la population des non-diabétiques qui comprenait 47 garçons (44,7 %) et 58 filles (55,3 %). Cette différence n'était pas significative.

L'IMC moyen des diabétiques était de $17,40 \pm 3,05$ kg/m² contre $18,35 \pm 3,01$ kg/m² chez les témoins ($P < 0,01$). L'apport énergétique moyen était de 1146 ± 384 kcal/jour chez les diabétiques contre 1337 ± 320 kcal/jour chez les témoins ($P > 0,05$). Le taux de glycémie moyen des diabétiques était de $1,61 \pm 0,56$ g/L. De plus, le taux d'HbA1c était assez élevé chez les diabétiques, ce qui laisse supposer un mauvais contrôle glycémique ($9,07 \pm 1,81$ %).

L'AAJ en Mg dans la population diabétique totale était significativement plus faible que celui des témoins ($185,8 \pm 62,4$ mg/jour contre $227,4 \pm 66,7$ mg/jour) avec ($P < 0,001$). L'AAJ en Mg était différent chez les garçons diabétiques âgés de 3 à 9 ans par rapport aux témoins ($161,71 \pm 38,64$ mg/jour contre $201,11 \pm 26,17$ mg/jour) ($P < 0,001$).

Pour le groupe d'âge de 10 à 17 ans, il y avait une différence très significative dans l'apport alimentaire journalier en Mg entre les cas et les témoins ($191,67 \pm 41,26$ mg/jour contre $240,01$

57,31 mg/ jour). La différence est hautement significative tant chez les filles et les garçons diabétiques par rapport aux non-diabétiques.

Tableau 1. Caractéristiques générales et apports alimentaires journaliers en magnésium de la population étudiée.

<i>Données cliniques</i>		<i>Diabétiques (N=96)</i>	<i>Non-diabétiques (N=105)</i>	<i>P-value</i>
<i>Age (ans)</i>		9,90±3,60	11,17±3,32	0,021
<i>Sexe (%)</i>	Masculin	43 (44,8 %)	47 (44,7 %)	0,549
	Féminin	53 (55,2 %)	58 (55,3 %)	
<i>IMC (Kg/m²)</i>		17,40 ± 3,05	18,35 ± 3,01	0,009
<i>Apport énergétique (Kcal/jour)</i> <i>(KJ/jour)</i>		1146± 384 4797,16 ± 1607,42	1337 ± 320 5596,68 ± 1339,52	0,085
<i>Glycémie à jeune (g/L)</i>		1,61 ± 0,56	0,95± 0,07	0,001
<i>Hba1c (%)</i>		9,07 ±1,81		
<i>AAJ en Mg (mg/jour)</i>		185,8 ± 62,4	227,4 ± 66,7	0,001
<i>AAJ en Mg (mg/jour) (3-9 ans)</i>	Totale	41 (42,7%) 177,84 ±55,78	29 (27,6%) 194,51 ± 28,74	0,200
	Masculin	13 (31,7%) 161,71 ± 38,64	12 (41,4%) 201,11 ± 26,17	
	Féminin	28 (68,3%) 185,34 ± 65,79	17 (58,6%) 189,85 ± 29,22	0,804
<i>AAJ en Mg (mg/jour) (10-17 ans)</i>	Totale	55 (57,3 %) 191,67± 41,26	76 (72,4%) 240,01± 57,31	0,001
	Masculin	30 (55%) 199,11 ± 41,65	35 (46%) 247,40 ±59,42	0,005
	Féminin	25 (45%) 182,75 ± 38,91	41 (54%) 233,71 ±55,51	0,001

IMC : Indice de Masse Corporelle ; Kcal : kilo calorie; KJ :kilo joule; Hba1c :hémoglobine glyquée; AAJ en Mg : Apport Alimentaire Journalier en magnésium.

3.2. Analyse d'association entre l'AAJ en Mg et les différents paramètres chez les diabétiques de type 1

L'analyse bivariée a montré que l'âge, l'IMC et l'apport énergétique étaient positivement corrélés avec l'AAJ en Mg chez les diabétiques. Alors que la glycémie et l'HbA1c étaient négativement corrélés avec l'AAJ en Mg. Cependant, ces corrélations n'étaient pas significatives, sauf pour l'apport énergétique (**tableau 2**).

Tableau 2. Corrélation de Pearson entre l'AAJ en magnésium et différents paramètres chez les diabétiques de type 1.

<i>Les variables</i>	<i>Coefficient de corrélation</i>	<i>P-value</i>
<i>Age (ans)</i>	0,114	0,267
<i>Glycémie à jeun (g/l)</i>	-0,157	0,127
<i>Hba1c (%)</i>	-0,100	0,360
<i>IMC (kg/m²)</i>	0,177	0,085
<i>Apport énergétique (kcal/jour)</i>	0,806	0,001

3.3. Répartition de la population des diabétiques et des non-diabétiques en fonction de l'AAJ en Mg

Les diabétiques et les non-diabétiques étaient partagés en 3 groupe selon l'apport adéquat (AI) en Mg selon l'EFSA : le groupe 1, sujets dont l'apport alimentaire en magnésium est inférieur à l'AI, groupe 2 : apport alimentaire en magnésium égal à l'apport adéquat de l'EFSA +/- 10 mg et groupe 3 : apport alimentaire en magnésium supérieur à l'AI de l'EFSA.

L'IMC des non-diabétiques était significatif entre les 3 groupes dont on remarque que les individus ayant une carence en Mg étaient maigres comparant aux autres groupes. L'apport énergétique était significativement différent entre les trois groupes des diabétiques. Le premier groupe présentait l'énergie la plus faible avec une différence hautement significatives (P=0,001).

Concernant les diabétiques, on constate que le premier groupe présentait le niveau le plus élevé de glycémie ($1,61 \pm 0,63$ g/L) et d' HbA1c ($9,1 \pm 1,86\%$). La différence entre les trois groupes était très significative concernant l'hba1c (**Tableau 3**).

Tableau 3. Caractéristiques de la population étudiée selon les groupes d'apport en magnésium.

	<i>Groupe 1</i>	<i>Groupe 2</i>	<i>Groupe 3</i>	<i>P-value</i>
<i>Non-diabétiques (%)</i>	N=61	N=20	N=19	
IMC (kg/m ²)	17,89 ± 2,87	19,20± 3,24	19,63 ±3,12	0,045
Apport énergétique (kcal/jour)	1276,7 ± 411,0	1155,7 ±30,0	1368,0± 322,4	0,672
(kJ/jour)	5344,30 ± 1720,44	4837,80 ± 125,60	5726,45± 1349,60	
<i>Diabétiques (%)</i>	N=84	N=6	N=10	
IMC (kg/m ²)	16,04 ±1,08	17,37± 2,91	18,53 ± 4,30	0,307
Apport énergétique (kcal/jour)	914,4 ±249,2	9 154,2 ± 199,9	1311,4 ± 240,7	0,001
(kJ/jour)	3827,70 ±1046,10	4831,48 ± 836,80	5489,52 ± 1007,60	
Glycémie à jeun (g/L)	1,61± 0,63	1,42 ± 0,56	1,49 ± 0,41	0,249
HbA1c (%)	9,1±1,86	7,1 ± 1,03	8,9 ± 0,54	0,03

3.4. Résultats de la régression logistique multinomiale en fonction de l'AAJ en Mg

Les modèles de régression logistique multinomiale ont montré une association significative entre l'apport alimentaire journalier en Mg et le DT1. Les résultats des modèles de régression sont présentés dans le **tableau 4**.

Dans le modèle non ajusté, l'OR était de 5,32 (IC : 1,90-14,87 ; P = 0,001) dans le premier groupe avec un faible AAJ en Mg, par rapport au deuxième groupe considéré comme référence. Les personnes dont l'AAJ en Mg dépassant l'AI (groupe 3) présentaient un OR de 2,10 (CI : 0,61-7,23 ; P = 0,239).

Après ajustement avec le sexe uniquement (modèle 2), l'OR était de 3 (IC : 0,93-9,58 ; P = 0,060) pour les garçons présentant un faible apport alimentaire en magnésium et égal à 0,33 (IC : 0,10-1,08 ; P = 0,066) pour les filles. Lorsque l'âge, le sexe et l'IMC ont été inclus dans le modèle 3, l'OR était de 5,50 (1,92-15,74 ; P = 0,002) pour le premier groupe et égal à 2,41 (IC : 0,68-8,38 ; P = 0,173) dans le troisième groupe.

Tableau 4. Rapports de cotes (intervalles de confiance à 95 %) des différents modèles de la régression logistique multinomiale.

	<i>Groupe 2</i>	<i>Groupe 1</i>	<i>Groupe 3</i>
<i>Modèle 1 (OR non-ajusté)</i>	1,00 (référence)	OR (IC 95%; P-value) 5,32 (1,90-14,87; 0,001)	OR (IC 95%; P-value) 2,10 (0,61- 7,23; 0,239)
<i>Modèle 2 (OR ajusté au sexe)</i>	1,00 (référence)		
Masculin	1,00 (référence)	3 (0,93-9,58; 0,060)	1,78 (0,47-6,81; 0,400)
Féminin		0,33 (0,10-1,08; 0,066)	0,56 (0,15-2,15; 0,399)
<i>Modèle 3 (OR ajusté au sexe, âge et IMC)</i>	1,00 (référence)	5,50 (1,92-15,74; 0,002)	2,41 (0,68-8,38; 0,173)

La **figure 1** présente la contribution de l'AAJ en Mg de chaque groupe alimentaire chez les diabétiques et les non-diabétiques (témoins).

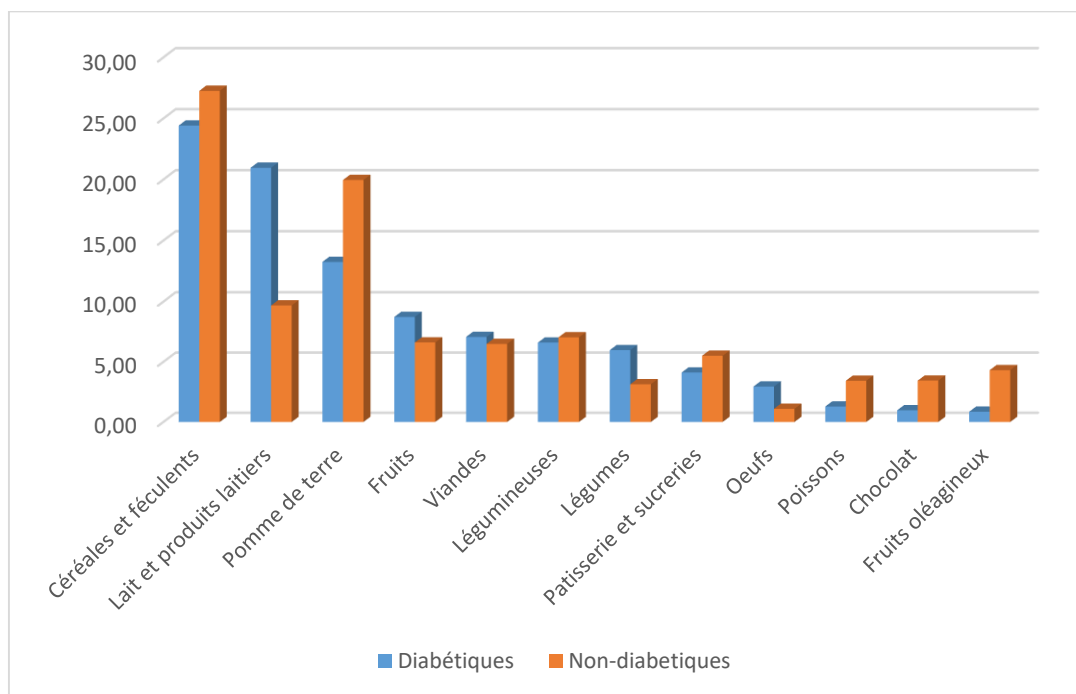


Figure 1. Pourcentage de contribution à l'apport alimentaire journalier en magnésium dans les populations diabétiques et non diabétiques.

Nous avons remarqué que les aliments qui contribuaient le plus à l'apport total de Mg alimentaire chez les diabétiques appartenait à la catégorie des céréales et féculents (24,4 %), en particulier le pain (19 %) ainsi que le lait et les produits laitiers avec un pourcentage de (21%). En revanche, les aliments les plus consommés par les témoins étaient les céréales et féculents et les pommes de terre avec des pourcentages de (27,3 % et 19,7 %) respectivement.

Les diabétiques consommaient de très faibles quantités de poisson, de chocolat et de fruits oléagineux, avec des contributions de (1,3 %, 0,9 % et 0,8 %) respectivement. Cependant, les aliments les moins consommés chez les témoins étaient le poisson, les légumes et les œufs, qui ont contribué à un AAJ en Mg de (3,4 %, 3,1 % et 1,1 %) respectivement (**Figure 1**).

4. Discussion

De nombreuses études transversales menées chez des diabétiques de type 1 suggèrent que les niveaux de magnésium sont significativement plus faibles chez les diabétiques de type 1 que chez les témoins (**Allegra et al., 1997; Galli-Tsinopoulou et al., 2014; Salmonowicz et al., 2018; Lin et al., 2019**). Cependant, elles ne permettent pas de préciser les mécanismes impliqués dans les associations observées ni de préciser les liens entre les faibles niveaux de magnésium et le DT1 : cause ou conséquence ? (**Salle et al., 2017**).

La détermination de l'AAJ de ce minéral chez les jeunes diabétiques n'a pas fait l'objet de nombreuses études. Dans notre population, les diabétiques de type 1 ont un apport en magnésium plus faible que les témoins. La différence est très significative. Si l'on compare ces résultats par rapport aux différents groupes d'âge on remarque que pour les enfants âgés de 3 à 9 ans, les moyennes sont inférieures à l'AI chez les diabétiques et les témoins. Cependant, la différence n'est significative que pour les garçons (161,71 mg/jour chez les diabétiques vs 201,11 mg/jour chez les témoins) ($P < 0,05$), pour le groupe d'âge de 10 à 17 ans.

Les résultats sont inférieurs à l'AI pour les deux sexes et dans la population totale avec une différence très significative (191,67 mg/jour chez les diabétiques contre 240,01 mg/jour chez les témoins) ($P < 0,001$). Les diabétiques et les témoins ont un IMC normal, celui des témoins étant significativement plus élevé.

L'apport énergétique des témoins est plus élevé que celui des diabétiques, mais la différence n'est pas significative ($P = 0,085$). De plus, le pourcentage d'HbA1c est de 9,07%, suggérant un mauvais contrôle glycémique.

Nos résultats indiquent également que 84% des jeunes diabétiques présentent un faible apport alimentaire en magnésium contre 61% pour les témoins. Seuls 10% des diabétiques ont un AAJ supérieure à l'AI, par rapport à 19 % des témoins.

On constate que dans notre population le DT1 ne s'inscrit pas dans un contexte de surpoids et d'obésité, les diabétiques présentaient une corpulence maigre à normale au niveau des trois groupes ($16,04 \pm 1,08 \text{ kg/m}^2$ vs $17,37 \pm 2,91 \text{ kg/m}^2$ vs $18,53 \pm 4,30 \text{ kg/m}^2$) respectivement. Cependant, aucune différence de l'IMC n'est observée entre les groupes.

Ceci rejoint les résultats de l'étude menée par **(Porter et al., 2004; Betts et al., 2005)**. Contrairement à d'autres études qui stipulent que l'obésité, autrefois rare dans le diabète de type 1, est aujourd'hui un problème de plus en plus fréquent **(Conway et al., 2010; Conway et al., 2015; Minges et al., 2017)**.

Le contrôle glycémique, évalué par la glycémie et l'HbA1c, était faible dans le premier groupe des diabétiques (présentant un AAJ en Mg inférieure à l'AI) et le troisième groupe des diabétiques (présentant un AAJ en Mg supérieure à l'AI) avec 1,61 g/l et 1,49 g/l pour la glycémie et 9,1 % et 8,9 % pour le taux de l'HbA1c respectivement, comparant au deuxième groupe de diabétiques (1,42 g/L et 7,1 %). Cependant, la différence entre ces trois groupes est significative uniquement pour l'HbA1c. Cela pourrait affecter le métabolisme du glucose, rendant la population de ces groupes plus susceptible à développer les complications du diabète.

En effet, l'hypomagnésémie et le faible apport alimentaire en Mg, lorsqu'ils sont chroniques, conduisent à l'installation de complications macro et microvasculaires du diabète **(Allegra 1997; Sales et al., 2006; Qu et al., 2013)**. Les complications vasculaires principalement associées à une carence en Mg sont les cardiopathies l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie et l'hypertension **(Agus et al., 1999; Fox et al., 2001)**.

L'analyse bivariée a montré une corrélation positive entre l'AAJ en Mg, l'âge, l'IMC et l'apport énergétique et une corrélation négative avec la glycémie et l'HbA1c, mais de façon non significative.

L'étude de **Shahbah et al., en 2017** a montré une corrélation négative entre le Mg sérique et l'HbA1c chez les jeunes diabétiques égyptiens. D'autre part, une étude d'enfants atteints de diabète de type 1 à Athènes a indiqué que les niveaux les plus bas en Mg étaient associés au taux d'HbA1c le plus élevé.

Dans ce travail, les résultats de la régression logistique multinomiale ont montré une association apparente entre le DT1 et un faible AAJ en Mg. En effet, l'AAJ en Mg dans l'intervalle de 70,08 à 182,78 mg/jour est associé à un OR non ajusté de 5,32 (IC : 1,90-14,87 ; P = 0,001).

Après ajustement au sexe uniquement, le risque est d'environ 3 (IC : **0,93-9,58 ; P = 0,060**) pour les garçons ayant un faible taux de magnésium alimentaire quotidien, tandis que pour les filles, l'OR est de 0,33 (IC : **0,10-1,80 ; P=0,060**).

Après ajustement à l'âge, au sexe et à l'IMC, nous avons obtenu un OR de 5,50 (**1,92-15,74 ; P= 0,002**) pour le premier groupe et 2,41 (IC: **0,68-8,38; P = 0,173**) pour le troisième groupe.

En outre, la contribution de l'AAJ en Mg de chaque groupe d'aliment chez les diabétiques et les non diabétiques a été calculée. Nous avons constaté que les céréales et féculents, y compris le pain, ainsi que les produits laitiers, étaient les principaux contributeurs à l'apport total en Mg chez les diabétiques. Cependant, dans la population saine, les catégories d'aliments consommées étaient les céréales, les féculents et les pommes de terre.

Selon une enquête de l'Office National des Statistiques (ONS) algérien (**ONS, 2011**), les produits céréaliers occupent la plus grande part du budget alimentaire des ménages algériens (17,5% des dépenses alimentaires totales).

Les céréales fournissent plus de 75-80% de l'apport protéique de la ration alimentaire avec une nette préférence pour le blé tendre, suivi du lait et les pommes de terre (**Bessaoud, 2016**).

Nos résultats sont en accord avec une étude néerlandaise qui a trouvé que les céréales et les produits laitiers sont les principaux contributeurs à l'apport total en magnésium avec respectivement 22 % et 14 % chez les diabétiques de type 2 (**Gant et al., 2018**). D'autre part, dans la population générale britannique, les céréales (34 %), la viande (19 %) et les produits laitiers (18%) sont les principaux contributeurs à l'apport alimentaire en Mg (**Davies et al., 2015**) Alors que, dans la population des États-Unis, les principaux contributeurs sont les légumes (13%), le lait (8%) et la viande (7%) (**Ford et al., 2003**).

Notre enquête a mis en évidence l'existence de lacunes dans l'alimentation des enfants et d'adolescents diabétiques en termes d'apport alimentaire quotidien en magnésium. Cela confirme que les efforts d'éducation diététique dans la population diabétique pédiatrique sont encore insuffisants, comme l'ont déjà suggéré Haubursin et Buyschaert (**Haubursin et al., 2001**).

5. Conclusion

La présente étude montre que les jeunes diabétiques ont un apport alimentaire en Mg significativement plus faible que chez les témoins. Le risque du DT1 est significativement associé à un faible apport alimentaire quotidien en Mg, faisant craindre l'apparition de complications chroniques du diabète associées à des carences.

Les Apports Adéquats (AI) ont été définis sur la base des apports observés chez des populations saines de l'Union européenne. Nous avons utilisé les apports adéquats de l'EFSA avec ± 10 mg pour l'apport de référence. En raison de la particularité de notre population et de la taille réduite de l'échantillon, l'étude de l'apport alimentaire journalier en magnésium à grande échelle est très recommandée.

Références bibliographiques de la partie 1 :

A

Agus ZS (1999) Hypomagnesemia. *J Am Soc Nephrol*; 10 : 1616-22.

Allegra A, Corsonello A, Buemia M, D'Angelo R, di Benedetto A et al., (1997) Plasma, erythrocyte and platelet magnesium levels in type 1 diabetic patients with microalbuminuria and clinical proteinuria. *J Trace Elem Med Biol*; 11 : 154-7.

B

Bessaoud O. La sécurité alimentaire en Algérie. Forum des chefs d'entreprise, 19/07/2016, Alger (Algérie). Étude réalisée pour le Forum des chefs d'entreprise (FCE) 2016: 84 p. https://www.iamm.ciheam.org/ress_doc/opac_css/doc_num.php?explnum_id=15702

D

Davies BE (2015) The UK geochemical environment and cardiovascular diseases: magnesium in food and water. *Environ Geochem Health*; 37: 411-27.

De Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2012) Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. *Clin Kidney J*; 5 : i15-24.

De Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2015) Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev*; 95 : 1-46.

E

European Food Safety Authority (EFSA) (2017) Dietary reference values for nutrients. Summary report. EFSA supporting publication; e15121, 98.

Everett CJ, King DE (2006) Serum magnesium and the development of diabetes. *Nutrition*; 22 : 679.

F

Ford ES, Mokdad AH (2003) Dietary magnesium intake in a national sample of US adults. *J Nutr*; 133 : 2879-82.

Fox C, Ramsboomair D, Carter C (2001) Magnesium: its proven and potential clinical significance. *South Med J*; 94 : 1195-201.

G

Galli-Tsinopoulou A, Maggana I, Kyrgios I, Mouzaki K, Grammatikopoulou MG et al., (2014) Association between magnesium concentration and HbA1c in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes*; 6 : 369-77.

Gant CM, Soedamah-Muthu SS, Binnenmars SH, Bakker SJL, Navis G et al., (2018) Higher dietary magnesium intake and higher magnesium status are associated with lower prevalence of coronary heart disease in patients with type 2 diabetes. *Nutrients*; 10(3):307.

Gommers LMM, Hill TG, Ashcroft FM, de Baaij JHF (2019) Low extracellular magnesium does not impair glucose-stimulated insulin secretion. *Plos One*; 14(6):e0217925.

Gunther T (2010) The biochemical function of Mg²⁺ in insulin secretion, insulin signal transduction and insulin resistance. *Magnes Res*; 23 : 5-18.

H

Haubursin Ch, Buyschaert M (2001) Nutritional intake of type 1 and 2 diabetic Belgian patients. *Acta Clin Belg*; 56 : 91-5.

L

Lopez-Riadura R, Willett WC, Rimm EB, Liu S, Stampfer MJ et al., (2004) Magnesium intake and risk of type 2 diabetes in men and women. *Diabetes Care*; 27 : 134-40.

Lin CC, Tsweng GJ, Lee CF, Chen BH, Huang YL (2016) Magnesium, zinc, and chromium levels in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes. *Clin Nutr*; 35 : 880-4.

O

Office national des statistiques (ONS) (2015) Enquête sur les dépenses de consommation et niveau de vie des ménages 2011. Dépenses des ménages en alimentation et boisson en 2011. Office national des statistiques, Alger. *Statistiques Sociales*.

Q

Qu X, Jin F, Hao Y, Li H, Tang T, Wang H, Yan W, Dai K (2013) Magnesium and the risk of cardiovascular events: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS One*; 8 : e57720.

R

Rude RK (1992) Magnesium deficiency and diabetes mellitus (1992) Causes and effects. *Postgrad Med*; 92 : 217-24.

Rumawas ME, McKeown NM, Rogers G, Meigs JB, Wilson PW et al., (2006) Magnesium intake is related to improved insulin homeostasis in the Framingham offspring cohort. *Am Coll Nutr*; 25 : 486-92.

S

Sales CH, Pedrosa LDF (2006) Magnesium and diabetes mellitus: their relation. *Clin Nutr*; 25 : 554- 62.

Salle A (2017) Le diabète, facteur de dénutrition et de carences en micronutriments ? *Nutr Clin Metab* ; 32 : 8-21.

Stritt S, Nurden P, Favier R, Favier M, Ferioli S *et al.*, (2016) Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg²⁺ homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nat Commun*; 7: 11097.

Salmonowicz B, Krzystek-Korpacka M, Noczynska A (2014) Trace elements, magnesium, and the efficacy of antioxidant systems in children with type 1 diabetes mellitus and in their siblings. *Adv Clin Exp Med*; 23: 259-68.

Shahbah D, Hassan T, Morsy S, El Saadany H, Fathy M (2017) Oral magnesium supplementation improves glycemic control and lipid profile in children with type 1 diabetes and hypomagnesemia. *Medicine*; 96: 11.

V

Volpe SL (2013) Magnesium in disease prevention and overall health. *Adv Nutr*; 4 : 378-83.

W

Workinger JL, Doyle RP, Bortz J (2018) Challenges in the diagnosis of magnesium status. *Nutrients*; 10 : 1202.

Dietary intake of magnesium in a type 1 diabetic pediatric population

Yasmine Benslama¹, Nouria Dennouni-Medjati¹, Majda Dali-Sahi¹,
Soumia Kahloula², Ammaria Behar¹, Youssouf Kachekouche¹,
Fatima Zahra Meziane¹, Yahia Harek¹

¹ Abou Bekr Belkaid University of Tlemcen, Department of Biology, Analytical Chemistry and Electrochemistry laboratory, 13000 Tlemcen, Algeria; ² EHS Mother and Child Hospital of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

Correspondence

<dennouria@yahoo.fr>

Abstract. Several studies suggest the importance of adequate magnesium intake in the prevention of diabetes and/or its complications. The main objective of this study is to determine the daily dietary intake of magnesium in type 1 Algerian pediatric diabetics. The study involved a pediatric population of 201 individuals aged from 3 to 17 years, including 96 type 1 diabetics and 105 controls. The daily dietary intake of magnesium was determined by the 24-hour recall. The correlation between the intake of magnesium and glycemic control has been assessed in diabetics. The odds ratio was used to study the relationship between dietary magnesium intake and diabetes through multinomial logistic regression. The results indicate that there are 84% of diabetics with low magnesium intake compared to 81% of controls ($P = 0.001$). A negative but no significant correlation was found between magnesium intake, glycemia, and HbA1c. The multinomial logistic regression model showed that daily dietary magnesium intakes, lower than EFSA adequate intake, are associated with an OR of 5.50 (1.92-15.74; $P = 0.002$) in adjusted model for age, sex, and BMI. It is necessary to correct the low dietary intake of magnesium by changing the eating habits of the pediatric populations in western Algeria and more particularly type 1 diabetics.

Key words: magnesium, type 1 diabetes, dietary intake, pediatric population, western Algeria

Introduction

Magnesium is an essential mineral for the activity of hundreds of enzymes that encompass 80% of known metabolic functions [1]. Diabetes mellitus is considered the metabolic disorder commonly associated with magnesium (Mg) deficiency [2]. Several experimental, epidemiological, and clinical studies support the hypothesis that magnesium plays an important role in modulating insulin-mediated glucose uptake and insulin secretion [3-7].

Hypomagnesemia is associated with many clinical manifestations, including hypertension,

coronary heart disease, and diabetes [5, 8-10]. In type 1 diabetes mellitus (T1DM), epidemiological studies have shown an association between diet and a decrease in the incidence of T1DM and its complications [11].

Dietary intakes of Mg have decreased worldwide over time [12]. The European Food Safety Authority (EFSA) Panel propose an Adequate Intake (AI) of magnesium of 230 mg/day for the children aged 3 to 9 years. For the age group between 10 and 18 years old, the AI proposed are 250 mg/day for girls and 300 mg/day for boys [13]. The main dietary sources of magnesium include unrefined grains, spinach, nuts,

legumes, white potatoes, dairy products, meat, poultry, and fish [5, 14].

The aim of this analytical study is to determine the daily dietary intake of magnesium (DDI of Mg) in children and adolescents with type 1 diabetes and to compare it to controls in the city of Tlemcen (western of Algeria). Moreover, we assessed a possible correlation between glycemic control and DDI of Mg. On the other hand, we used multinomial logistic regression to study the association between diabetes and DDI of Mg. The percentage of contribution of each food group to DDI of Mg was also calculated.

Materials and methods

Study population

This is a case-control study on a sample of 201 individuals aged between 3 and 17 years old. The survey took place in different hospitals in Tlemcen Department, between February and May 2018 and 2019. After taking the institutional ethics committee clearance, the study was conducted on patients already diagnosed as type 1 diabetics. Type 1 diabetic subjects composed of 96 individuals were recruited for a biochemical assessment, they were under insulin therapy.

The control group was consisted of 105 healthy individuals. These volunteers were invited to participate in the study by visiting the recruitment center after an awareness campaign on the risk of T1DM. All the subjects following a special diet or taking dietary supplements (antioxidant minerals and vitamins) were excluded from the study.

Type 1 diabetics, healthy subjects and their parents had been informed of the objectives of the study and had given their consent. The parameters studied were identified for each participant: age, sex, and family history of diabetes. Body mass index (BMI) was calculated.

Fasting blood glucose was determined by the enzymatic glucose oxidase-peroxidase technique (Randox, Antrim, UK) and glycated hemoglobin (HbA1c) was determined by the microchromatographic column technique using an ion exchange resin (Human, Wiesbaden, Germany).

Analysis of food consumption data

The food survey consisted of a 24-hour recall, which is a retrospective method of dietary assessment by asking people about their food and drink consumption, during the previous day [15]. The 24-hour recall was conducted during an interview in which the interviewer asked the participant or the participant's parents about the different foods consumed and the times at which the different foods were taken. Color pictures of food samples with the weight indicated were provided to help participants make their choices more accurately. Finally, all the answers were reviewed and completed if necessary.

The DDI of Mg had been estimated on the basis of the quantities consumed using the "CIQUAL 2017", a food nutritional composition table put online, free of charge by the French National Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES, France).

We adjusted the estimates for energy intake to reduce the influence of the measurement error frequently associated with the food survey related to either under- or over-estimation of consumption. Participants with total energy intake from meals outside the range of 500-5000 kcal/day were excluded from the study [15].

To assess the contribution of each food group to DDI of Mg, the foods were divided into different groups. Cereals and starchy food included rusks, semolina (couscous), breakfast cereals, pasta, rice, and bread (white bread, homemade bread). Dairy products included yoghurt, fermented milk, curd cheese, dairy desserts containing at least 50% milk, milk consumed alone or in hot drinks. The meat group included red meats such as beef, veal and lamb and white meats such as chicken and turkey. The fish group consisted of sardines and tuna. The fruit group included fruit alone, desserts containing at least 50% fruits, and fruit juices. Vegetables included vegetables alone, vegetable dishes containing at least 50% vegetables and vegetable soups. Legumes included lentils, beans, peas, and chickpeas. The group of oleaginous fruits included almonds, walnuts, hazelnuts, and sunflower seeds. Pastries and sweets consisted of pies, tarts, brioches, sweet cakes. Owing to the high frequency of consumption of potatoes, eggs, and the high Mg content of chocolate, these foods were treated as separate groups.

Table 1. General characteristics and daily dietary intakes of magnesium of the population studied.

Clinical data	Diabetics (n = 96)	Controls (nondiabetics) (n = 105)	P-value
Age (years)	8.90 ± 3.60	11.17 ± 3.32	0.021
Sex (%)			
Males	n = 43 (44.8 %)	n = 47 (44.7 %)	0.549
Females	n = 53 (55.2 %)	n = 58 (55.3 %)	
BMI (kg/m ²)	17.40 ± 3.05	18.35 ± 3.01	0.009
Energy intake (kcal/day)	1146 ± 394	1337 ± 320	0.085
(kJ/day)	4797.16 ± 1607.42	5596.69 ± 1339.52	
Blood glucose (g/L)	1.61 ± 0.56	0.95 ± 0.07	0.001
HbA1c (%)	8.07 ± 1.81		
DDI of Mg (mg/day)	195.8 ± 62.4	227.4 ± 66.7	0.001
DDI of magnesium (mg/day) (3-9 years)			
Total population	n = 41 (42.7%) 177.84 ± 55.79	n = 29 (27.6%) 194.51 ± 29.74	0.200
Males	n = 13 (31.7%) 161.71 ± 39.64	n = 12 (41.4%) 201.11 ± 26.17	0.021
Females	n = 28 (68.3%) 195.34 ± 65.79	n = 17 (59.6%) 189.95 ± 29.22	0.904
DDI of magnesium (mg/day) (10-17 years)			
Total population	n = 55 (57.3 %) 191.67 ± 41.26	n = 76 (72.4%) 240.01 ± 57.31	0.001
Males	n = 30 (55%) 199.11 ± 41.65	n = 35 (46%) 247.40 ± 59.42	0.005
Females	n = 25 (45%) 192.75 ± 39.91	n = 41 (54%) 233.71 ± 55.51	0.001

DDI: daily dietary intake; data are means ± SD.

considered as reference. Individuals with DDI of Mg that exceeded the AI (group 3) had an OR of 2.10 (CI: 0.61-7.23; $P = 0.239$).

After adjusting only for sex (model 2), the OR was 3 (CI: 0.93-9.58; $P = 0.060$) for boys with low dietary magnesium intake and equal to 0.33 (CI: 0.10-1.08; $P = 0.066$) for girls. When age, sex, and

BMI were included in model 3, the OR was 5.50 (1.92-15.74; $P = 0.002$) for the first group and equal to 2.41 (CI: 0.68-8.38; $P = 0.173$) in the third group.

Figure 1 shows the contribution to DDI of Mg from each food group in both diabetics and nondiabetics (controls). We noted that the

Table 2. Pearson's correlation between DDI of magnesium and different parameters in type 1 diabetics.

Variables	Coefficient of correlation	P-value
Age (years)	0.114	0.267
Blood glucose (g/L)	-0.157	0.127
HbA1c (%)	-0.100	0.360
BMI (kg/m ²)	0.177	0.085
Energy intake (kcal/day)	0.806	0.001

Table 3. Characteristics of population studied according to magnesium intake groups.

	Group 1	Group 2	Group 3	P-value
<i>Non-diabetics (%)</i>	61	20	19	
BMI (kg/m ²)	17.89 ± 2.97	19.20 ± 3.24	19.63 ± 3.12	0.045
Energy intake (kcal/day)	1276.7 ± 411.0	1155.7 ± 30.0	1369.0 ± 322.4	0.672
(kJ/day)	5344.30 ± 1720.44	4837.90 ± 125.60	5726.45 ± 1349.60	
<i>Diabetics (%)</i>	94	6	10	
BMI (kg/m ²)	16.04 ± 1.08	17.37 ± 2.91	18.53 ± 4.30	0.307
Energy intake (kcal/day)	914.4 ± 249.9	1154.2 ± 199.9	1311.4 ± 240.7	0.001
(kJ/day)	3827.70 ± 1046.10	4831.48 ± 836.80	5489.52 ± 1007.60	
Blood glucose (g/L)	1.61 ± 0.63	1.42 ± 0.56	1.49 ± 0.41	0.249
HbA1c (%)	9.1 ± 1.86	7.1 ± 1.03	8.9 ± 0.54	0.037

Data are means ± SD; Group 1: subjects with dietary intake of magnesium below the AI; Group 2: dietary intake of magnesium equal to EFSA Adequate Intake +/- 10 mg; Group 3: dietary intake of magnesium above the AI.

Table 4. Odds ratios (95% confidence intervals) of the different models of multinomial logistic regression.

	Group 2	Group 1	Group 3
<i>Model 1 (unadjusted OR)</i>	1.00 (reference)	OR (CI 95%; P-value) 5.32 (1.90-14.87; 0.001)	OR (CI 95%; P-value) 2.10 (0.61- 7.23; 0.239)
<i>Model 2 (OR adjusted to sex)</i>			
Male	1.00 (reference)	3 (0.93-9.58; 0.060)	1.78 (0.47-6.81; 0.400)
Female	1.00 (reference)	0.33 (0.10-1.08; 0.066)	0.56 (0.15-2.15; 0.399)
<i>Model 3 (OR adjusted to sex, age and BMI)</i>	1.00 (reference)	5.50 (1.92-15.74; 0.002)	2.41 (0.69-8.38; 0.173)

Group 1: subjects with dietary intake of magnesium below the AI; Group 2: dietary intake of magnesium equal to EFSA Adequate Intake +/- 10 mg; Group 3: dietary intake of magnesium above the AI.

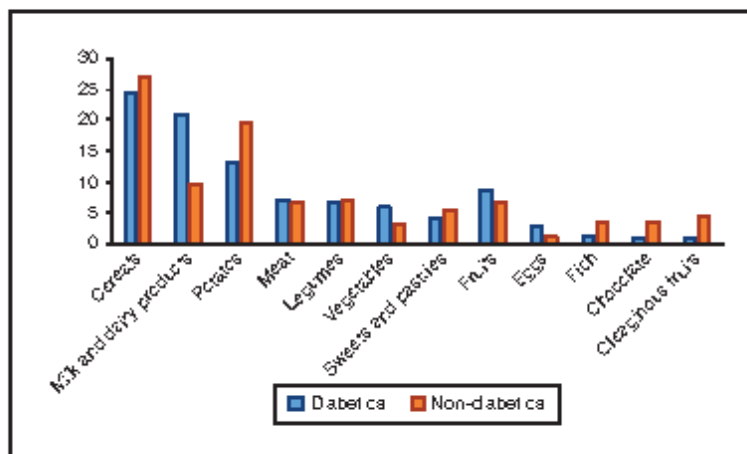


Figure 1. Contribution percentage to daily Mg intake in diabetic and non-diabetic populations.

Partie 2 : Mimétisme moléculaire et implication des protéines du lait de vache dans la pathogénèse du DT1.

1. Introduction :

Plusieurs études ont suggéré qu'il existe une relation entre l'introduction précoce de produits laitiers dans l'alimentation des nourrissons et la susceptibilité au DT1 (**Goldfarb, 2008 ; Lamb et al., 2015**). Depuis lors, sur la base d'une corrélation positive entre la consommation de lait de vache et la prévalence du diabète de type 1, un intérêt particulier a été accordé au lien qui existe entre les modalités d'allaitement dans la petite enfance et l'apparition du DT1. Le risque serait plus élevé chez les sujets présentant des haplotypes HLA de susceptibilité au DT1.

L'inflammation induite par l'exposition à un antigène étranger peut entraîner des maladies auto-immunes à partir d'épitopes à réaction croisée (mimétisme moléculaire) (**Cusick et al., 2012**). L'étude de la réponse immunitaire aux protéines du lait de vache chez les sujets atteints de diabète de type 1 est bien documentée. La présence d'anticorps anti-albumine et anti- β lactoglobuline chez des diabétiques récents a été décrite et semble être liée au génotype HLA de classe II (**Knip et al., 2012**).

Dans une étude cas-témoin, nous proposons de vérifier si l'introduction précoce des protéines du lait de vache : Bovine Sérum Albumine (BSA) et Béta Lacto Globuline (BLG) chez les enfants ayant une prédisposition génétique (HLA DR3/DR4) pourrait constituer un facteur de risque supplémentaire dans notre population (**Meziane et al., 2020**).

2. Matériel et méthodes :

2.1. Outils bio-informatiques et méthodes de calcul :

1. NCBI et Blast

Pour commencer cette étude, nous avons téléchargé les séquences de protéines à partir de la base de données des protéines disponible sur le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI) via le lien : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>. Les protéines du lait de vache ont été sélectionnées à partir de "Bos Taurus" et les auto-antigènes à partir de "Homo sapiens".

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) du serveur du NCBI est un programme de recherche de similarité de séquences qui peut être utilisé via une interface web ou comme un outil

autonome afin d'évaluer les similarités entre la requête d'un utilisateur et une base de données de séquences.

Les séquences de protéines de lait de vache choisies ont été comparées à leur similarité avec la protéine humaine (auto-antigène). Sur la base des résultats de BLAST, nous avons trouvé différentes séquences de peptides qui partagent la similarité entre les auto-antigènes et les protéines du lait de vache, sélectionnées pour l'analyse des liants et non liants pour les allèles HLA de classe II : HLA-DR et HLA DQ. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2. LALIGN

L'alignement des séquences a été effectué à l'aide de Lalign de William Pearson, qui est un programme d'analyse de séquences : https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html qui a pour fonction de trouver des sous-segments d'appariement multiples dans deux séquences. Ce programme met en œuvre les algorithmes de Huang et Miller.

3. Outil d'analyse IEDB

Les prédictions de liaison CMHII ont été réalisées à l'aide de la ressource d'analyse Immune Epitope Database (IEDB) Consensus tool : <http://tools.iedb.org/mhcii/>. Cette méthode décode les séquences de la protéine d'entrée en 15 mers et prédit l'affinité de liaison pour chaque peptide. Le rang centile fournit une échelle standardisée pour les comparaisons entre différents prédicteurs. Une valeur de rang inférieure pour les percentiles (≤ 10) suggère une affinité plus élevée. Dans le cas d'une forme de consensus, la médiane du rang centile des trois méthodes concernées est connue sous le nom de rang centile du consensus IEDB.

Allèles utilisés dans l'étude :

Dans cette étude, nous avons utilisé les haplotypes de risque pour le DT1 HLA DR3 (DRB1*03:01-DQA1*05:01- DQB1*02:01) et HLA DR4 (DRB1*04:01/02/04/05/08 - DQA1*03:01-DQB1*03 :02/04) et l'haplotype DR2 (DRB1*15:01-DQ A1*01:02-DQB1*06:02) qui est un HLA protecteur.

4. Profil de sécrétion des cytokines (IL4 Pred Vs IFN épitope)

Le serveur web de IL4 Pred nous a permis de prédire le potentiel de production d'Interleukine 4 (IL-4) des peptides qui ont une affinité avec le HLA de classe II. Le modèle binaire

des séquences comme entrée est disponible gratuitement sur le site <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il4pred/>.

Nous avons par la suite évalué les peptides inducteurs et non inducteurs à l'aide de l'algorithme des épitopes de l'interféron (IFN) qui combine la force des peptides basés sur les motifs et des peptides basés sur le SVM pour discriminer les peptides induisant l'IFN gamma. Le serveur Web est disponible gratuitement sur <http://osddlinux.osdd.net/raghava/ifnepitope/index.php>.

5. Prédiction de la structure 3D des peptides homologues

La prédiction des structures peptidiques à partir des séquences d'acides aminés avait été effectuée grâce à une approche de novo appelée PEP-FOLD. Cette méthode permet la génération en ligne de modèles pour des peptides de 5 à 50 acides aminés en quelques minutes. Ce serveur web est disponible gratuitement sur <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>

6. Le serveur RAMPAGE

Le serveur RAMPAGE disponible sur <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>, a récupéré les propriétés stéréochimiques des modèles attendus en fournissant des détails précis sur les résidus présents dans les zones favorisées, approuvées et interdites. Nous avons maintenu les modèles attendus en considérant un score en pourcentage de résidus présents dans la région favorisée (> 75).

7. Établissement du mimétisme structurel

L'algorithme d'alignement structurel TM-align est l'un des meilleurs programmes d'alignement structurel basé sur une approche très simple qui utilise à la fois le filetage sans espace et la similarité de structure secondaire pour générer l'ensemble initial de résidus équivalents. Cet ensemble de résidus alignés est affiné à l'aide de la programmation dynamique pour maximiser le TM-score et établir l'évaluation quantitative de l'écart quadratique moyen (RMSD), entre une paire de structures avec un ensemble spécifié de résidus équivalents. Le serveur web est disponible gratuitement sur <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>

3. Résultats :

3.1. Étude analytique

L'âge moyen des diabétiques est de $10,2 \pm 3,3$ ans et celui des témoins est de $9,1 \pm 3,7$ ans, la différence n'est pas significative ($P= 0,136$). Une légère prédominance féminine a été déterminée chez les diabétiques (51 %) contrairement aux témoins dont le sexe masculin est plus représenté (53 %). Cependant il n'y a pas de différence entre les cas et les témoins avec $P=0,685$.

En ce qui concerne l'introduction des protéines du lait de vache, 63,64% des diabétiques ont reçu un allaitement artificiel avant les 6 premiers mois contre 41,89% des sujets sains. Cette différence est significative entre les cas et les témoins ($P = 0,015$). Pour ce qui est de la durée de l'allaitement maternel, 64% des diabétiques ont été allaités pendant moins de 9 mois contre 35% des témoins. La différence est significative entre les 2 groupes avec ($P= 0,001$) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Tableau de contingence pour la description de la population étudiée.

<i>Paramètres</i>		<i>cas</i>	<i>témoins</i>	<i>p-value</i>
<i>Age (ans)</i>		10,2 ± 3,3	9,1 ± 3,7	0,136
<i>Sexe</i>	Masculin	27 (49 %)	39 (52,7 %)	0,685
	Féminin	28 (51%)	35 (47,3 %)	
	Totale	55 (100%)	74 (100%)	
<i>Durée de l'allaitement maternel</i>	Inférieur à 9 mois	35 (63,6%)	26 (35,1%)	0,001
	Supérieur à 9 mois	20 (36,4%)	48 (64,9%)	
	Totale	55 (100%)	74 (100%)	
<i>Introduction précoce du lait de vache</i>	Avant 6 mois	35 (63,6%)	31 (41,9%)	0,015
	Après 6 mois	20 (36,4%)	43 (58,1%)	
	Totale	55 (100%)	74 (100%)	

Le modèle logistique de la régression binaire, montre que les antécédents familiaux de diabète de type 1 ($OR= 9,17$; $IC\ 95\%= 2,85-29,54$, $P= 0,001$). Les antécédents familiaux de diabète de type 2 ($OR= 6,91$; $IC\ 95\%= 2,51-19,08$, $P= 0,001$). Ainsi que l'introduction précoce du lait de vache avant 6 mois ($OR= 4,79$; $IC\ 95\%= 1,55-14,79$, $p= 0,006$) et l'allaitement maternel moins de

9 mois (OR= 3,42 ; IC 95%= 1,06-10,99, p= 0,039); semblent être des facteurs de risque de survenue du diabète de type 1 dans notre population d'étude (**Tableau 2**).

Tableau 2. Variables associées au risque du diabète de type 1 par l'analyse de la régression logistique binaire.

<i>Variables</i>	<i>Z</i>	<i>P-value</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>
<i>Antécédents familiaux de diabète de type 1</i>	3,71	0,001	9,17	[2,85-29,54]
<i>Antécédents familiaux de diabète de type 2</i>	3,73	0,001	6,91	[2,51-19,08]
<i>Introduction précoce du lait de vache avant 6 mois</i>	2,72	0,006	4,79	[1,55-14,79]
<i>Allaitement maternel moins de 9 mois</i>	2,06	0,039	3,42	[1,06-10,99]

3.2. Résultats de l'étude in silico

Grace à l'étude BLAST on a pu déterminer l'homologie de séquence entre les protéines du lait de vache (BSA et BLG) et les antigènes du soi (IA2 et GAD65). Les résultats montrent que le peptide IA2 partage une homologie de séquence avec la protéine BSA. De plus, un autre peptide de l'Ag IA2 partage une homologie de séquence avec la protéine BLG. Enfin, la séquence peptidique du GAD65 partage une séquence d'homologie uniquement avec le peptide BSA (**Tableau 3**).

Ensuite, le logiciel **Lalign** nous a permis d'identifier l'homologie de séquence entre le peptide IA2 et le peptide BSA (couple 1) et avec le peptide BLG (couple 2 et 3). Ainsi que l'homologie de séquence entre le peptide GAD65 avec le peptide BSA (couple 4) (**Tableau 4**).

De plus, les épitopes des protéines du lait de vache présentant un mimétisme moléculaire avec les auto-antigènes se sont avérés des liants aux molécules HLA qui prédisposent au diabète de type 1 (HLA DR3-DR4) avec des rangs de percentiles inférieurs à 10 (**Tableau 5**).

En outre, nous avons prédit la capacité de sécrétion de cytokines des peptides retrouvés en utilisant des serveurs web d'épitopes IL4 et IFN. Certains peptides induisaient l'expression de l'IL-4 et d'autres l'expression de l'IFN- γ (**Tableau 6**). Ceci pourrait influencer la libération de cytokines et la génération de cellules Th1 et Th2.

Par la suite, les structures 3D des peptides de chaque couple (IA2pep1 vs BSApep1), (IA2pep2seq1 vs BLGpep1seq1), (IA2pep2seq2 vs BLGpep1seq2) et (GAD65pep1 vs BSApep2) ont été prédites par le serveur de modélisation de novo PEP-FOLD et validées à l'aide de l'outil web RAMPAGE (**Tableau 7**).

Enfin, nous avons évalué si les épitopes avaient une ressemblance structurale car la séquence et la structure des peptides se liant aux molécules HLA jouent un rôle crucial dans l'activation des cellules T. La superposition de la structure 3D des épitopes montre qu'il existe entre eux un mimétisme structurale avec des RMSD <1 (**Figure. 1A, 1B, 1C et 1D**).

Tableau 3. Identification de l'homologie de séquence entre les auto-antigènes et les protéines de lait de vache par le programme Blast.

Peptides	Séquences homologues	Identité	Positives	Gaps
IA2pep1 30 RLAKEWQALCAYQAEPNTC 48	30 RLAKEWQAL---CAYQAEPNTC 48 RLAKE++A C ++P+ C	9/22(41%)	14/22(63%)	3/22(13%)
BSApep1 371 RLAKEYEATLEECCA KDDPH AC 392	371 RLAKEYEATLEECCA KDDPHAC 392			
IA2pep2 274 LVRSKDQFEFALTAVAEV N AILKALP 300	274 LVRSKDQFEFALTAVAEV NAILKALP 300 LVR+ + + AL E+ + LKALP	11/27(41%)	16/27(59%)	4/27(14%)
BLGpep1 138 LVRTPEVDDEALEKFDKALK ALP 160	138 LVRTPEVDDEAL----EKFDKALKALP 160			
GAD65pep1 239 FSPGGAISNMYAMMIARFKM FPEVKEKGMAALPRLIAFT 277	239 FSPGGAISNMYAMMIARFKMFPEVKEKGMAALPRLIAFT 277 +S G ++ IA RFK E KG+ LIAF+	14/40(35%)	19/40(47%)	5/40(12%)
BSApep2 17 YSRGVFRDTHKSEIAHRFKD LGEEHFKGLVLIASF 52	17 YSRGVFRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLV----LIAFS 52			

Tableau 4. Vérification de l'homologie de séquence entre la protéine de lait de vache et l'auto-antigène par Lalign

Séquences homologues	Séquences homologues	Nom de la Séquence	E-value	Waterman-Eggert score	Identité	Similaire
IA2pep1 30 RLAKEWQALCAYQAE PNTC 48	RLAKEWQA :::::.. RLAKEYEA	Couple 1	0,0017	38	75,0%	100,0%
BSApep1 371 RLAKEYEATLEECCA DDPHAC 392						
IA2pep2seq1 274 LVRSKDQFEFALTAVA EEVNAILKALP 300	DQFEFALTAV ... :: .. EKFDKALKAL	Couple 2	0,14	25	40,0%	80,0%
BLGpep1seq1 138 LVRTPEVDDEALEKFD KALKALP 160						
IA2pep2seq2 274 LVRSKDQFEFALTAVA EEVNAILKALP 300	EEVNAILKAL : . . . :: EALEKFDKAL	Couple 3	0,81	17	40,0%	70,0%
BLGpep1seq2 138 LVRTPEVDDEALEKFD KALKALP 160						
GAD65pep1 239 FSPGGAISNMYAMMIA RFKMFPEVKEKGM ALPRLIAFT 277	RFKMFPEVKEKGM ::: . : . :: RFKDLGEEHFKGL	Couple 4	0,0025	33	46,2%	69,2%
BSApep2 17 YSRGVFRRDTHKSEIA HRFKDLGEEHFKGLV LIAFS 52						

Tableau 5. Identification des liants HLA DR3 / DR4 par l'IEDB

Séquences homologues	Peptides introduits pour la prédiction	Allèles qui prédisposent au diabète de type 1	Epitope peptidique	Méthode utilisée	Rang centile	Noyau EPITOPE
IA2pep1 30 RLAKEWQALCAY QAEPNTC 48	RLAKEWQ ALCAYQAE PNTC	HLA-DRB1*04:02	RLAKEW QALCAY QAE	sturniolo	8,12	RLAKEW QAL
		HLA-DRB1*04:04		Consensus (smm/nn/sturniolo)	5,14	
		HLA-DRB1*04:08		sturniolo	1,60	
		HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02		Consensus (comb.lib./smm/nn)	3,45	
BSApep1 371 RLAKEYEATLEECC AKDDPHAC 392	RLAKEYEA TLEECCA DPHAC	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	RLAKEY EATLEEC CA	Consensus (comb.lib./smm/nn)	4,88	RLAKEY EA
		HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01		Consensus (comb.lib./smm/nn)	3,60	
IA2pep2seq1 274 LVRSKDQFEFALTA VAEEVNAILKALP 300	LVRSKDQF EFALTAVA EEVNAILKA LP	HLA-DRB1*04:01	RSKDQFE FALTAV <u>AE</u>	Consensus (smm/nn/sturniolo)	4,50	DQFEFAL TAV
		HLA-DRB1*04:02		sturniolo	3,27	
		HLA-DRB1*04:08		sturniolo	0,73	
		HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02		Consensus (comb.lib./smm/nn)	0,20	
		HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01		Consensus (comb.lib./smm/nn)	8,36	
BLGpep1seq1 138 LVRTPEVDDEALEK FDKALKALP 160	LVRTPEVDD EALEKFDK ALKALP	HLA-DRB1*04:05	<u>V</u>RTP<u>E</u>VD <u>D</u>EAL<u>E</u>K<u>F</u> <u>D</u>	Consensus (smm/nn/sturniolo)	8,21	EKFD

IA2pep2seq2 274 LVRSKDQFEFALTA VAEEVNAILKALP 300	LVRSKDQFE FALTAVAE VNAILKALP	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	<u>EFALTAV</u>	Consensus (comb.lib./smm/nn)	0,02	EEVNAIL
		HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	<u>AEEVNAI</u> L	Consensus (comb.lib./smm/nn)	0,55	
BLGpep1seq2 138 LVRTPEVDDEALEK FDKALKALP 160	LVRTPEVDD EALEKFDK ALKALP	HLA-DRB1*04:05	<u>VRTPEVD</u> <u>DEALEKF</u> D	Consensus (smm/nn/sturniolo)	5,75	EALEKFD
GAD65pep1 239 FSPGGAINSMYAM MIARFKMFPEVKE KGMAALPRLIAFT 277	FSPGGAINSMYAMMIAR FKMFPEVK EKGMAALP RLIAFT	HLA-DRB1*04:01	<u>IARFKMF</u> <u>PEVKEK</u> GM	Consensus (smm/nn/sturniolo)	8,89	RFKMFP EVKEKG M
BSApep2 17 YSRGVFRRDTHKSE IAHRFKDLGEEHFK GLVLIAFS 52	YSRGVFRRD THKSEIAHR FKDLGEEH FKGLVLIAF S	HLA-DRB1*04:05	<u>DLGEEH</u> <u>FKGLVLI</u>	Consensus (smm/nn/sturniolo)	5,90	DLGEEH FKGL
		HLA-DRB1*04:08	AF	sturniolo	6,13	

Tableau 6. Prédiction de la capacité d'induction d'IL4 et d'IFN- γ pour chaque peptide.

Séquences homologues	Allèles qui prédisposent au diabète de type 1	Epitopes peptidique	Noyaux d'épitopes introduits pour la prédiction	Méthode et score pour la prédiction IL4	Prédiction	Méthodes et score pour la prédiction IFN- γ	Prédiction
IA2pep1 30 RLAKEWQALCAY QAEPNTC 48	HLA- DRB1*04:08 HLA- DQA1*03:01/DQ B1*03:02 HLA- DRB1*04:04 HLA- DRB1*04:02	RLAKEWQALC AYQAEPNTC	RLAKEW QALCAYQ AE	SVM 0,26	IL4 inducer	svm 0,05	+
BSApep1 371 RLAKEYEATLEECC AKDDPHAC 392	HLA- DQA1*05:01/DQ B1*02:01 HLA- DQA1*03:01/DQ B1*03:02	RLAKEYEATL EECCA ^K DDPHAC	RLAKEYE ATLEECCA	Svm 0,23	IL4 inducer	svm -0,36	-
IA2pep2seq1 274 LVRSKDQFEFALTA VAEEVNAILKALP 300	HLA- DQA1*03:01/DQ B1*03:02 HLA- DRB1*04:08 HLA- DQA1*05:01/DQ B1*02:01 HLA- DRB1*04:05 HLA- DRB1*04:04	LVRSKDQFEFA LTAVAE EVNAI LKALP	<u>RSKDQFE</u> <u>FALTAVA</u> <u>E</u>	SVM 0,47	IL4 inducer	SVM -1,08	-
BLGpep1seq1 138 LVRTPEVDDEALEK FDKALKALP 160	HLA- DQA1*05:01/DQ B1*02:01 HLA- DRB1*03:01	LVRTPEVDDEA LEKFDKALKA LP	<u>VRTPEVD</u> <u>DEALEKF</u> <u>D</u>	SVM 0,33	IL4 inducer	MERCI 1	+

IA2pep2seq2 274 LVRSKDQFEFALTA VAEEVNAILKALP 300	HLA- DQA1*03:01/DQ B1*03:02 HLA- DQA1*05:01/DQ B1*02:01 HLA- DRB1*04:05	LVRSKDQFEFA LTAVAEEVNAI LKALP	<u>EFALTAVA</u> <u>EEVNAIL</u>	SVM 0,36	IL4 inducer	MERCI 1	-
BLGpep1seq2 138 LVRTPEVDDEALEK FDKALKALP 160	HLA- DQA1*05:01/DQ B1*02:01 HLA- DRB1*03:01	LVRTPEVDDEA LEKFDKALKA LP	<u>VRTPEVD</u> <u>DEALEKFD</u>	SVM 0,33	IL4 inducer	MERCI 1	+
GAD65pep1 239 FSPGGAISNMYAM MIARFKMFPEVKE KGMAALPRLIAFT 277	HLA- DRB1*04:05	FSPGGAISNMY AMMIARFKMF PEVKEKGMAA LPRLIAFT	<u>IARFKMFP</u> <u>EVKEKGM</u>	SVM -0,06	Non IL4 inducer	SVM 0,09	+
BSApep2 17 YSRGVFRRDTHKSE IAHRFKDLGEEHF KGLVLIAFS 52	HLA- DRB1*04:05 HLA- DRB1*04:08 HLA- DRB1*04:01	YSRGVFRRDTH KSEIAHRFKDL GEEHFKGLVLI AFS	<u>DLGEEHF</u> <u>GLVLIAF</u>	SVM 0,29	IL4 inducer	SVM 0,21	+

Tableau 7. Comparaison de la similarité structurale prédite entre les peptides sélectionnés parmi les protéines de lait de vache et les auto-antigènes.

Peptides homologues	Résidus alignés	RMSD	Score TM de la chaîne 1	Score TM de la chaîne 2	Figures
IA2pep1 <u>RLAKEWQALCAYQAE</u>	RLAKEWQAL : : : : : : : : RLAKEYEAT	0,39	0,72169	0,72169	Fig1.A
BSApep1 <u>RLAKEYEATLEECCA</u>					
IA2pep2seq1 <u>RSKDQFEFALTAVAE</u>	DQFEFALTAV : : : : : : : : EKFDKALKAL	0,32	0,72657	0,72657	Fig1.B
BLGpep1seq1 <u>VRTPEVDDEALEKFD</u>					
IA2pep2seq2 <u>EFALTAVAEVNAIL</u>	EEVNAILKAL : : : : : : : : EALEKFDKAL	0,55	0,58479	0,58479	Fig1.C
BLGpep1seq2 <u>VRTPEVDDEALEKFD</u>					
GAD65pep1 <u>IARFKMFPEVKEKGM</u>	RF-KMFPEVKEKGM : : : : : : : : -RFKDLGEEHFKGLV	0,74	0,51687	0,51687	Fig1.D
BSApep1 <u>DLGEEHFKGLVLIAF</u>					

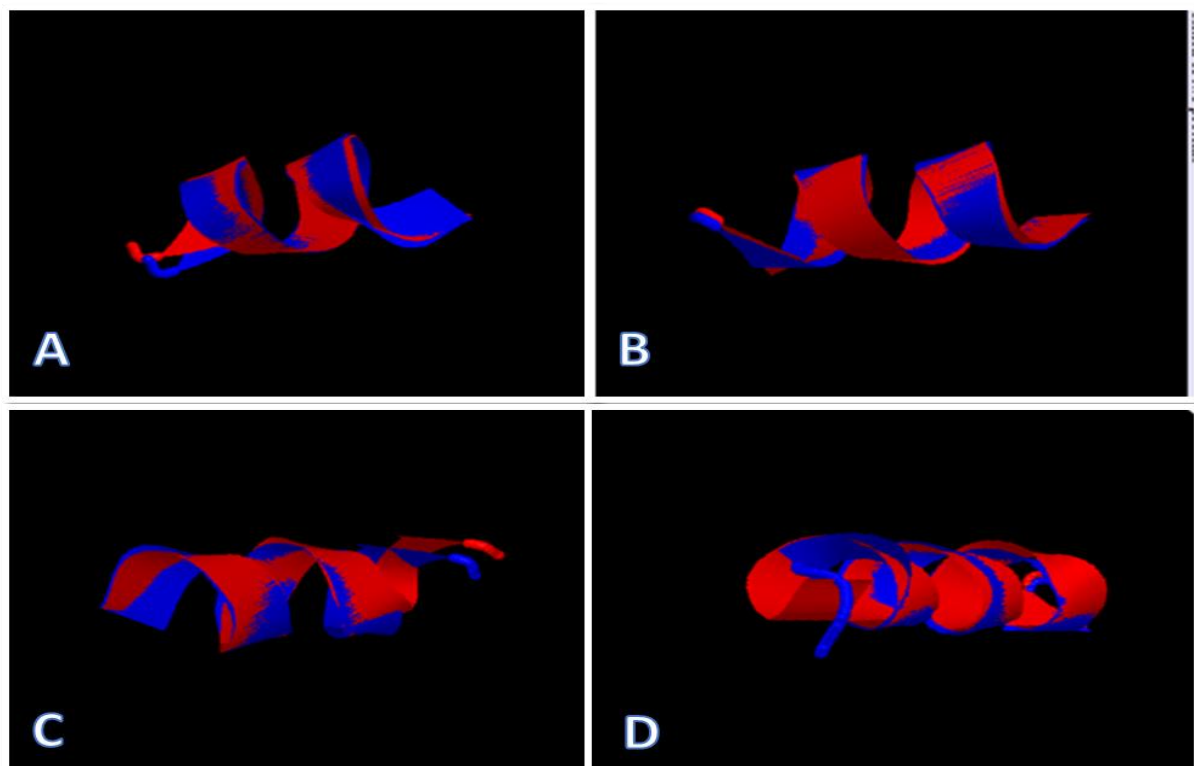


Figure 1. Superposition des épitopes peptidiques deux à deux par TM-align : **(en bleu)** : auto-antigènes ; **(en rouge)** : protéines du lait de vache. A Superposition des épitopes IA2pep1 et BSApep1 (couple 1). B Superposition des épitopes IA2pep2seq1 et BLGpep1seq1 (couple 2). C Superposition des épitopes IA2pep2seq2 et BLGpep1seq2 (couple 3). D Superposition des épitopes GAD65pep1 et BSApep2 (couple 4).

4. Discussion

C'est principalement le rôle de l'introduction plus ou moins précoce des protéines de lait de vache ou du gluten, qui sont montrés du doigt depuis de longue date comme pouvant agir en tant que déclencheur antigénique de l'auto-immunité en association à d'autres cofacteurs dans un contexte d'infection (virus) et/ou d'inflammation, en particulier intestinale.

Les résultats de nos travaux plaident pour un risque accru de développer des auto-anticorps par des apports élevés de protéines de lait de vache chez les enfants porteurs du génotype HLA-DR de risque élevé. En effet, l'introduction précoce des protéines du lait de vache (avant 6 mois) augmente le risque de DT1 avec un OR de 4,79 dans notre population d'étude. En dehors du fait que ce sont des patients porteur de HLA -DR de risque élevé et que les antécédents familiaux de diabète de type 1 et de type 2 sont significativement associés à la survenue du diabète de type 1 (OR de 9,17 et 6,91 respectivement).

Pour cette raison nous avons exploré la relation entre apport de protéines de lait de vache et pathogénie du DT1. En postulant que les protéines du lait de vache BSA et BLG puissent partager une homologie structurelle et fonctionnelle avec les auto-antigènes IA2 et GAD65 et qu'elles sont en mesure d'induire une réaction auto-immune en se liant aux molécules HLA de classe II et induisant ainsi la différenciation des cellules T CD4 naïves.

En effet de nombreuses études soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'alimentation des nourrissons est liée à l'apparition du DT1 notamment l'étude menée par **Knip et al., 2010**.

Alors que le lait maternel s'avère un élément de protections contre les infections potentiellement diabétogènes et l'exposition différée aux antigènes alimentaires, y compris le lait de vache (**Knip et al., 2010**). On n'y a rapporté que les cellules immunitaires sont transférées du lait maternel à l'enfant pour lui conférer une immunité cellulaire passive à court terme (**Cabinian et al., 2016; Ghosh et al., 2016; Cacho et Lawrence, 2017**).

Cette immunité assure une protection immédiate pendant le processus d'éducation thymique et persiste à l'âge adulte (**Ghosh et al., 2016**). La dernière étude a fourni un processus appelé processus d'éducation de l'immunité maternelle, qui démontre que l'allaitement maternel influence le développement du répertoire des cellules T CD8+ de la progéniture de manière spécifique à l'Ag, indépendamment du mécanisme intra thymique de la présentation de l'Ag transporté (**Cabinian et al., 2016**).

Des niveaux élevés d'anticorps aux protéines du lait de vache, tels que la BLG et la BSA, ont été associés au DT1 (**Vaarala et al., 1996 ;Persaud et al., 2004**). Une réponse immunitaire humorale renforcée par des anticorps IgG et IgA contre des fractions protéiques du lait de vache a été signalée chez des patients atteints d'un diabète de type 1 récemment diagnostiqué (**Virtanen et al., 2000; Wahlberg et al., 2006**).

Notre étude a également montré qu'un allaitement maternel inférieur à 9 mois est significativement associé au risque de survenue du DT1 avec un OR de 3,42. Pour vérifier la véracité de nos résultats nous avons entrepris de rechercher des homologies de structures et des mimétismes moléculaires par une approche in silico.

L'étude BLAST nous a permis de préciser que BSA et BLG partagent des homologies de séquences avec IA2 et GAD65. Ensuite, l'analyse de l'homologie de séquence du logiciel Lalign nous a permis d'identifier l'homologie de séquence entre le IA2pep1 et le BSApep1 (**couple 1 : RLAKEWQAL vs RLAKEYEAT**) avec des niveaux d'identité et de similarité de 75% et 100%. IA2pep2 partagent deux homologies de séquences avec BLGpep1 (**couple 2 : DQFEFALTAV vs EKFDKALKAL**) et **couple 3 : EEVNAILKAL vs EALEKFDKAL**) avec des niveaux d'identité et de similarité de 40% et 80% pour le couple 2 et 40% et 70% pour le couple 3 respectivement.

Enfin, la séquence GAD65pep1 partage une homologie de séquence avec BSApep2 (**couple 4 : RFKMFPEVKEKGMA vs RFKDLGEEHFKGLV**) avec des taux d'identité et de similarité de 46,2% et 69,2% respectivement.

La prédiction par calcul des épitopes de CMH de classe II est d'une valeur théorique et pratique considérable car la détection expérimentale est coûteuse et longue (**Sylvester-Hvid et al., 2002; Wang et al., 2008**).

Les gènes du HLA de classe II contribuent à 40 % de la manifestation du DT1 (**Pociot et al., 2016**). Chez l'homme, le risque est particulièrement élevé chez les sujets hétérozygotes qui s'associent aux haplotypes HLA DR3/DR4. Dans l'étude actuelle, les épitopes ont été identifiés et leurs séquences et leurs homologies structurelles restent les meilleures liaisons aux molécules HLA de classe II DR3 (DRB1*03:01-DQA1*0,5:01- DQB1*02:01) et DR4 (DRB1*04:01/02/04/05/08-DQA1*03:01-DQB1*03:02/04) qui sont des allèles de prédisposition génétique au DT1.

En outre, notre étude génétique a confirmé la part de la susceptibilité de ces allèles (89,80 %) chez les diabétiques par rapport à (51,96 %) chez les témoins. Cependant, ces épitopes ne sont pas liés à l'haplotype DRB1 * 15 : 01-DQ A1 * 01 : 02-DQB1 * 06 : 02 (DR2) qui protège contre le DT1 dans la population caucasienne (**Noble et al., 2011**). L'étude de **Krokowski** et collaborateurs a rapporté que des anticorps contre la BSA sont présents chez les patients adultes atteints de DT1, en particulier chez les patients HLA-DR3-positifs (**Krokowski et al., 1995**).

La présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe II aux cellules T CD4+ entraîne la sécrétion du schéma des cytokines. En fonction des cytokines sécrétées, les cellules T auxiliaires se différencient en diverses populations de cellules T : Th1, Th2, Th17 ou Tregs (**Gutcher et al., 2007**). Dans cette étude, nous démontrons que ces épitopes à réaction croisée ont la capacité d'induire une réaction immunitaire en provoquant la différenciation de Th0 en Th1 par la sécrétion d'IFN ou en Th2 par la sécrétion d'IL4. Cette étude suggère que la neutralisation des anticorps GAD65 et IA-2 pourrait ainsi interférer avec la stimulation des réponses auto-réactives des cellules T chez les individus à prédisposition génétique HLA DR3/DR4.

5. Conclusion

L'introduction précoce des protéines du lait de vache chez les individus prédisposés génétiquement HLA DR3 et/ou DR4 est considérée comme un facteur de risque liés à la pathogénèse du DT1. Ce résultat est confirmé par une approche *in silico* montrant que la BSA et la BLG partagent une homologie de séquence et de structure avec l'IA2 et la GAD65 et sont responsables de l'activation des cellules T auto-réactives.

Enfin, l'identification des déclencheurs de l'auto-immunité basée sur la séquence et les informations structurales 3D chez un individu génétiquement prédisposé pourrait être utilisée dans le développement de nouvelles thérapies pour le diabète de type 1 suggérant l'influence des protéines du lait de vache sur l'incidence de cette pathologie.

Références bibliographiques de la partie 2:

C

Cabinian A, Sinsimer D, Tang M, Zumba O, Mehta H, Toma A (2016) Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. PLoS One ; 11 e0156762.

Cacho, NT and Lawrence RM (2017) Innate Immunity and Breast Milk. Frontiers in immunology ; 8: 584.

Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS (2012) Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. Clin Rev Allergy Immunol; 102-111.

G

Ghosh MK, Virginia Nguyen MK, Konrad Muller A, Walker AM (2016) Maternal Milk T Cells Drive Development of Transgenerational Th1 Immunity in Offspring Thymus. The Journal of Immunology; 197: 2290-2296.

Goldfarb, M. F (2008) Relation of time of introduction of cow milk protein to an infant and risk of type-1 diabetes mellitus. Journal of Proteome Research, 7(5), 2165–2167.

Gutcher I and Becher B (2007) APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation” Journal of Clinical Investigation; 117:1119–1127.

K

Knip M , Virtanen SM, Seppa K, Ilonen J, Savilahti E *et al.*, (2010) Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. N Engl J Med; 363: 1900–1908.

Knip M and Simell O (2012) Environmental Triggers of Type 1 Diabetes. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine; 2(7): a007690–a007690.

Krokowski M, Caillat-Zucman S, Timsit J, Larger E, Pehuet-Figoni M *et al.*, (1995) Anti-bovine serum albumin antibodies: genetic heterogeneity and clinical relevance in adult-onset IDDM. Diabetes Care; 18: 170-173.

L

Lamb M M, Miller M, Seifert J A, Frederiksen B, Kroehl M *et al.*, (2015) The effect of childhood cow’s milk intake and HLA-DR genotype on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young. Pediatric Diabetes, 16(1), 31–38.

M

Meziane F Z, Dali-Sahi M, Dennouni-Medjati N, Kachekouche Y, Benslama et *al.*, (2020) Molecular mimicry between varicella, measles virus and Hsp60 in type 1 diabetes associated HLA-DR3/DR4 molecules. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 14(6), 1783–1789.

N

Noble JA and Valdes AM (2011) Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*; 11: 533-542.

P

Persaud DR and Barranco-Mendoza A (2004) Bovine serum albumin and insulin-dependent diabetes mellitus; is cow's milk still a possible toxicological causative agent of diabetes? *Food Chem Toxicol*; 42:707-714.

Pociot F and Lernmark A (2016) Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet* ; 387:2331-2339.

S

Sylvester-Hvid C, Kristensen N, Blicher T, Ferré H, Lauemøller SL et *al.*, (2002) Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide- MHC class I interaction. *Tissue Antigens*; 59: 251–258.

V

Vaarala O, Klemetti P, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J et *al.*, (1996) Cellular Immune Response to Cow's Milk -Lactoglobulin in Patients with Newly Diagnosed IDDM. *Diabetes* 45:178–182.

Virtanen S M, Laar E, Hypponen E, Reijonen H, Rasanen L et *al.*, (2000) Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: A nested case-control study of siblings of children with diabetes.

W

Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J et ABIS-Study Group (2006) Dietary risk factors for the emergence of type 1 diabetes-related autoantibodies in 21/2 year-old Swedish children. *British Journal of Nutrition*, 95(3), 603–608.

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 Comput Biol*; 4(4):e1000048.



Childhood type 1 diabetes mellitus and risk factor of interactions between dietary cow's milk intake and HLA-DR3/DR4 genotype

Yasmine Benslama, Nouria Dennouni-Medjati, Majda Dali-Sahi, Fatima Zahra Meziane & Yahia Harek

To cite this article: Yasmine Benslama, Nouria Dennouni-Medjati, Majda Dali-Sahi, Fatima Zahra Meziane & Yahia Harek (2021): 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, DOI: [10.1080/07391102.2021.1953599](https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1953599)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1953599>



Published online: 20 Jul 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 25



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Childhood type 1 diabetes mellitus and risk factor of interactions between dietary cow's milk intake and HLA-DR3/DR4 genotype

Yasmine Benslama, Nouria Dennouni-Medjati, Majda Dali-Sahi, Fatima Zahra Meziane and Yahia Harek

Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, Abou Bekr Belkaid University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

ABSTRACT

Short-term breastfeeding and early exposure to dairy products into infant diets, may be critical factors for development of type 1 diabetes. In this study, we investigate whether cow's milk proteins are risk factors for type 1 diabetes in genetically susceptible individuals (HLA DR3/DR4) by using statistical analysis and *in silico* approach. In order to verify the potential risk of the early introduction of cow's milk, we conducted this study to validate the veracity of this hypothesis in our population. We included 121 subjects, 55 type 1 diabetics and 74 controls from the region of Tlemcen (Algeria). Thus, the *in silico* approach was performed to determine the molecular mimicry region between Bovine serum albumin and beta-lactoglobulin with self-Islet antigen 2 and glutamate decarboxylase 65 by determining their sequences and their 3D structures. The risk factors associated with type 1 diabetes in a genetically predisposed individual (HLA DR3/DR4) retained by the logistic model are: type 1 and type 2 diabetes inheritance, the early introduction of cow's milk before 6 months and breastfeeding less than 9 months. Besides, the epitopes of cow's milk proteins have the capacity to bind to predisposing HLA class II molecules (HLA DR3/DR4) and induce an immune reaction by the secretion of Interleukin 4 (Th2) and Interferon (Th1) which lead to the destruction of pancreatic beta cells. The early introduction of cow's milk proteins in susceptible individuals is considered as risk factors for the pathogenesis of T1DM. The *in silico* approach confirm that BSA and BLG share sequence and structure homology with IA2 and GAD65.

ARTICLE HISTORY

Received 2 November 2020
Accepted 4 July 2021

KEYWORDS

Type 1 diabetes; HLA DR3/DR4; cow's milk proteins; self antigens; molecular mimicry

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disorder that results from destruction of pancreatic β -cells. Its pathophysiology is influenced by genetic and environmental factors (Katsarou et al., 2017).

More than 40 genetic loci have been associated with T1D in multiple studies. However, the Human Leukocyte Antigens (HLA) DR and DQ alleles remained the major contributor to genetic susceptibility to T1DM (Clayton, 2009; Noble & Erlich, 2012).

Several studies have suggested that there is a relationship between the early introduction of dairy products into infant diets and the increased risk of T1DM. In other words, the early introduction of cow's milk protein in children at genetic risk of T1DM may impact both early and later stages of its development (Goldfarb, 2008; Lamb et al., 2015). Since then, based on a positive correlation between cow's milk consumption and the prevalence of type 1 diabetes, particular interest has been paid to the potential link between breastfeeding modalities in early childhood and the occurrence of the disease. The risk would be higher in subjects with HLA haplotypes of susceptibility to type 1 diabetes (Kimpimäki et al., 2001).

The study of the immune response to cow's milk proteins in subjects with type 1 diabetes is well documented. The presence of anti-albumin and anti- β lactoglobulin antibodies in diabetics has been described and appears to be linked to the HLA class II genotype (Knip & Simell, 2012).

In a case-control study, we propose to verify whether the early introduction of cow's milk proteins in children with genetic predisposition to T1DM (DR3/DR4) could constitute an additional risk factor in our population.

Recently, the *in silico* prediction methods such as immune informatics tools have dramatically helped immunological research to identify epitopes in antigens for many practical reasons including the understanding disease etiology, developing diagnosis assays, immune system modelling and the design of *in silico* vaccine candidates (Pahari et al., 2017; Sanchez-Trincado et al., 2017).

In order to understand the molecular basis of this biological process, we carried out an *in silico* study using different web servers to highlight the sequence homology between self-antigens; Antigen-2 (IA2) and glutamate decarboxylase (GAD 65) and cow's milk proteins; Bovine serum albumin (BSA) and beta-lactoglobulin (BLG). These foreign proteins were tested if they had the capacity to bind to HLA

class II molecules and induce the differentiation of naïve CD4 T cells, which lead to type 1 diabetes.

2. Methods

Our study was carried out (from February 2018 to June 2019) on a sample of 121 individuals, including 55 type 1 diabetics and 74 controls. Type 1 diabetics, healthy subjects and their parents had been informed of the objectives of the study and had given their consent.

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. Subject selected for analysis were <19-year old. After taking the Institutional Ethics committee clearance. For diabetic subjects, specialists according to criteria of American Diabetes Association established the diagnosis (American Diabetes Association, 2015). 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 glycaemia (fasting plasma glucose) ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) and by another test, called HbA1C. Control subjects were selected if their glycaemia was <126 mg/dL and they had never been treated with hypoglycaemic. This protocol was approved by the ANDRS (the Institutional Ethics Committee Algeria).

Genetics HLA predispositions are clearly identified by molecular genotyping using Taqman method. The genotype HLA DR3 and/or DR4 was significantly related to T1DM in our population with a frequency of (89.80%) in diabetics compared to (51.96%) in controls (Article being published).

2.1. Statistical analysis

Analysis was performed using SPSS version 23.0 software. The binary logistic regression model was used to predict risk degree of the different variables (type 1 and type 2 diabetes family history, the earlier introduction of cow's milk and the duration of breastfeeding) in type 1 diabetic patients and p -value < 05 was considered as statistically significant.

2.2. Bioinformatics and computational methods

2.2.1. NCBI and BLAST

To begin this study, we downloaded the protein sequences from the Protein Database available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>. cow's milk proteins were selected from 'Bos Taurus' and self-antigens from 'Homo sapiens'.

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) from the NCBI server is a sequence similarity search program that can be used via a web interface or as a stand-alone tool in order to evaluate similarities between a user's query to a database of sequences (Donkor et al., 2014).

The sequences of cow's milk proteins chosen were compared to their similarity with the human protein (self-antigen). Based on the results of the BLAST, we found different

sequences of peptides that share the similarity between self-antigens and cow's milk proteins, selected for analysis binders vs. non-binders for HLA class II alleles: HLA-DR and HLA DQ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

2.2.2. Lalign

Sequence alignment was performed using William Pearson's Lalign, which is a sequence analysis program: https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html that finds multiple matching sub segments in two sequences. This program implements the Huang and Miller algorithms (Huang & Miller, 1991).

2.2.3. IEDB analysis tool

The MHCII binding predictions were made using the Immune Epitope Database (IEDB) analysis resource Consensus tool: <http://tools.iedb.org/mhcii/> (Wang et al., 2008, 2010).

This method decodes sequences of the input protein into 15-mers and predicts the binding affinity for each peptide. Percentile rank provides a standardized scale for comparisons between different predictors. A lower rank value for percentiles (≤ 10) suggests a higher affinity. In the case of consensus form, the percentile rank median of the three methods concerned is known as the percentile rank of the IEDB consensus (Nielsen & Lund, 2009).

2.2.3.1. Alleles used in the study. In this study, we used HLA DR3 (DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01) and DR4 (DRB1*04:01/02/04/05/08-DQA1*03:01-DQB1*03:02/04) risk haplotypes for T1DM and the haplotype DR2 (DRB1*15:01-DQ A1*01:02-DQB1*06:02) that is HLA protector (Meziane et al., 2020).

2.2.4. Cytokine secretion profile (IL4 Pred vs. IFN epitope)

The web server of IL4 Pred allowed us to predict the Interleukin 4 (IL-4) producing potential of the peptides that have an affinity with class II HLA. The binary pattern of the sequences as an input and is freely available through: <https://webs.iitd.edu.in/raghava/il4pred/> (Dhanda et al., 2013).

We evaluate inducing and non-inducing peptides using the Interferon (IFN) epitope algorithm that combines the strength of both motif-based and SVM-based peptides to discriminate against peptide inducing IFN gamma. Web server is freely available through <http://osddlinux.osdd.net/raghava/infepitope/index.php> (Dhanda et al., 2013).

2.2.5. 3D structure prediction of homologous peptides

PEP-FOLD is a de novo approach aimed at predicting peptide structures from amino acid sequences. This method makes possible the on-line generation of models for peptides from 5 to 50 amino acids in a few minutes (Shen et al., 2014). This web server is freely available on <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>

RAMPAGE server: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>, has retrieved stereochemical properties of

expected models providing accurate details on residues present in the favoured, approved and disallowed areas. We maintain the expected models by considering a percentage score of residues present in the favoured region (>75) (Meziane et al., 2020).

2.2.6. Establishing the structural mimicry

The TM-align structure alignment algorithm is one of the best structural alignment programs based on a very simple approach that uses both gapless threading and secondary structure similarity to generate the initial set of equivalent residues. This set of aligned residues is refined using dynamic programming to maximize the TM-score and establish the quantitative assessment root-mean-square deviation (RMSD), between a pair of structures with a specified set of equivalent residues (Pandit & Skolnick, 2008). The web server is freely available through <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>

3. Results

3.1. Statistical result

The mean age of diabetics is 10.2 ± 3.3 years and that of controls is 9.1 ± 3.7 years but difference is not significant between them ($p = .136$). The number of male subjects with diabetes is 27 (49%) compared to 28 female subjects (51%). There are 39 male controls (52.70%) compared to 35 female subjects (47.30%). However, there is no difference between cases and controls $p = 685$.

Concerning the introduction of cow's milk proteins, 63.64% of diabetics received an artificial breastfeeding before the first 6 months compared to 41.89% of controls. This difference is significant between cases and controls ($p = .015$). Thus, 63.64% of diabetics received breastfeeding for less than 9 months compared to 35.14% of controls. The difference is significant between the two groups with ($p = .001$; Table 1).

The regression logistic model shows that type 1 diabetes family history (OR= 9.17; IC 95%= 2.85–29.54, $p = .001$), type 2 diabetes family history (OR= 6.91; IC 95%= 2.51–19.08, $p = .001$), the early introduction of cow's milk before 6 months (OR= 4.79; IC 95%= 1.55–14.79, $p = .006$) and breastfeeding less than 9 months (OR= 3.42; IC 95%= 1.06–10.99, $p = .039$) seems to be a risk factor for developing type 1 diabetes.

In contrast, no relation was observed between the introduction of cow's milk in infants above 9 months and susceptibility of T1DM.

3.2. Bioinformatics results

3.2.1. Cow's milk proteins share sequences homology with self-antigens

The BLAST study investigated whether the protein of BSA and BLG share the homology of the sequence with IA2 and GAD65. The results show that IA2 peptide shares a homology sequence with BSA. In addition, another sequence peptide of

IA2 share sequence homology with BLG. Finally, the GAD65 sequence share a homology sequence only with BSA peptide (Table 2).

3.2.2. Cow's milk proteins epitopes showing molecular mimicry with self-antigens are HLA binders that predispose to type 1 diabetes

The ability of homologous peptides to induce T1DM was confirmed by binding to MHC class II molecules that predispose to T1DM. As a result, we have taken a holistic approach using IEDB analysis resources. This *in silico* analysis reveals that Cow's milk proteins that share sequences similarities with human homologous self-antigens, are HLA binders with percentiles ranks <10 (Table 4).

3.2.3. Cytokine secretion profile of the peptides

We predicted the cytokine secreting ability of the peptides by employing IL4 pred and IFN epitope web servers. We noticed that some mimicking peptides induce IL-4 expression and others induce IFN- γ expression (Table 5). Therefore, these mimicking peptides can influence the release of cytokines and the generation of Th1 and Th2 cells.

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

The 3D structures of each couple's peptides (IA2pep1 vs. BSApep1), (IA2pep2seq1 vs. BLGpep1seq1), (IA2pep2seq2 vs. BLGpep1seq2) and (GAD65pep1 vs. BSApep2) were predicted and their scrambled versions were generated through the PEP-FOLD de novo modeling server and validated using RAMPAGE web-based tool.

All peptides showed the number of residues that were subject to structural mimicry prediction at >75% in the favoured region. Subsequently, we evaluated whether the epitopes had a structural resemblance because the sequence and structure of peptides binding to HLA molecules play a crucial role in activating T cells. The superposition of the epitopes' 3D structure shows that structural mimicry exists between them with RMSDs <1 (Table 6; Figure 1(A–D)).

4. Discussion

The present study was performed to investigate the possibility of cow's milk proteins BSA and BLG that share homology with self-antigen IA2 and GAD65 to cause the autoimmune disease type 1 diabetes mellitus by binding to HLA class II molecules and inducing the differentiation of naive CD4 T cells.

Our study demonstrated that type 1 and type 2 diabetes family history are considered as risk factors contributing to the occurrence of T1DM with ORs of (9.17 and 6.91), respectively. Concordantly, previous studies indicating that Having family members with type 1 or type 2 diabetes, was found more frequently among diabetic than among control children which increase the risk of developing type 1 diabetes (Rosenbauer et al., 2007; Weires et al., 2007).

Table 1. Contingency table describing the study population.

Parameters		Cases	Controls	p value
Age		10.2 ± 3.3	9.1 ± 3.7	.136
Sex	Male	27 (49%)	39 (52.70%)	.685
	Female	28 (51%)	35 (47.30%)	
	Total	55 (100%)	74 (100%)	
Duration of breastfeeding	Under 9 months	35 (63.64%)	26 (35.14%)	.001
	Above 9 months	20 (36.36%)	48 (64.86%)	
	Total	55 (100%)	74 (100%)	
Early introducing of cows' milk	Before 6 months	35 (63.64%)	31 (41.89%)	.015
	After 6 months	20 (36.36%)	43 (58.11%)	
	Total	55 (100%)	74 (100%)	

Table 2. Identification of sequence homology between self antigens and cow's milk proteins by Blast program.

Peptides	Sequences homologies	Identities	Positives	Gaps
IA2pep1	30 RLAKWQAL--CAVQAEFNTC 48 RLAKE++A C + +P + C 371 RLAKYEYATLECCAKDDPHAC 392	9/22 (41%)	14/22 (63%)	3/22 (13%)
BSApep1	371 RLAKYEYATLECCAKDDPHAC 392			
IA2pep2	274 LVRSKDQFEPALDAVAEEVNAI LKALP 300 LVR + + + AL E + + LKALP 300 LVRSKDQFEPALDAVAEEVNAI LKALP 138 LVRTPEVDDEAL---EKFDKALKALP 160	11/27 (41%)	16/27 (59%)	4/27 (14%)
BLGpep1	138 LVRTPEVDDEAL LKFDKALKALP 160			
GAD6S pep1	239 FSPGGAI SNMYAMMIARFKMFPVEVKEKGM AALERLIAPT 277 +S G + + IA RFK E KG + LIAF + PRLIAPT 277 17 YSRGVFRDTHKSEIAHRFDLGEEHFKGL	14/40 (35%)	19/40 (47%)	5/40 (12%)
BSApep2	17 YSRGVFRDTHKSEIAHRFDLGEEHFKGL VLIAFS 52			

Next, the Align software sequence homology analysis allowed us to identify the sequence homology between the IA2 peptide and BSA peptide (couple 1) and with BLG peptide (couples 2 and 3). Also, the GAD6S peptide shares sequence homology with BSA (couple 4; Table 3).

Table 3. Verification of sequence homology between cow's milk protein and self antigen by Align.

Homologous sequences	Homologous sequences	Sequence name	E value	Waterman-Eggert score	Identity (%)	Similar (%)
A2pep1 30 RLAKWQALCAVQAEFNTC 48 ESApep1 371 RLAKYEYATLECCAKDDPHAC 392	RLAKWQAL : : : : : RLAKYEYAT	Couple 1	0.0017	38	75.0	100.0
A2pep2seq1 274 LVRSKDQFEPALDAVAEEVNAI LKALP 300 BLGpep1seq1 138 LVRTPEVDDEAL LKFDKALKALP 160	DQFEPALDAV : : : : : EKFDKALKAL	Couple 2	0.14	25	40.0	80.0
A2pep2seq2 274 LVRSKDQFEPALDAVAEEVNAI LKALP 300 BLGpep1seq2 138 LVRTPEVDDEAL LKFDKALKALP 160	EEVNAI LKAL : : : : : EAL EKFDKAL	Couple 3	0.81	17	40.0	70.0
GAD6S pep1 239 FSPGGAI SNMYAMMIARFKMFPVEVKEKGM ESApep2 17 YSRGVFRDTHKSEIAHRFDLGEEHFKGL VLIAFS 52	RFKMFPVEVKEKGM : : : : : RFDLGEEHFKGL	Couple 4	0.0025	33	46.2	69.2

Table 4. Identification of HLA-DRB1/DR4 binders by the IEDB.

Homologous sequences	Peptides introduced for prediction	Alleles that predisposes to type 1 diabetes	Peptide epitope	Method used	Percentile rank	EPITOPE zone
IA2pep1 30 RLAKEWQALCAIQAEPTTC	RLAKEWQALCAIQAEPTTC	HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:04 HLA-DRB1*04:06 HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:06 HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:05	RLAKEWQALCAIQAE	sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (simm/nm/sturniolo)	2.12 5.14 1.60 3.45 4.28 3.60 4.50 3.27 0.73 0.20 2.36 2.21	RLAKEWQAL
BSApep1 371 RLAKEYEATLECCAKDDPHAC	RLAKEYEATLECCAKDDPHAC	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:06 HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:05	RLAKEYEATLECCA	Consensus (simm/nm/sturniolo) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (simm/nm/sturniolo)	3.60 4.50 3.27 0.73 0.20 2.36 2.21	RLAKEYEA
IA2pep2seq1 274 LVRSKQDFEFALTAVAEVNAIKALP	LVRSKQDFEFALTAVAEVNAIKALP	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:06 HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:05	RSKQDFEFALTAVAE	Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (simm/nm/sturniolo)	4.50 3.27 0.73 0.20 2.36 2.21	DQFEFALTAV
BLGpep1seq1 132 LVRTPEVDDALEKFDKALKALP	LVRTPEVDDALEKFDKALKALP	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:06 HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:05	VRTPEVDDALEKFD	Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (simm/nm/sturniolo)	2.21 0.02 0.55 5.75	BNFD EVNAIL EALEKFD
A2pep2seq2 274 LVRSKQDFEFALTAVAEVNAIKALP	LVRSKQDFEFALTAVAEVNAIKALP	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:06 HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:05	EFALTAVAEVNAIL	Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (simm/nm/sturniolo)	0.02 0.55 5.75	EVNAIL EALEKFD
BLGpep1seq2 132 LVRTPEVDDALEKFDKALKALP	LVRTPEVDDALEKFDKALKALP	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:06 HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*04:05	VRTPEVDDALEKFD	Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo Consensus (simm/nm/sturniolo) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (comb.lib./simm/nm) Consensus (simm/nm/sturniolo)	0.02 0.55 5.75	EVNAIL EALEKFD
GAD5pep1 239 FSPGASINMYAMIAIRKMPPEVK	FSPGASINMYAMIAIRKMPPEVK	HLA-DRB1*04:01	IARFKMPPEVKEGGM	Consensus (simm/nm/sturniolo)	2.29	RFKMPPEVKEGGM
BSApep2 17 YSRGVFRROTHKSEIHRFKDL	YSRGVFRROTHKSEIHRFKDL	HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06	DLGEEHFKGLVIAF	Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo	5.90 6.13	DLGEEHFKGL
VLIAF52 17 YSRGVFRROTHKSEIHRFKDLGEEHFKGL	YSRGVFRROTHKSEIHRFKDL GEEHFKGLVIAF52	HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06	DLGEEHFKGLVIAF	Consensus (simm/nm/sturniolo) sturniolo	5.90 6.13	DLGEEHFKGL

Breastfeeding less than 9 months is also a risk factor for the pathogenesis of T1DM in our study with an OR of 3.42. Some studies indicating that short breastfeeding is a risk factor for the appearance of signs of beta-cell autoimmunity leading to T1DM (Holmberg et al., 2007; Kimpimäki et al., 2001).

Breast milk protects against potentially diabetogenic infections and postponed exposure to dietary antigens in immature gut including cow's milk (Knip et al., 2010). Several studies have shown that immune cells are transferred from the mother's milk to her child to confer short-term passive cellular immunity (Cabinian et al., 2016; Cacho & Lawrence, 2017; Ghosh et al., 2016). This immunity provides immediate protection while the thymic education process is underway and persists into adulthood (Ghosh et al., 2016). The latest study provided a process termed educational maternal immunity process, which demonstrates that breastfeeding influences the development of the CD8+ T cell repertoire of the offspring in an Ag-specific manner regardless of the intrathymic mechanism of the presentation of the transported Ag.

In addition, the early introduction of cow's milk proteins (before 6 months) is also a risk factor for the pathogenesis of T1DM with an OR of 4.79. Similar studies support the hypothesis that infant diet is related to the occurrence of T1DM. Knip et al. (2010) suggested that introducing of cows' milk to infants before 2-month old, compared with 4months or older is a strong influencing environmental factor for type 1 diabetes.

Cow's milk proteins are a possible agent that triggers the autoimmune response implicated for the onset of T1DM. Elevated levels of antibodies to cow's milk proteins such as BLG and BSA have been associated to T1DM (Persaud & Barranco-Mendoza, 2004; Vaarala et al., 1996). Inflammation induced by exposure to a foreign antigen can lead to autoimmune diseases from cross-reactive epitopes (molecular mimicry) (Cusick et al., 2012). Enhanced humoral immune response IgG and IgA antibodies to proteins fractions in cow's milk have been reported in patients with newly diagnosed T1DM (Virtanen et al., 2000; Wahlberg et al., 2006).

The BLAST study investigated whether the BSA and BLG peptides share the homology of sequence with IA2 and GAD65. Next, the Lalign software sequence homology analysis allowed us to identify the sequence homology between the IA2pep1 and BSApep1 (couple 1: RLAKEWQAL vs. RLAKEYEAT) with identity and similarity levels of 75% and 100%. IA2pep2 share two sequences homology with BLGpep1 (couple 2: DQFEFALTAV vs. EKFDKALKAL) and couple 3: EEVNAILKAL vs. EALEKFDKAL) with identity and similarity levels of 40% and 80% for the couple 2 and 40% and 70% for the couple 3, respectively. Finally, the GAD65pep1 sequence share sequence homology with BSApep2 (couple 4: RFKMPPEV/KEKGMA vs. RFKDLGEEHFKGLV) with identity rate and similarity of 46.2% and 69.2%, respectively.

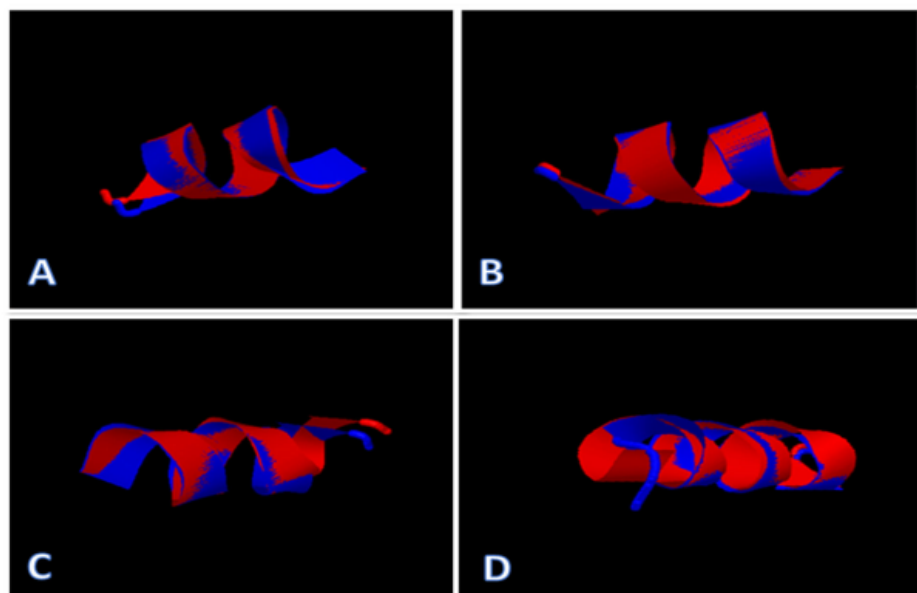
Computational prediction of MHC class II epitopes is of considerable theoretical and practical value because

Table 5. Prediction of IL4 and IFN- γ induction capacity for each peptide.

Homologous sequences	Alleles that predispose to type 1 diabetes	Peptides epitopes	Epitopes scores introduced for prediction	Method and score for IL4 prediction	Prediction	Methods and score for IFN- γ prediction	Prediction
IA2pep1 30 RLAKWQALCAVQAEPNTC 48	HLA DRB1*04:08 HLA DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA DRB1*04:04 HLA DRB1*04:02	RLAKWQALCAVQAEPNTC	RLAKWQALCAVQAEPNTC	SVM 0.26	IL4 inducer	svm 0.05	+
ES4pep1 371 RLAKYEATLECCAKNDPHAC 392	HLA DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA DQA1*03:01/DQB1*03:02	RLAKYEATLECCAKNDPHAC	RLAKYEATLECCAKNDPHAC	Svm 0.23	IL4 inducer	svm 0.36	-
IA2pep2seq1 274 LVRSKDDQFEFALTAVAEVNAIKALP 300	HLA DRB1*04:08 HLA DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA DRB1*04:03 HLA DRB1*04:04 HLA DQA1*05:01/DQB1*02:01	LVRSKDDQFEFALTAVAEVNAIKALP	RSKDDQFEFALTAVAEVNAIKALP	SVM 0.47	IL4 inducer	SVM 1.08	-
BL5pep1seq1 138 LVRTPEVDDEALEKFDKALKALP 160	HLA DRB1*03:01 HLA DQA1*03:01/DQB1*03:02 HLA DQA1*05:01/DQB1*02:01	LVRTPEVDDEALEKFDKALKALP	VRTPEVDDEALEKFDKALKALP	SVM 0.33	IL4 inducer	MERC1 1	+
IA2pep2seq2 274 LVRSKDDQFEFALTAVAEVNAIKALP 300	HLA DRB1*04:03 HLA DRB1*04:05 HLA DQA1*05:01/DQB1*02:01	LVRSKDDQFEFALTAVAEVNAIKALP	EFALTAVAEVNAIKALP	SVM 0.36	IL4 inducer	MERC1 1	-
BL5pep1seq2 138 LVRTPEVDDEALEKFDKALKALP 160	HLA DRB1*03:01 HLA DRB1*04:05	LVRTPEVDDEALEKFDKALKALP	VRTPEVDDEALEKFDKALKALP	SVM 0.33	IL4 inducer	MERC1 1	+
GA065pep1 239 FSPGGAGNMYAMIMIRKMFPEV MAALPRLIAFT 277	HLA DRB1*04:05	FSPGGAGNMYAMIMIRKMFPEV KENGMAALPRLIAFT	IARFKMFPEVKMGIM KENGMAALPRLIAFT	SVM 0.06	Non IL4 inducer	SVM 0.09	+
ES4pep2 17 YSRGVFRRDTHKSEIARFKDLGEE VLWES 52	HLA DRB1*04:05 HLA DRB1*04:08 HLA DRB1*04:01	YSRGVFRRDTHKSEIARFKDLGEE HFKGLVLIWES	DLGEEHFKGLVLIWES	SVM 0.29	IL4 inducer	SVM 0.21	+

Table 6. The comparison of predicted structural similarity among the peptides selected from cow's milk proteins and self antigens.

Homologous peptides	Aligned residues	RMSD	TM score of chain 1	TM score of chain 2	Figures
IA2pep1 RLAKEWQALCAVQAE	RLAKEWQAL : : : : : : : : RLAKEYEAT	0.39	0.72169	0.72169	Figure 1 (A)
BSApep1 RLAKEYEATLECCCA					
IA2pep2seq1 RSKDQFEFALTAVAE	DQPEPALDAV : : : : : : : : EKFDKALKAL	0.32	0.72657	0.72657	Figure 1 (B)
BLGpep1seq1 VRTPEVDDEALEKFD					
IA2pep2seq2 EFALTAVAEVNAIL	EEVNAILKAL : : : : : : : : ERLEKFDKAL	0.55	0.58479	0.58479	Figure 1 (C)
BLGpep1seq2 VRTPEVDDEALEKFD					
GAD65pep1 IARFKMFPEVKEKGM	R P - K M P P E V K E K G M A : : : : : : : : : : : : : : - R P K D L G E E R P K G L V	0.74	0.51687	0.51687	Figure 1 (D)
BSApep1 DLGEEHFKGLVLIAF					

**Figure 1.** Superposition peptides epitopes two by two by TM align: (in blue): self antigens; (in red): cow's milk proteins. (A) Superposition of epitopes IA2pep1 and BSApep1 (couple 1). (B) Superposition of epitopes IA2pep2seq1 and BLGpep1seq1 (couple 2). (C) Superposition of epitopes IA2pep2seq2 and BLGpep1seq2 (couple 3). (D) Superposition of epitopes GAD65pep1 and BSApep2 (couple 4).

experimental detection is expensive and time-consuming (Sylvester-Hvid et al., 2002; Wang et al., 2008).

MHC class II genes contribute to 40% of T1DM manifestation (Pociot & Lernmark, 2016). In humans, particularly high risk is found in heterozygous subjects associating in Trans the HLA DR3/ DR4 haplotypes. In the current study, the epitopes were identified and their sequences and structural homology remain the best binding to HLA class II molecules DR3 (DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01) and DR4 (DRB1*04:01/02/04/05/08-DQA1*03:01-DQB1*03:02/04) which are alleles of genetic predisposition to T1DM. In addition our genetic study confirmed the susceptibility part of this alleles (89.80%) in diabetics compared to (51.96%) in controls.

However, these epitopes did not bind to the haplotype DRB1 * 15: 01-DQ A1 * 01: 02-DQB1 * 06: 02 (DR2) that protect for T1DM in the Caucasian population (Noble & Valdes, 2011). The study of Krokowski et al. (1995) has reported that antibodies to BSA are present in adult-onset T1DM patients, particularly in HLA-DR3-positive patients (Krokowski et al., 1995).

The presentation of exogenous antigens by MHC class II to CD4+ T cells leads to the secretion of the pattern of cytokines. Depending upon the cytokines secreted, the T helper cells differentiate into diverse T-cell populations: Th1, Th2, Th17 or Tregs (Gutcher & Becher, 2007). In this study, we demonstrate that these cross-reactive epitopes have the capacity to induce an immune reaction by inducing the

differentiation of Th0 to Th1 by the secretion of IFN or to Th2 by the secretion of IL4.

5. Conclusion

The early introduction of cow's milk proteins such as bovine serum albumin and beta-lactoglobulin in individuals with a genotype HLA DR3 and or DR4 (72.44%) are considered as risk factors related to the pathogenesis of T1DM. This result is confirmed by *in silico* approach showing that BSA and BLG share sequence and structure homology with IA2 and GAD65. Subsequently responsible for the activation of auto-reactive T cells and the perpetuation of T1DM.

Breastfeeding must be encouraged and enhance its duration more than 9 months is essential. Also, recommend late introduction of cow's milk and dairy-based foods. In addition, recommend milks with hydrolyzed formula eliminate the exposure to immune-modulatory cow proteins in genetically predisposed children.

Finally, identification of triggers of autoimmunity based on sequence and 3D structural information's in a genetic predisposing individuals could be used in the development of new therapies for type 1 diabetes suggesting the influence of cow's milk proteins on the incidence of this pathology.

Acknowledgement

We wish to thank the co authors for their collaboration.

Conflict of interest

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

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship and/or publication of this article.

Ethical approval

People's Democratic Republic of Algeria Ministry of Higher Education and Scientific Research University Abaubekr Belkaid, Tlemcen Faculty of Sciences of Nature and Life and Science of the Earth and the Universe

Authorization of the ethics committee

Within the framework of a doctoral training, domiciled within of the Faculty of Sciences of Nature and Life and Science of the Earth and the Universe, University of Tlemcen the department of Biology.

Majda DaliSahi and the Nouria Dennaoui Medjati, respectively, responsible and member of the Doctoral Training 'Molecular Biology'; have jointly filed with the council of ethics and professional conduct University of Tlemcen; A project of research entitled 'Modulating effects of heredity and environmental risk factors on diabetes (type 1 and type 2) in populations of the far west of Algeria'. And to have his agreement concerning the ethics aspect and deontological of the project and to recommend this last to the concerned services of University Hospital Center of Tlemcen. Having inquired of the two project managers

regarding compliance with the rules of ethics and professional conduct which will govern the various stages of carrying out this research, the members of CEDUT, also convinced of the scientific interest of such a study, have obtained the necessary clarifications as to the meeting of the ethical and deontological conditions in the respect of which the data collection and the confidentiality of the results will be carried out.

Councils' member authorize the persons concerned, as well as all of their doctoral students, to carry out their research work and request the services concerned of the University Hospital Center of Tlemcen to provide their assistance in the proper realization of this work.

Consent form

People's Democratic Republic of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Tlemcen
Department of Biology

You are participating in a research project on risk of type 1 diabetes. As part of this project, a personal data collection is proposed. Personal data used only for scientific research purposes.

All information is kept in strictest confidence.

The information is not published, as well as the last name and first name.

After reading this information and being able to ask all the questions, I deemed useful to the doctor who follows me.

I agree to the collection of data in accordance with the purposes described above.

Patient and his parent:

First name:

Last name:

Date:

Signature:

An original signed copy of this consent form must be retained by the patient.

References

- American Diabetes Association. [2015]. Standards of medical care in diabetes. *Clinical Diabetes*, 33(2), 97-111.
- Cabinian, A., Sinsimer, D., Tang, M., Zumba, O., Mehta, H., Tama, A., Sant'Angela, D., Laouar, Y., & Laouar, A. [2016]. Transfer of maternal immune cells by breastfeeding: Maternal cytotoxic T lymphocytes present in breast milk localize in the Peyer's patches of the nursed infant. *PLoS One*, 11(6), e0156762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156762>
- Cacho, N. T., & Lawrence, R. M. [2017]. Innate immunity and breast milk. *Frontiers in Immunology*, 8, 584. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00584>
- Clayton, D. G. [2009]. Prediction and interaction in complex disease genetics: Experience in type 1 diabetes. *PLoS Genetics*, 5(7), e1000540. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000540>
- Cusick, M. F., Libbey, J. E., & Fujinami, R. S. [2012]. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 42(1), 102-111. <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8294-7>
- Dhanda, S. K., Gupta, S., Vir, P., & Raghava, G. P. [2013]. Prediction of IL4 inducing peptides. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013, 263952-263959. <https://doi.org/10.1155/2013/263952>
- Dhanda, S. K., Vir, P., & Raghava, G. P. [2013]. Designing of interferon gamma inducing MHC class II binders. *Biology Direct*, 8, 30. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-30>
- Dankor, E. S., Dayie, N. T., & Adiku, T. K. [2014]. Bioinformatics with basic local alignment search tool (BLAST) and fast alignment (FASTA). *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*, 6(1), 1-6. <https://doi.org/10.5897/IJBC2013.0086>

- Ghash, M. K., V., Nguyen, M. K., Muller, A., & Walker, A. M. (2016). Maternal milk T cells drive development of transgenerational Th1 immunity in offspring thymus. *The Journal of Immunology*, 197(16), 2290–2296. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502483>
- Goldfarb, M. F. (2008). Relation of time of introduction of cow milk protein to an infant and risk of type I diabetes mellitus. *Journal of Proteome Research*, 7(5), 2165–2167. <https://doi.org/10.1021/pr800041d>
- Gutcher, I., & Becher, B. (2007). APC derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1119–1127. <https://doi.org/10.1172/JCI31720>
- Halmberg, H., Wahlberg, J., Vaarala, O., & Ludvigsson, J. (2007). Short duration of breast feeding as a risk factor for b cell autoantibodies in 5 year-old children from the general population. *British Journal of Nutrition*, 97(1), 111–116. <https://doi.org/10.1017/S0007114507210189>
- Huang, X., & Miller, W. (1991). The align program implements the algorithm of Huang and Miller. *Advances in Applied Mathematics*, 12(3), 337–357. [https://doi.org/10.1016/0196-8858\(91\)90017-D](https://doi.org/10.1016/0196-8858(91)90017-D)
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Andersson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Kimpimäki, T., Erkkälä, M., Karhanen, S., Kupila, A., Virtanen, S. M., Ilonen, J., Simell, O., & Knap, M. (2001). Short term exclusive breastfeeding predisposes young children with increased genetic risk of Type 1 diabetes to progressive beta cell autoimmunity. *Diabetologia*, 44(1), 63–69. <https://doi.org/10.1007/s001250051581>
- Knap, M., & Simell, O. (2012). Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), a007690. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007690>
- Knap, M., Virtanen, S. M., Seppä, K., Ilonen, J., Savilahti, E., Vaarala, O., Reunanen, A., Teramo, K., Hämäläinen, A. M., Paronen, J., Dasch, H. M., Hakulinen, T., Akerblom, H. K., & Finnish TRIGR Study Group. (2010). Dietary intervention in infancy and later signs of beta cell autoimmunity. *The New England Journal of Medicine*, 363(20), 1900–1908. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal004809>
- Krakowski, M., Cailat-Zucman, S., Timsit, J., Larger, E., Pehuet-Figoni, M., Bach, J. F., & Baitard, C. (1995). Anti bovine serum albumin antibodies: Genetic heterogeneity and clinical relevance in adult onset IDDM. *Diabetes Care*, 18(2), 170–173. <https://doi.org/10.2337/diacare.18.2.170>
- Lamb, M. M., Miller, M., Seifert, J. A., Frederiksen, B., Kroehl, M., Rewers, M., & Narris, J. M. (2015). The effect of childhood cow's milk intake and HLA DR genotype on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Pediatric Diabetes*, 16(1), 31–38. <https://doi.org/10.1111/12115> <https://doi.org/10.1111/12115>
- Meziane, F. Z., Dali-Sahi, M., Dennaoui-Medjati, N., Baulenouar, H., Kachekauche, Y., Benslama, Y., & Harek, Y. (2020). Molecular mimicry between varicella, measles virus and Hsp60 in type 1 diabetes associated HLA DR3/DR4 molecules. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 14(6), 1783–1789. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.08.009>
- Nielsen, M., & Lund, O. (2009). NN-align: An artificial neural network based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics*, 10, 296. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-296>
- Noble, J. A., & Erlich, H. A. (2012). Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a007732. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007732>
- Noble, J. A., & Valdes, A. M. (2011). Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 11(6), 533–542. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0223-x>
- Pahari, S., Chatterjee, D., Negi, S., Kaur, J., Singh, B., & Agrewala, J. N. (2017). Morbid sequences suggest molecular mimicry between microbial peptides and self antigens: A possibility of inciting autoimmunity. *Frontiers in Microbiology*, 8(1938), 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01938>
- Pandit, S. H., & Skolnick, J. (2008). Fr-TM-align: A new protein structural alignment method based on fragment alignments and the TM score. *BMC Bioinformatics*, 9, 531. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-531>
- Persaud, D. R., & Barranca-Mendoza, A. (2004). Bovine serum albumin and insulin dependent diabetes mellitus; is cow's milk still a possible toxicological causative agent of diabetes? *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 42(5), 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.01.002>
- Pociat, F., & Lernmark, A. (2016). Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*, 387(10035), 2331–2339. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30582-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30582-7)
- Rosenbauer, J., Herzog, P., Kaiser, P., & Gianì, G. (2007). Early nutrition and risk of type 1 diabetes mellitus: A nationwide case-control study in preschool children. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 115(08), 502–508. <https://doi.org/10.1055/s2007-973829> <https://doi.org/10.1055/s2007-973829>
- Sanchez-Trincado, J. L., Gamez-Perasanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and methods for T and B cell epitope prediction. *Journal of Immunology Research*, 2017, 2680160. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>
- Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2014). Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(10), 4745–4758. <https://doi.org/10.1021/ct500592m>
- Sylvester-Hvid, C., Kristensen, N., Blicher, T., Ferré, H., Lauemøller, S. L., Wolf, X. A., Lambeth, K., Nissen, M. H., Pedersen, L. Q., & Buus, S. (2002). Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide-MHC class I interaction. *Tissue Antigens*, 59(4), 251–258. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2002.590402.x>
- Vaarala, O., Klemetti, P., Savilahti, E., Reijonen, H., Ilonen, J., & Akerblom, H. K. (1996). Cellular immune response to cow's milk beta lactoglobulin in patients with newly diagnosed IDDM. *Diabetes*, 45(2), 178–182. <https://doi.org/10.2337/diab.45.2.178>
- Virtanen, S. M., Lääri, E., Hyppönen, E., Reijonen, H., Räsänen, L., Ara, A., Knap, M., Ilonen, J., & Akerblom, H. K. (2000). Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: A nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes*, 49(6), 912–917. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.6.912>
- Wahlberg, J., Vaarala, O., Ludvigsson, J., & ABIS Study Group. (2006). Dietary risk factors for the emergence of type 1 diabetes related autoantibodies in 21/2 year-old Swedish children. *British Journal of Nutrition*, 95(3), 603–608. <https://doi.org/10.1079/B>
- Wang, P., Sidney, J., Daw, C., Mathé, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000048>
- 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, 568. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-568>
- Weires, M., Tausch, B., Haug, P., Edwards, C., Wetter, T., & Cannon-Albright, L. (2007). Cannon-Albright LA family of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 115(10), 634–640. <https://doi.org/10.1055/s2007-984443>

Partie 3 : Polymorphisme du VNTR du promoteur du gène de l'insuline

1. Introduction :

Le polymorphisme de l'INS-VNTR **rs689 (INS -23/Hph1 A>T)** est considéré comme un deuxième facteur de susceptibilité (IDDM2) pour le DT1 après les gènes HLA de classe II. Il se situe sur le chromosome 11 à 596 pb en amont du codon d'initiation de la traduction de l'allèle qui code pour l'insuline. Il est subdivisé en trois classes alléliques : les allèles courts de classe I constitués de 26-63 répétitions (allèles de susceptibilité), les allèles intermédiaires de classe II constitués d'environ 80 répétitions (quasiment absents chez les caucasiens) et les allèles longs de classe III qui sont de l'ordre de 141-209 répétitions (allèles protecteurs) (**Ramos-Lopez et al., 2008 ; Cervin et al., 2008**).

La variation génomique dans les régions régulatrices du gène de l'insuline a été associée à une susceptibilité accrue au diabète de type 1 et de type 2 (**Ong et al., 1999; Huxtable et al., 2000**).

Le VNTR est en déséquilibre de liaison avec le SNP rs689 (A/T) dont l'allèle VNTR de classe I est associé à l'auto-immunité et est lié à l'allèle A. De plus, les allèles VNTR de classe III sont associés à la protection contre l'auto-immunité et sont liés à l'allèle T (**Cimponeriu et al., 2010**).

Matériel et méthodes :

2.1. Les sources de données et recueil d'informations :

La collecte des données avait été effectuée par trois procédés majeurs afin de constituer notre population d'étude : le registre du diabète, le dossier médical et le questionnaire (**en annexe**).

Le souci de standardisation des questions et réponses a été pris de manière à pouvoir rendre les données comparables dans les différentes populations étudiées.

La recherche expérimentale ainsi que le suivi des diabétiques se sont déroulés à la clinique de Sidi Chaker de Tlemcen, à l'hôpital universitaire de Tlemcen, à l'hôpital de Maghnia, de Ghazaouet, et de Remchi (ne sont sélectionnés que les individus originaires de l'extrême ouest Algérien).

2.2. Echantillonnage et période d'étude

Il s'agit d'une étude épidémiogénétique de type analytique transversale (cas/témoins) réalisée sur une population de Tlemcen (extrême ouest Algérien) pour un échantillon total de 356 individus dont : 175 diabétiques de type 1 et 181 témoins.

Notre étude avait été réalisée au niveau du « laboratoire de Chimie Analytique et d'Electrochimie » au sein de l'université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen. L'étude s'est étalée sur une période de 4 ans, allant de 2017 à 2020.

2.3. Critères d'évaluation des patients :

Pour les diabétiques se présentant spontanément à la consultation, ce sont en général des patients connus des services qui se présentent pour des contrôles, approvisionnement en médicament, en carnet de surveillance ou pour des lettres d'orientations vers les autres spécialités (cardiologie, ophtalmologie, néphrologie et neurologie).

Le diagnostic a été posé par des médecins spécialistes selon les critères de l'American Diabetes Association (**ADA, 2016**). Les recommandations en matière de diagnostic, dépistage et classification du diabète, approuvées par la National Institute of Health (NIH) et par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sont :

- La présence des symptômes classiques d'hyperglycémie et d'une analyse de sang anormale.
- Une glycémie à jeun supérieur ou égale à 1,26 g/L (7,0 mmol/L).
- Une HbA1C supérieur ou égale à 6,5% (48 mmol/mol).
- Avoir débuté la maladie avant l'âge de 40 ans.

2.4. Critères d'évaluation des témoins

La majorité des sujets témoins été des volontaires invités à participer à l'étude en se rendant aux différents centres de recrutement. Ces individus étaient indemnes de toute pathologie. Le reste des témoins présentant spontanément à la consultation pour divers motifs : malaises, ou suspicions d'une maladie infectieuse ou virale et sont retenus comme tel si leur taux de glycémie à jeun est inférieur à **1,26 g/L** et s'ils n'avaient jamais reçu d'hypoglycémifiants.

2.5. Prélèvement sanguin :

Les prélèvements sanguins ont été effectués le matin après un jeûne d'au moins 8 heures au niveau de la veine du pli du coude à l'aide d'une seringue stérile. Pour cela, 2 à 5 ml de sang ont été prélevés chez chaque individu (sensibilisé et consentant) dans des tubes EDTA (Acide éthylène Tétracétique) et des Tubes héparines.

Les tubes EDTA ont été utilisés pour l'étude génétique (extraction de l'ADN).

La glycémie à jeun avait été déterminée par la technique enzymatique au glucose oxydase–peroxydase (Randox, Antrim, UK).

2.6. Analyses statistiques

Après avoir vérifié la normalité des paramètres étudiés, les résultats sont présentés par moyennes +/- écart types pour les variables quantitatives et en pourcentages pour les variables qualitatives. Les comparaisons entre les variables qualitatives sont réalisées à l'aide du chi-deux. Le test *t* de Student est utilisé quant à lui pour la comparaison entre les variables quantitatives.

Une régression logistique binaire est effectuée. Les odds ratio (OR) ainsi que l'intervalle de confiance à 95% (IC) sont calculés afin d'examiner les associations entre la variable réponse et les variables explicatives.

Pour les différents tests effectués, les résultats sont considérés significatifs à $p < 0,05$, très significatifs à $p < 0,01$ ou hautement significatifs à $p < 0,001$. Toutes les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Minitab version 18 ainsi que par Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 23.0.

2.7. Extraction de l'ADN à partir du sang total par la technique NaCl « Salting out »

La technique d'extraction d'acide désoxyribonucléique (ADN) par le chlorure de sodium (NaCl) (Miller et al., 1988) a été choisie car c'est une méthode simple, facile à réaliser, peu

couteuse et surtout qu'elle ne confère aucun risque de toxicité par des produits dangereux tel que la méthode du phénol-chloroforme (**voir protocole en annexe**).

Les solutions et tampons préparées pour l'extraction de l'ADN sont décrits en annexe (**Tableau A1**).

2.7.1 Dosage et contrôle 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.

- $[ADN]=DO\ 260*\text{facteur de dilution}*50ng.$

Afin de déterminer une éventuelle contamination par les protéines, la deuxième lecture est effectuée à une longueur d'onde de 280 nm. Une autre lecture de DO à 230 nm indique une contamination avec l'EDTA.

La pureté de l'ADN est identifiée comme suit :

Le rapport de DO 260nm/280nm est calculé. Cette valeur doit être comprise entre 1,5 et 2.

- Si elle est inférieure à 1,5 cela indique une contamination par **les protéines**.
- Si elle est supérieure à 2 cela indique une contamination par **les sels**.

2.8. Étude du polymorphisme (rs689) du VNTR du promoteur du gène de l'insuline (INS - 23/Hph1 A>T).

Le génotypage du SNP **rs689 (INS -23/Hph1 A>T)** avait été réalisé par la technique de biologie moléculaire nommée la méthode de TaqMan qui permet un criblage rapide du SNP d'intérêt (**Figure 1**).

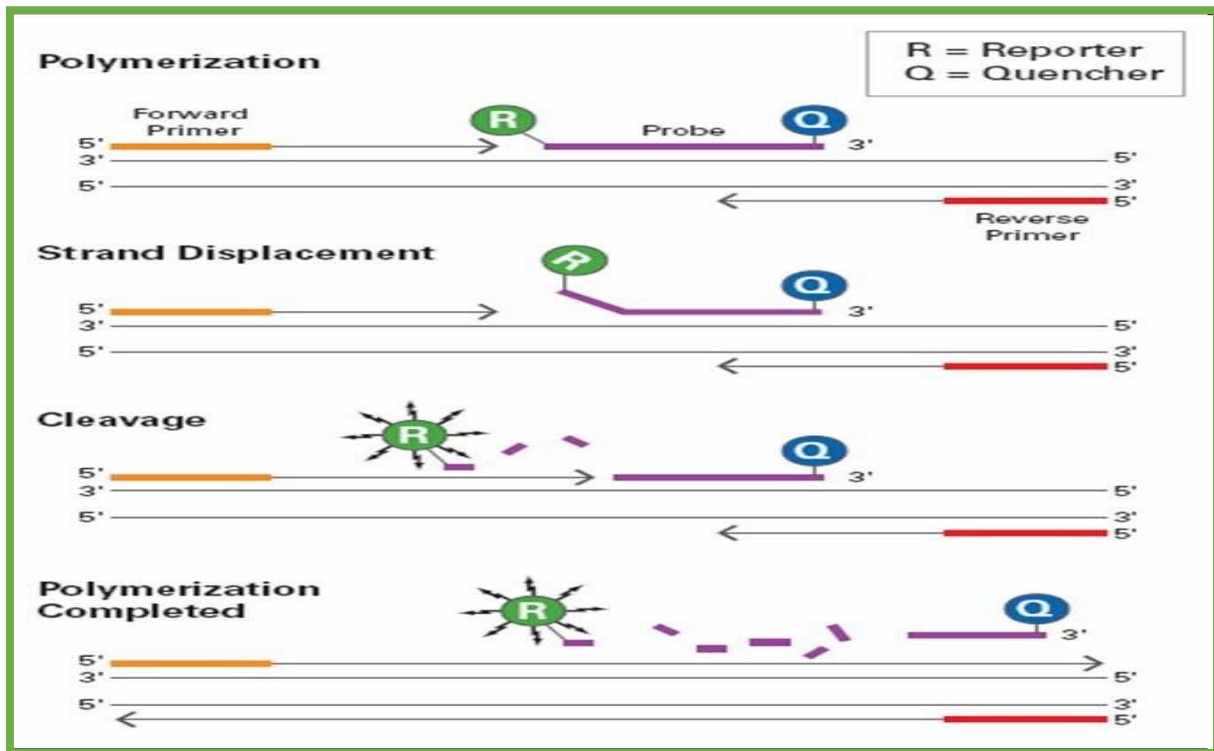


Figure 1. Principe de la méthode de génotypage par sondes Taqman (Applied Biosystems).

2.8.1. Principe de la méthode :

Le test de génotypage du SNP TaqMan est également appelé "le test de discrimination allélique 5' nucléases" et nécessite des amorces de Polymerase Chain Reaction (PCR) directe et inverse, ainsi que deux sondes TaqMan marquées différemment par fluorescence pour la discrimination allélique. Une sonde complémentaire de l'allèle 1 marquée en 5' par le fluorophore FAM (495 nm et 515 nm / excitation et émission) et une sonde complémentaire de l'allèle 2 marquée en 5' par le fluorophore VIC (535 nm et 555 nm / excitation et émission). La présence de sondes spécifiques aux allèles garantit une grande sensibilité, offrant ainsi des avantages appréciables en termes de gain de temps et de travail.

Cette technique a été réalisée sur des plaques de 384 puits avec le thermocycleur Biorad CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 3 µl : 1 µl de Master Mix (Applied Biosystem), 0,0375 µl de sondes (Applied Biosystem), 1 µl d'ADN à une concentration de 5 ng/µl et complété avec de l'eau.

Le programme de PCR était : 92°C-10 sec + (92°C-15 sec +60°C-60 sec) x (50 cycles) + lecture plaque. Les génotypes sont assignés à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.1 en fonction de la fluorescence pour chaque allèle.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel MINITAB/version 18.

Les résultats sont présentés en valeurs absolues et en pourcentages pour les variables qualitatives (test Khi-2) et par moyennes +/- écart types pour les variables quantitatives (test t de student). Le seuil de significativité étant fixé à P= 0,05.

3. Résultats de l'étude génétique du polymorphisme rs689 (INS -23/Hph1 A>T) :

Il s'agit d'une étude portée sur un échantillon total de 356 individus dont : 175 diabétiques de type 1 et 181 témoins. Avec une légère prédominance féminine pour les deux sous-groupes.

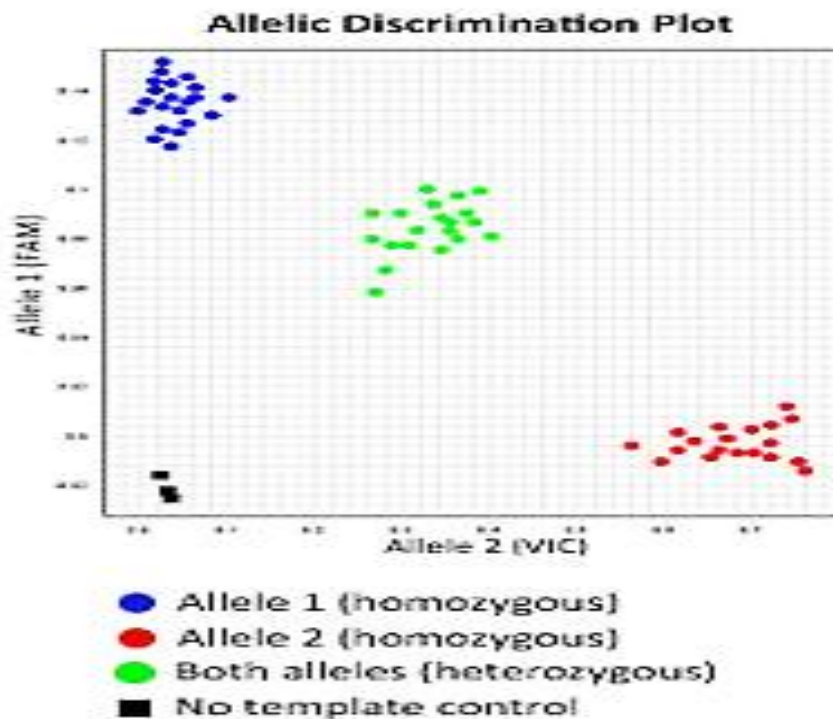


Figure 2. Résultats du génotypage par sondes Taqman du SNP d'intérêt rs689.

Les diagrammes de dispersion avec les axes x et y représentent la discrimination des allèles des génotypes. Les points bleus et rouges représentent les allèles homozygotes (AA) et (TT), et les points verts les allèles hétérozygotes (AT).

La distribution des allèles et des génotypes du polymorphisme **INS-VNTR (-23 Hph I A/T) (rs689)** pour les diabétiques et les non diabétiques sont présentées dans le **tableau 1**.

La fréquence de l'allèle A chez les diabétiques est similaire à celle retrouvée chez les témoins (28%) de plus la distribution de l'allèle A dans la population diabétique et témoins représente presque le tiers par rapport à l'allèle T (72%). Aucune différence significative n'a été observée $P=0,979$.

Concernant la distribution génotypique du polymorphisme **INS-VNTR (-23 Hph I A/T) (rs689)**, nous avons 3 formes génotypiques différentes : l'homozygote **AA**, l'homozygote **TT** et l'hétérozygote **AT**. Les fréquences génotypiques sont distribuées de façon presque similaire entre les cas et les témoins : les homozygotes AA et TT sont un peu élevés chez les diabétiques par rapport aux témoins avec (9% contre 4%) pour le génotype AA et (65% contre 64%) pour le génotype T. Tandis que l'hétérozygote AT est moins représenté chez les diabétiques par rapport aux non-diabétiques avec (26% contre 32%). Cependant il n'existe aucune différence significative entre les deux groupes avec $P= 0,122$ (**Tableau 1**).

Ceci indique qu'il n'y a pas de distorsion entre le polymorphisme **INS-VNTR (-23 Hph I A/T) (rs689)** et le DT1 dans notre population.

Tableau 1. Distribution des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme **INS-VNTR (-23 Hph I A/T) (rs689)**.

		<i>Cas</i>	<i>Témoins</i>	<i>P-value</i>
<i>Les allèles</i>	A	61 (28%)	66 (28%)	0,979
	T	159 (72%)	173 (72%)	
<i>Les génotypes</i>	AA	16 (9%)	8 (4%)	0,122
	AT	45 (26%)	58 (32%)	
	TT	114 (65%)	115 (64%)	

3.1. Association du polymorphisme INS-VNTR (-23/Hph I A/T) (rs689) aux différents facteurs environnementaux :

Le **tableau 2** montre qu'il existe une différence significative entre les cas et les témoins par rapport à la présence du génotype homozygote AA pour le facteur consanguinité de premier degré représentant (12,5%) chez les cas contre (88%) chez les témoins avec une p-value très significative **P=0,009**.

Les autres paramètres à savoir le type d'allaitement, l'AAJ en Mg, la consanguinité (2^{ème} degré), le sexe, l'hérédité et le gradient géographique ne sont pas différents entre les 2 groupes avec des P-value nettement supérieur à 0,05%.

Tableau 2. Résultats du test khi2 en fonction de la présence du polymorphisme génotypique homozygote AA.

<i>AA</i>		<i>Cas</i> (<i>N=16</i>)	<i>Témoins</i> (<i>N=8</i>)	<i>p-value</i>
<i>Type d'allaitement</i>	Maternel	4 (25%)	6 (75%)	0,326
	Artificiel	4 (25%)	1 (12,5%)	
	Mixte	8 (50%)	1 (12,5%)	
<i>AAJ en Mg</i>	Normal	0 (0%)	3 (38%)	0,152
	Carence	15 (94%)	4 (50%)	
	Excès	1 (6%)	1(12%)	
<i>Consanguinité</i>	Présence	6 (38%)	4 (50%)	0,614
	Absence	10 (62%)	4 (50%)	
<i>1^{er} degré de consanguinité</i>	Présence	2 (12,5%)	7 (88%)	0,009
	Absence	14 (87,5%)	1 (12%)	
<i>2^{em} degré de consanguinité</i>	Présence	4 (25%)	3 (38%)	0,510
	Absence	12 (75%)	5 (62%)	
<i>Sexe</i>	F	11 (68,75%)	3 (38%)	0,263
	M	5 (31,25%)	5 (62%)	
<i>Hérédité</i>	Présence	4 (25%)	1 (12%)	0,930
	Absence	12(75%)	7 (88%)	
<i>Gradient géographique</i>	Plaine	0 (0%)	0 (0%)	0,499
	Monts	16 (100%)	7 (88%)	
	Littoral	0 (0%)	1 (12%)	

Concernant la présence du génotype AT, la consanguinité est plus élevée chez les témoins que chez les cas (59% vs 27%). Nous remarquons que les témoins présentent 24% de mariage

consanguin de cousin germain de 1^{er} degré par rapport aux cas qui ne présentent que 7%. La différence entre les deux groupes est très significative avec P=0,001 et P=0,018 respectivement (**Tableau 3**).

Les autres paramètres à savoir le type d'allaitement, l'AAJ en Mg, le 2^{em} degré de consanguinité, le sexe, l'hérédité et le gradient géographique ne sont pas différents entre les deux groupes avec des P-value nettement supérieur à 0,05%.

Tableau 3. Résultats du test khi 2 en fonction de la présence du polymorphisme génotypique hétérozygote AT

<i>AT</i>		<i>Cas</i> (N=45)	<i>Témoins</i> (N=58)	<i>P-value</i>
<i>Type d'allaitement</i>	Maternel	9 (20%)	7 (12%)	0,083
	Artificiel	13 (29%)	9 (16%)	
	Mixte	23 (51%)	42 (72%)	
<i>AAJ en Mg</i>	Normal	2 (5%)	10 (17%)	0,390
	Carence	38 (84%)	42 (72%)	
	Excès	5 (11%)	6 (10,34%)	
<i>Consanguinité</i>	Présence	12 (27%)	34 (59%)	0,001
	Absence	33(73%)	24 (41%)	
<i>1^{er} degré de consanguinité</i>	Présence	3 (7%)	14 (24%)	0,018
	Absence	42 (93%)	44 (76%)	
<i>2em degré de consanguinité</i>	Présence	9 (20%)	14 (24%)	0,617
	Absence	36 (80%)	44 (76%)	
<i>Sexe</i>	F	20 (44%)	41 (71%)	0,07
	M	25 (56%)	17 (29%)	
<i>Hérédité</i>	Présence	8 (18%)	18 (31%)	0,124
	Absence	37 (82%)	40 (69%)	
<i>Gradient géographique</i>	Plaine	1 (2%)	7 (12%)	0,058
	Monts	41 (91%)	42 (72%)	
	Littoral	3 (6%)	9 (16%)	

Concernant la présence du génotype homozygote TT, on remarque que pour le type d'allaitement à savoir maternel, artificiel ou mixte, l'allaitement artificiel est plus représenté chez les diabétiques que chez les non-diabétiques (37% vs 23% respectivement ; **P=0,012**). De plus

l'AAJ en Mg est différents entre les cas et les témoins puisque plus de 80% des individus diabétiques présentent une carence en Mg contre 50% des témoins avec une P-value hautement significative (**P=0,0001**) (**Tableau 4**).

Pour ce qui est du gradient géographique, 90% des diabétiques porteurs de l'homozygote TT sont originaires des monts de Tlemcen contre 79% chez les non-diabétiques. Cette différence est très significative avec P=0,05.

Les autres paramètres à savoir la consanguinité, le sexe et les antécédents familiaux du diabète ne sont pas différents entre les deux groupes avec des P-value nettement supérieur à 0,05%.

Tableau 4. Résultats du test khi 2 en fonction de la présence du polymorphisme génotypique homozygote TT.

<i>TT</i>		<i>Cas (N=114)</i>	<i>Témoins (N=115)</i>	<i>p-value</i>
<i>Type d'allaitement</i>	Maternel	30 (26%)	25 (22%)	0,012
	Artificiel	42 (37%)	26 (23%)	
	Mixte	42 (37%)	64 (56%)	
<i>AAJ en Mg</i>	Normal	7 (6%)	28 (24%)	0,0001
	Carence	93 (82%)	58 (50%)	
	Excès	14 (12%)	29 (26%)	
<i>Consanguinité</i>	Présence	42 (37%)	42 (37%)	0,96
	Absence	72 (63%)	73 (63%)	
<i>1^{er} degré de consanguinité</i>	Présence	21 (18%)	22 (19%)	0,891
	Absence	93 (82%)	93 (81%)	
<i>2^{em} degré de consanguinité</i>	Présence	21 (18%)	20 (17%)	0,839
	Absence	93 (82%)	95 (83%)	
<i>Sexe</i>	Féminin	65 (57%)	64 (56%)	0,835
	Masculin	49 (43%)	51 (44%)	
<i>Antécédents familiaux au diabète</i>	Présence	36 (32%)	42 (37%)	0,43
	Absence	78 (68%)	73 (63%)	
<i>Gradient géographique</i>	Plaine	5 (4%)	8 (7%)	0,05
	Monts	103 (90%)	91 (79%)	
	Littoral	6 (6%)	16 (13%)	

3.2 Association entre le polymorphisme INS-VNTR et le polymorphisme HLA DR :

Le polymorphisme HLA DR est subdivisé en 3 groupes selon sa contribution à la susceptibilité au diabète de type 1 : groupe 1 ; HLA DR de **risque élevé** (DR3/DR4) ; groupe 2 ; HLA DR de **risque modéré** (DR3/DR3 ; DR4/DR4 ; DR3/DRX et DR4/DRX) et groupe 3 HLA DR X/X de **risque faible** (Portuesi et al., 2013).

Le **tableau 5** montre qu'il existe une association significative dans la distribution génotypique du VNTR selon le polymorphisme HLA DR. Les individus porteurs du génotype **AA** représentent le pourcentage le moins faible du polymorphisme **INS-VNTR** associé au polymorphisme **HLA DR**, dont le pourcentage le plus élevé se retrouve au niveau du HLA DR4/DR4 (18%).

Le génotype **AT** est absent au niveau du polymorphisme HLA DR4/DR4 et le génotype **AA** est absent au niveau du polymorphisme HLA DR4/X. Tandis que tous les génotypes HLA DR sont significativement associés au génotype **TT** du VNTR de l'insuline (jusqu'à 82% concernant le polymorphisme HLA DR4/DR4) avec **P=0,016**.

Tableau 5. Distribution des génotypes du polymorphisme INS-VNTR selon le polymorphisme HLA DR chez la population totale.

<i>INS-VNTR vs HLA DR</i> (totale)	AA (n=22)	AT (n=100)	TT (n=209)	p-value
<i>HLA XX</i>	12 (8%)	57 (38%)	81 (54%)	0,016
<i>HLA DR3/DR3</i>	3 (13%)	8 (33%)	13 (54%)	
<i>HLA DR4/DR4</i>	2 (18%)	0	9 (82%)	
<i>HLA DR3/DR4</i>	1 (3%)	13 (38%)	20 (59%)	
<i>HLA DR3/X</i>	4 (5%)	13 (16%)	63 (79%)	
<i>HLA DR4/X</i>	0	9 (28%)	23 (72%)	

Dans la population des diabétiques, on remarque que le génotype AA représente le pourcentage le plus faible du polymorphisme INS-VNTR selon sa distribution au niveau du polymorphisme HLA DR. Ce génotype est absent au niveau du polymorphisme HLA DR4-DR4 alors que le génotype TT de l'INS-VNTR représente le pourcentage le plus élevé en comparaison avec les autres génotypes. Cependant la différence entre les groupes n'est pas significative P=0,261 (tableau 6).

Tableau 6. Distribution des génotypes du VNTR selon le polymorphisme HLA DR chez les diabétiques.

<i>INS-VNTR vs HLA DR</i> <i>(diabétiques)</i>	AA (n=15)	AT (n=43)	TT (n=99)	p-value
<i>HLA X/X</i>	10 (15%)	23 (36%)	32 (49%)	0,261
<i>HLA DR3/DR3</i>	3 (21%)	5 (36%)	6 (43%)	
<i>HLA DR4/DR4</i>	0	0	6 (100%)	
<i>HLA DR3/DR4</i>	1 (5%)	8 (38%)	12 (57%)	
<i>HLA DR3/X</i>	1 (3%)	5 (13%)	32 (84%)	
<i>HLA DR4/X</i>	0	2 (15%)	11 (85%)	

Quant à la population des témoins, la distribution du génotype AA du polymorphisme reste toujours la plus faible avec absence chez les individus porteurs du HLA DR3 DR4 et HLA DR3 DR3, HLA DR3 DR4 et HLA DR4 X.

En revanche, le génotype TT de l'INS-VNTR distribué selon le polymorphisme **HLA DR** présente le pourcentage génotypique le plus élevé (jusqu'à 71 % pour le polymorphisme HLA DR3-DRX). Cependant la différence n'est pas significative P=0,119 (tableau 7).

Tableau 7. Distribution des génotypes du VNTR selon le polymorphisme HLA DR chez les témoins.

INS-VNTR vs HLA (témoins)	AA (n=7)	AT (n=58)	TT (n=109)	P-value
HLA X X	2 (2%)	34 (40%)	49 (58%)	0,119
HLA DR3 DR3	0	3 (30%)	7 (70%)	
HLA DR4 DR4	2 (40%)	0	3 (60%)	
HLA DR3 DR4	0	5 (38%)	8 (62%)	
HLA DR3 X	3 (7%)	9 (22%)	30 (71%)	
HLA DR4 X	0	7 (37%)	12 (63%)	

3.3 Résultats de l'étude du modèle de la régression logistique binaire :

Nous avons effectué une régression logistique binaire dans le but de corréler les génotypes et les facteurs sous-jacent associés au diabète de type 1 (**tableau 8**).

Les facteurs retenus par ce modèle sont : le polymorphisme du génotype du VNTR de l'insuline et le polymorphisme du HLA DR. Le génotype AT exerce un effet protecteur déterminé par la présence de l'allèle A contre la susceptibilité au DT1 (**Z= -2,17; OR=0,33 ; IC=0,12-0,90 ; P=0,030**). De plus, le polymorphisme HLA DR3-DR4 constitue un facteur de risque pour le DT1 dans notre population avec un risque multiplié par 2 (**OR=2,22 ; IC=1,03-4,80 ; P=0,042**).

Tableau 8. Résultats de l'étude du modèle de régression logistique binaire (diabétique ou non) en fonction des polymorphismes INS-VNTR et HLA DR.

Prédicteurs	Z	P-value	OR	IC 95%
Constante	1,30	0,195		
Polymorphisme INS-VNTR				
AT	-2,17	0,030	0,33	[0,12-0,90]
TT	-1,77	0,070	0,42	[0,16-1,10]
Polymorphisme HLA DR				
HLA DR3/X	0,33	0,744	1,09	[0,66-1,81]
HLA DR4/X	1,24	0,214	1,61	[0,76-3,44]
HLA DR3/DR4	2,04	0,042	2,22	[1,03-4,80]

Pour les capacités prévisionnelles de notre modèle. On note un bon pourcentage de paires concordantes (52,2%). Le D de Somers, le Gamma de Goodman-Kruskal et Tau-a de Kendall sont des résumés du tableau des paires concordantes et discordantes. Les valeurs les plus élevées indiquent que le modèle a de moyennes capacités de prévision. Dans notre cas les deux premières mesures valant 0,21 et 0,26 impliquent une faible capacité de prévision. Le Tau a de Kendall donne une capacité de prévision basse qui est de 0,11 (**Tableau 9**).

Tableau 9. Mesures d'associations entre la variable de réponse et les prévisions de probabilité.

Paires	nombre	pourcentage	Mesures récapitulatives	
Concordant	14262	52,2	D de Somers	0,21
Discordant	8462	31,0	Gamma de Goodman-Kruskal	0,26
Ex aequo	4594	16,8	Tau a de Kendall	0,11
Total	27318	100,0		

4. Discussion :

Les variations génétiques en amont du locus de l'insuline (INS) contribuent à ~10% du risque héréditaire du DT1 (**Wang, 2020**).

Le polymorphisme (A/T) au sein du gène de l'insuline est en déséquilibre de liaison avec la région promotrice du VNTR de l'insuline et peut donc être utilisé comme marqueur pour ces variantes de gènes (**Ramos-Lopez et al., 2008**).

Notre étude indique que la fréquence de distribution des allèles et des génotypes de l'INS-VNTR (rs689) était presque similaire chez les sujets diabétiques et non-diabétiques. Cela suggère que le polymorphisme INS-VNTR ne présente pas de distorsion particulière avec la population diabétique et témoin.

Il apparaît que la consanguinité et son premier degrés est plus fréquente chez les témoins que chez les diabétiques chez les individus porteur d'au moins un allèle A avec des p-value hautement significatives (P=0,0001) pour les 2 paramètres.

Les effets néfastes de la consanguinité sont la conséquence de l'homozygotie des gènes nocifs. D'autre part, des effets bénéfiques de la consanguinité, pourraient être attendus chez ceux

qui sont homozygotes pour des gènes protecteurs récessifs et co-dominants (**Denic et Nicholls; 2007**).

De plus notre analyse indique que le gradient géographique déterminé par les monts de Tlemcen (l'altitude est comprise entre 800 et 1400m) chez les individus porteur du génotype homozygote TT prédispose au DT1 puisque 90% des diabétiques sont originaires des monts de Tlemcen avec p-value très significative ($P=0,05$).

Plusieurs études ont illustré l'existence d'un gradient latitudinal (gradient nord-sud) et altitudinal et une association positive avec le risque du DT1. L'étude menée par **Ball et al., (2014)**, indique que le risque de DT1 augmentait de 3,5 % pour chaque degré de latitude s'éloignant de l'équateur. Dans une autre étude similaire, l'incidence du DT1 augmente en moyenne de 3,3 % pour chaque degré de latitude au nord de l'équateur et augmente de 1,7 % pour chaque 1000 pieds d'altitude au-dessus du niveau de la mer (**McCullough ML et al., en 2021**).

Nos travaux indiquent que le génotype AT exerce un effet protecteur contre le DT1 au niveau de la population de l'extrême ouest algérien. La p-value était hautement significative entre les cas et les témoins avec $P=0,030$.

Quand le polymorphisme homozygote TT soit associé à d'autres facteurs explicatifs qui sont des éléments déclencheurs environnementaux comme l'allaitement artificiel, la carence en magnésium ainsi que le gradient géographique, il existe un risque de contracter un DT1 au niveau de notre population.

Nos résultats démontrent que les génotypes du VNTR de l'insuline déterminés par la présence de l'allèle A (**AT et AA**) sont moins représentés chez les individus qui présentent un génotype **HLA DR3-DR4** à haut risque que chez les individus présentant un risque modéré ou faible. Notre étude concorde avec les différentes études menées sur le gène HLA DR associées au polymorphisme de l'INS-VNTR (**Van Der Auwera et al., 1995; Walter et al., 2003; Portuesi et al., 2013**).

5. Conclusion :

L'étude du polymorphisme INS-VNTR indique qu'il n'existe pas de distorsion entre les cas et les témoins concernant sa distribution allélique.

De plus le modèle prédictif de la régression a montré un effet protecteur du génotype AT dans notre population et un effet de susceptibilité au DT1 concernant le polymorphisme du gène HLA DR3/DR4.

Références bibliographiques de la partie 3 :

B

Ball S J, Haynes A, Jacoby P, Pereira G, Miller LJ et *al.*, (2014) Spatial and temporal variation in type 1 diabetes incidence in Western Australia from 1991 to 2010: increased risk at higher latitudes and over time. *Health Place* 28, 194–204.

C

Cervin C, Lyssenko V, Bakhtadze E, Lindholm E, Nilsson P et *al.*, (2008) Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes*; 57:1433e7.

D

Denic S et Nicholls MG (2007) Genetic Benefits of Consanguinity Through Selection of Genotypes Protective Against Malaria. *Human Biology*, 79(2), 145–158.

H

Huxtable SJ, Saker PJ, Haddad L, Walker M, Frayling TM et *al.*, (2000) Analysis of parent–offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally transmitted class III variable number tandem repeat alleles. *Diabetes*; 49 126–130.

M

McCullough ML, Wan N, Pezzolesi MG, Collins TW, Grineski SE et *al.*, (2021) Type 1 Diabetes incidence among youth in Utah: A geographical analysis. *Soc Sci Med.*278:113952.

Miller S A, Dykes D D et Polesky H F (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.

O

Ong KKL, Phillips DI, Fall C, Poulton J, Bennett ST et *al.*, (1999) The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *Nature Genetics*: 21 262–263.

P

Portuesi R, Pozzilli P, Boehm B, Buzzetti R, Filippi S (2013) Assessment of Type 1 Diabetes Risk Conferred by HLADRB1, INS-VNTR and PTPN22 Genes Using the Bayesian Network Approach. PLOS ONE . 8 (11) e79506.

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Zalcberg LJ, Bartlett RJ et al., (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. Nature Genetics 15 293–297.

R

Ramos-Lopez E, Lange B, Kahles H, Willenberg H S, Meyer G et al., (2008) Insulin gene polymorphisms in type 1 diabetes, Addison's disease and the polyglandular autoimmune syndrome type II. BMC medical genetics, 9(1), 65.

V

Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R et al., (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. Nature Genetics 15 289– 292.

Van Der Auwera B, Schuit F, Lyaruu I, Falorni A, Svanholm S et al., (1995) Genetic susceptibility for insulin-dependent diabetes mellitus in Caucasians revisited: the importance of diabetes registries in disclosing interactions between HLA-DQ- and insulin gene-linked risk. Belgian Diabetes Registry. J Clin Endocrinol Metab 80:2567–2573.

W

Walter M, Albert E, Conrad M, Keller E, Hummel M et al., (2003) IDDM2/ insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of type 1 diabetes and associated autoimmunity. Diabetologia 46:712–720.

Wang S (2020) Effects of rs3842753 on insulin expression in single beta cells (T). University of British Columbia.

Z

Zhang N, Huang W, Dong F, Liu Y, Zhang B et al., (2015) Insulin gene VNTR polymorphisms–2221MspI and–23HphI are associated with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: a meta-analysis. *Acta diabetologica*, 52(6), 1143-1155.

Discussion générale

Le but principal de cette thèse est de mettre en évidence la part de la génétique dans l'inauguration du DT1. C'est pourquoi, la caractérisation épidémio-génétique est une étape requise pour l'identification des futurs patients dans le but de tester les stratégies de prévention. La susceptibilité au DT1 comporte une forte composante génétique, le risque le plus important étant attribuable aux gènes qui codent les antigènes classiques des leucocytes humains (HLA). Le deuxième gène de susceptibilité au DT1 était celui du polymorphisme INS-VNTR déterminé par le VNTR de classe I de susceptibilité (allèle A) et le VNTR de classe III de protection (allèle T) (**Noble, 2015**).

Le gène INS-VNTR est très polymorphe avec environ 20 haplotypes connus chez les caucasiens. Seize études, incluant 14 359 cas et 20 376 témoins, ont exploré l'association entre le polymorphisme -23HphI A>T (rs689) de l'INS-VNTR avec le DT1 (**Zhang et al., 2015**). A cette constatation inquiétante, cette étude a été conçue pour définir les fréquences alléliques et génotypiques du SNP -23 HphI A>T (rs689) et son association avec le DT1 chez les enfants diabétiques et non diabétiques dans la population de l'extrême ouest algérien.

Des études de population ont montré que les allèles VNTR de classe III (allèle T) exercent un effet protecteur dominant et sont associés à une réduction de 60 à 70 % du risque de développer un DT1 (**Bennett et Todd, 1996 ; Cimponeriu et al., 2010**). Même en présence d'auto-anticorps et d'un génotype HLA à haut risque (HLA DR 3 et/ou DR4), les individus porteurs d'allèles VNTR de classe III présentent une réduction significative de la probabilité de développer la maladie (**Pugliese et al., 1995**).

Notre étude génétique révèle que la consanguinité et son premier degré est plus fréquente chez les témoins que chez les diabétiques chez les individus porteur d'au moins un allèle de susceptibilité A avec des p-value hautement significatives (concernant la consanguinité pour le génotype homozygote AA et la consanguinité et son premier degré chez les individus porteurs du génotype hétérozygote AT).

Dans notre population, les individus porteurs du génotype homozygote TT sont significativement associés au gradient géographique déterminé par la région des monts de Tlemcen, dont on cite majoritairement les régions de Sebdou et Sidi el Djillali avec une altitude de 800 à 1400 m et une latitude de 34,7°.

L'incidence du DT1 dans le monde a été liée aux facteurs climatiques, le gradient nord-sud a été rapporté comme facteur de susceptibilité chez les enfants diabétiques de type 1 (**Waernbaum et al., 2016**). Ceci pourrait être expliqué par l'altitude élevée, le faible nombre d'heures d'ensoleillement par jour, le climat froid et l'hiver. Les raisons de ces associations sont incomplètement comprises, mais un ensoleillement de faible durée et des températures basses pourraient influencer la synthèse de la vitamine D et la sensibilité à l'insuline (la régulation par le Mg) (**Waernbaum et Dahlquist, 2016 ; Chen et al., 2017; Qiu et al., 2022**).

De plus le gradient latitudinal augmente le risque de DT1 par degré au sud de l'équateur, selon la moyenne de l'intervalle 15-35° sud. Ce schéma est cohérent avec l'hypothèse de la carence en vitamine D à des latitudes plus élevées (**Ball et al., 2014**).

Nos travaux suggèrent que le génotype **AT** exerce un effet protecteur contre le DT1 au niveau de la population de l'extrême ouest algérien comparé au génotype **AA** de susceptibilité retrouvé dans les autres populations du monde.

Nos résultats ont démontré que l'allèle A exerce un effet protecteur et que c'est l'allèle T qui entraîne la susceptibilité au DT1. Ces deux allèles constituent un sous-typage indirect des allèles INS-VNTR de classe I et de classe III. Ceci rejoint les études menées par (**Peterson et al., 2010**) qui ont rapporté un risque multiplié par **2,44** de développer un DT1 associé à l'allèle T du polymorphisme INS-VNTR rs689 (**INS -23/Hph1 A>T**). Ce risque est multiplié par **2,56** pour ce même polymorphisme allélique au niveau de la population égyptienne (**Kamel et al., en 2019**). De plus d'autres études ont abouti à la même conclusion avec un risque multiplié par **4,5** associé au génotype TT homozygote (**Barratt et al., 2004**).

Dans notre population, l'hétérozygote à haut risque HLA DR3 DR4 du polymorphisme HLA DR de classe II s'avère réellement un facteur de risque pour le DT1 et les individus porteurs de ce génotype ont 2 fois plus de risque d'inaugurer un DT1 que les individus sains. Avec une p-value très significative **P=0,042**.

Un grand nombre de publications chez les Caucasiens ont confirmé que la combinaison hétérozygote de l'haplotype HLA-DR4 (DRB1*04:01/02/04/ 05/08 - DQA*03:01 - DQB1*03:02) et de l'haplotype HLA-DR3 (DRB1*03:01 - DQA1*05:01 - DQB1*- 02:01) conféraient le risque le plus élevé de DT1 (**Hermann et al., 2003 ; Cerna, 2008 ; Noble et Erlich, 2012; Kiani et al., 2015**), ce qui corroborent nos résultats.

L'apparition de la réaction auto-immune à l'origine du diabète de type 1 dépend de l'association de gènes de prédisposition et de facteurs démasquant. De ce fait, le rôle prépondérant des pratiques alimentaires ainsi que l'implication des troubles de l'homéostasie des micronutriments dans le développement et les complications du DT1, font l'objet de nombreuses études.

Ainsi, nous avons soulevé la part des pratiques alimentaires, déterminée par l'implication des micronutriments et par l'introduction précoce du lait de vache dans l'alimentation des nourrissons et l'influence de ces facteurs sur le développement du DT1.

A cet effet, en regard de l'importance du magnésium en tant qu'un minéral clé dans le contrôle glycémique, nous nous sommes intéressés à l'apport alimentaire journalier (AAJ) en Mg chez nos patients diabétiques. En effet, plusieurs investigations ont montré qu'un déficit en magnésium chez les enfants diabétiques augmente le risque du mauvais contrôle glycémique, ce qui est susceptible de développer plusieurs complications diabétiques (**Ozcaliskan et al., 2018**).

Le Mg joue un rôle important comme co-facteur de multiples réactions enzymatiques dans la régulation de l'homéostasie du glucose et l'action de l'insuline (**De Baaij et al., 2015**). Le Mg régule l'activité électrique et la sécrétion d'insuline dans la cellule bêta pancréatique. Ces concentrations intracellulaires sont critiques pour la phosphorylation du récepteur de l'insuline et d'autres kinases de signalisation en aval des cellules cibles. Par conséquent, une carence en Mg ²⁺ affecterait la sécrétion d'insuline indiquant ainsi que le magnésium est un amplificateur du signal de l'insuline (**Kostov, 2019; Gommers et al., 2019; Becker et al., 2021**).

Nos résultats ont montré que la population de diabétique présentait un AAJ inférieur à celui des témoins, la différence était significative. En outre cet apport est bien en dessous des recommandations de l'autorité européenne de la sécurité des aliments pour les enfants et adolescents (EFSA, 2017). Ceci risque d'exacerber le mauvais contrôle glycémique de ces patients diabétiques.

Le Mg empêche la coagulation du sang en réduisant l'agrégation plaquettaire, et il a un fort effet vasodilatateur (**Teragawa et al., 2002**). Ces propriétés font de lui un facteur important contre les complications micro et macro-angiopathiques (**Salhi et Ouahabi., 2021**).

La génomique nutritionnelle a explosé au cours de la dernière décennie, donnant un aperçu de la physiologie des interactions alimentaires avec nos gènes. Des centaines d'études sur les interactions dites SNP candidats et alimentation ont été entreprises, et les études sur les interactions

micronutriments-gènes ne font pas exception. Parmi ces micronutriments figure le magnésium (**Hruby et al., 2013**).

Notre étude a révélé que les apports faibles en magnésium chez les diabétiques sont présents chez les individus porteur du polymorphisme génotypique homozygote TT avec p-value hautement significative **P=0,0001**.

Plusieurs recherches se sont penchées sur les interactions génétiques possibles entre l'apport en magnésium et les loci qui pourraient être responsables d'une altération du métabolisme et de l'homéostasie du magnésium, ou d'une altération du métabolisme du glucose et de l'insuline (**Hruby et al., 2013**).

Un mécanisme par lequel le Mg peut agir dans les tissus périphériques est via son effet sur la tyrosine kinase, pour laquelle le magnésium joue le rôle d'un cofacteur. L'activation de la tyrosine kinase produit une cascade de signalisation qui transloque le GLUT4 vers la membrane et permet à la cellule d'intégrer le glucose (**Suárez et al., 1995**).

Bien que les mécanismes exacts des effets directs et indirects du magnésium sur la production et la sécrétion d'insuline soient inconnus, plusieurs voies ont été proposées. Premièrement, le rôle direct du magnésium en tant que cofacteur des ATPases affecte de nombreuses étapes de la voie glycolytique (**Chaudhary et al., 2010**).

Deuxièmement, le magnésium peut agir comme un inhibiteur du canal calcique activé par l'inositol 1,4,5-triphosphate (I3P). Dans le même ordre d'idées, il a été suggéré que la sécrétion de l'insuline est régulée par le rapport calcium-magnésium au niveau cellulaire (**Persaud et al., 1999**). Le magnésium peut donc agir comme un antagoniste du calcium (**Chaudhary et al., 2010**).

Une troisième voie proposée pour l'action du magnésium est son rôle dans l'activation de l'acétyl-coA carboxylase, qui catalyse finalement la formation d'acides gras à longue chaîne, qui jouent un rôle dans la sécrétion d'insuline (**Kowluru et al., 2001**).

Un quatrième mécanisme pourrait être lié à la régulation génomique de la transcription. Chez des rats obèses Zucker (animaux atteints de diabète de type 2 spontané) nourris avec un régime enrichi en magnésium pendant 6 semaines, à partir de l'âge de 6 semaines, on a observé des concentrations de glucose sanguin plus faibles à jeun, une meilleure élimination du glucose, des concentrations d'insuline et de peptide C plus élevées et une expression accrue des ARNm du GLUT2

pancréatique et de l'insuline par rapport aux animaux soumis au régime témoin (**Balon et al., 1995**). À l'âge de 12 semaines, les huit animaux témoins avaient tous développé un diabète, alors que le diabète n'était présent que chez un seul des huit animaux ayant reçu des suppléments de magnésium (**Balon et al., 1995**).

Une étude menée par Song et collaborateur indique qu'ils ont examiné pour la première fois 20 polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) de marquage d'haplotype dans TRPM6 et 5 SNP communs dans TRPM7 pour leur association avec le risque de diabète (**song et al., 2009**). Ils ont signalé que deux variants non synonymes communs de la région codante du TRPM6 - Val1393Ile dans l'exon 29 (rs3750425) et Lys1584Glu dans l'exon 30 (rs2274924) pourraient conférer une susceptibilité au diabète de type 2 chez les femmes ayant un faible apport en magnésium. Les femmes porteuses des deux allèles rares des rs3750425 et rs2274924 avaient près de cinq fois plus de chances de souffrir de diabète de type 2 que les femmes non porteuses, uniquement lorsque leur apport en magnésium était <250 mg/jour.

Les deux modifications d'acides aminés apportées par ces polymorphismes sont situées entre la région spiralée et la kinase, près de l'extrémité C-terminale, et pourraient réduire l'activité du canal TRPM6 en modifiant la conformation de la protéine.

Concernant la troisième partie, on a voulu évoqué l'implication de l'allaitement artificiel dans la pathogénèse du DT1, qui constitue une pratique alimentaire largement répandue dans la société moderne et donc une alternative pour l'allaitement maternelle.

Le modèle prédictif de nos analyses a révélé que dans notre population diabétique l'allaitement artificiel à base de protéines de lait de vache constitue un facteur de risque pour le DT1 avec un **OR= 4,79** et une p-value hautement significative (**P=0,006**). Nos résultats rejoignent ceux évoqués dans la littérature qui indiquent que les protéines du lait de vache peuvent accroître le risque de développer un DT1 chez des enfants génétiquement prédisposés **HLA DR3-DR4** en rendant leur système immunitaire très vulnérable.

L'introduction précoce du lait de vache dans l'alimentation du nourrisson induit une inflammation de la cellule bêta du fait d'épitopes croisés entre les protéines du lait de vache et les antigènes du soi (**Peng et Hagopian, 2006 ; Stuebe, 2007**).

De façon plus controversée, de nombreuses études épidémiologiques confirment l'effet protecteur de l'allaitement maternel contre des maladies non infectieuses dues à un

dysfonctionnement du système immunitaire, telles que le diabète de type 1 (**Malcova et al., 2006 ; Holmberg et al., 2007**).

L'étude de The Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR) a indiqué que le sevrage à une solution hydrolysée par rapport à une préparation conventionnelle à base de lait de vache réduit l'incidence cumulative des auto-anticorps associés au diabète et l'incidence du diabète chez les jeunes enfants dont l'un de ses parents est atteint de DT1 et présente un risque génétique HLA (**Pacaud et al., 2020**). C'est le cas de notre population d'étude qui est prédisposée génétiquement HLA DR3 DR4 (**Meziane et al., 2020**) ainsi que les résultats retrouvés par (**Lamb et al., 2015**).

La physiopathologie de nombreuses maladies auto-immunes peut être attribuée au mimétisme moléculaire. Ce dernier suppose qu'une homologie de séquence entre les peptides étrangers et les auto-peptides conduit à une activation croisée des cellules T autoréactives (**Susanta Pahari ; 2017**).

À la lumière des études statistiques retrouvées dans notre thèse, nous avons essayé d'apporter une explication quant à ce résultat grâce à une approche *in silico*. La présente étude a été menée pour explorer la possibilité que les protéines du lait de vache (BSA et BLG) partagent d'une part une homologie de séquence et de structure avec les protéines humaines (les auto-antigènes IA2 et GAD65) et provoquent d'autre part une réaction immunitaire ainsi des maladies auto-immunes en se liant aux molécules du CMH de classe II. Dans ce cadre, notre étude présente des preuves épidémiologiques, et bioinformatiques concernant ces protéines en tant que déclencheurs dominants du diabète de type 1.

Dans ce même modèle statistique, il apparaît que dans notre population d'étude les antécédents familiaux de diabète de type 1 et de type 2, semblent également être un facteur de risque pour le développement du DT1 avec respectivement (OR= 9,17 ; IC 95%= 2,85-29,54, p= 0,001) et (OR= 6,91 ; IC 95%= 2,51-19,08, p= 0, 001).

Il a été suggéré que le DT1 et le DT2 pourraient partager certains facteurs génétiques de susceptibilité. Le risque de diabète de type 1 est amplifié chez les enfants et les adolescents ayant des antécédents familiaux positifs de diabète. Une prévalence plus élevée du DT2 a été signalée dans les familles d'enfants caucasiens atteints de DT1 que dans la population générale, et spécialement dans

la population de l'extrême ouest algérien. Bien que les données concernant les adultes et les groupes multi-ethniques fassent encore défaut (**Barone et al., 2008; Dali-Sahi and Benmansour, 2014**).

Une étude menée par **Nyaga et al., en 2021** démontre l'existence de mécanismes de régulation génétique communs qui co-régulent les gènes qui ont des effets pléiotropiques sur le DT1 et le DT2. Prenant l'exemple du locus TCF7L2 ; une région de susceptibilité au DT2 bien connue ; qui joue un rôle majeur comme un centre de régulation clé qui module les niveaux de transcription des gènes impliqués dans la régulation immunitaire (**Nyaga et al., 2021**).

Références bibliographiques de la discussion générale :

B

Ball S, Haynes A, Jacoby P, Pereira G, Miller L, et al., (2014) Spatial and temporal variation in type 1 diabetes incidence in Western Australia from 1991 to 2010: Increased risk at higher latitudes and over time. *Health and Place*. 28: 194-204.

Barbagallo M, Dominguez LJ (2007) Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance. *Arch. Biochem. Biophys* ;458:40–47.

Balon TW, Gu JL, Tokuyama Y, Jasman AP, Nadler JL(1995) Magnesium supplementation reduces development of diabetes in a rat model of spontaneous NIDDM. *Am. J. Physiol.* 269:E745–E752.

Barone B, Rodacki M, Zajdenverg L, Almeida MH, Cabizuca CA, et al., (2008) Family history of type 2 diabetes is increased in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 82(1):e1-4.

Becker S K, Sponder G, Sandhu M A, Trappe S, Kolisek M et al., (2021) The Combined Influence of Magnesium and Insulin on Central Metabolic Functions and Expression of Genes Involved in Magnesium Homeostasis of Cultured Bovine Adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5897.

Bennett ST and Todd JA (1996) Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, 30:343–370.

C

Charkaluk ML, Czernichow P, Levy-Marchal C (2002) Incidence data of childhood-onset type 1 diabetes in France during 1988-1997: The case for a shift toward younger age at onset. *Pediatr Res* 52(6):859-862.

Chen YL, Huang YC, Qiao YC, Ling W, Pan YH, et al., (2017) Climates on incidence of childhood type 1 diabetes mellitus in 72 countries. *Scientific Reports*; 7(1):1–17.

Cerna M (2008) Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 158, 2.

Cimponeriu D, Apostol P, Radu I, Craciun AM, Serafinceanu C et al., (2010) The insulin polymorphism -23Hph increases the risk for type 1 diabetes mellitus in the Romanian population. *Genetics and Molecular Biology*, 33(4) :610–614.

Chaudhary D P, Sharma R, Bansal D D (2010) Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: A review. *Biol. Trace Elem. Res*; 134:119–129.

D

Dali-Sahi M and Benmansour, D (2014) Évaluation du risque de survenue du diabète de type 1 dans une population consanguine de l'ouest algérien. *Leban. Sci. J.* 15(2):25.

De Baaij J H, Hoenderop J G, Bindels R J (2015) Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiological reviews*; 95(1): 1-46.

Devendra D, Liu E, George S Eisenbarth (2004) Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 328:750-754.

E

European Food Safety Authority (EFSA) Dietary Reference Values for nutrients. Summary Report. EFSA supporting publication 2017; e15121.

G

Galli-Tsinopoulou A, Maggana I, Kyrgios I, Mouzaki K, Grammatikopoulou M G et al., (2014) Association between magnesium concentration and HbA1c in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes*;6:369–77

Gommers LMM, Hill TG, Ashcroft F M and de Baaij J H F (2019) Low extracellular magnesium does not impair glucose-stimulated insulin secretion. *Plos One*; 14(6) e0217925.

H

Hermann R, Turpeinen H, Laine A P, Veijola R, Knip, et al., (2003) HLA DR-DQ-encoded genetic determinants of childhood-onset type 1 diabetes in Finland: an analysis of 622 nuclear families. *Tissue Antigens*, 62, 162.

Holmberg H, Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J (2007) Short duration of breast-feeding as a riskfactor for beta-cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. *Br J Nutr* 97(1):111–116.

Hruby A, McKeown NM, Song Y, Djoussé L (2013) Dietary magnesium and genetic interactions in diabetes and related risk factors: a brief overview of current knowledge. *Nutrients*. 6 ; 5(12) :4990-5011.

J

Jules Simonnet (2014) L'allaitement artificiel : situation actuelle, mécanismes et conséquences. *Sciences du Vivant [q-bio]*.

K

Kamel AM, Mira MF, Ebid GTA, Kassem SH, Radwan ER, et al., (2019) Association of insulin gene VNTR INS -23/Hph1 A>T (rs689) polymorphism with type 1 diabetes mellitus in Egyptian children. *Egypt J Med Hum Genet* 20, 13.

Kostov K (2019) Effects of Magnesium Deficiency on Mechanisms of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes: Focusing on the Processes of Insulin Secretion and Signaling. *Int J Mol Sci.* 18; 20(6):1351.

Kiani, J, Hajilooi M., Furst D, Rezaei H, Shahryari-Hesami S et *al.*, (2015) HLA class II susceptibility pattern for type 1 diabetes (T1D) in an Iranian population. *International Journal of Immunogenetics*, 42(4), 279–286.

Kowluru A, Chen HQ, Modrick LM, Stefanelli C (2001) Activation of acetyl-CoA carboxylase by a glutamate and magnesium-sensitive protein phosphatase in the islet β cell. *Diabetes.* 50:1580–1587.

L

Lévy-Marchal C (2007) Que nous a appris la mesure de l'incidence du diabète de l'enfant ? *BEH* 44-45 : 374-377.

M

Malcova H, Sumnik Z, Drevinek P, Venhacova J, Lebl J et *al.*, (2006) Absence of breast-feeding is associated with the risk of type 1 diabetes: a case-control study in a population with rapidly increasing incidence. *Eur J Pediatr* 165(2) :114–119.

N

Noble JA and Valdes AM (2011) Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 11, 533.

Noble JA and Erlich HA (2012) Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a007732.

Noble J A (2015) Immunogenetics of type 1 diabetes: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*, 64, 101-112.

Nyaga DM, Vickers MH, Jefferies C, Fadason T, O'Sullivan JM (2021) Untangling the genetic link between type 1 and type 2 diabetes using functional genomics. *Sci Rep.* 6; 11(1):13871.

O

Ozcaliskan IH, Sahin H, Tanriverdi F et Samur G (2018) Association Between Magnesium Status, Dietary Magnesium Intake, and Metabolic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of the American College of Nutrition*, 1–8.

P

Peng H et Hagopian W (2006) Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *RevEndocrMetabDisord* 3: 149-162.

Persaud SJ, Harris TE, Burns CJ, Jones PM (1999) Tyrosine kinases play a permissive role in glucose-induced insulin secretion from adult rat islets. *J. Mol. Endocrinol.*22:19–28.

Pettersen E, Skorpen F, Kvaløy K, Midthjell K, Grill V (2010) Genetic heterogeneity in latent autoimmune diabetes is linked to various degrees of autoimmune activity: results from the Nord-Trøndelag Health Study. *Diabetes* 59:302–310

Pugliese A, Awdeh ZL, Alper C A, Jackson RA et Eisenbarth GS (1995) The INS B allele (1,428 Fok I) is associated with reduced IDDM incidence in autoantibody-positive first degree relatives despite the presence of autoantibodies and high-risk HLA alleles. *Transplantation Proceedings*, 27(6):3392.

Pundziuti-Lycka A, Dahlquist G, Nystrom L et al. The incidence of Type 1 diabetes has not increased but shifted to a younger age at diagnosis in the 0-34 years group in Sweden 1983 to 1992. *Diabetologia* 2002; 45: 783–91.

Q

Qiu LNY, Cai SV, Chan D, Hess RS (2022) Seasonality and geography of diabetes mellitus in United States of America dogs. *Plos one*. 17(8):e0272297.

R

Romon I, Auleley GR, Weill.A, Gosselin S, Perez P et al., (2007) L'incidence des admissions en affection de longue durée pour diabète chez l'enfant en France, de 2003 à 2005 .*World Diabetes Day2007: Diabetes in children ; BEH (44-45) : 378 :380.*

S

Salhi H, El Ouahabi H (2021) Magnesium status in patients with Type 2 diabetes (about 170 cases). *Ann Afr Med*; 20(1):64-68.

Shahbah D , Hassan T, Morsy S, El Saadany H, Fathy M (2017) Oral magnesium supplementation improves glycemic control and lipid profile in children with type 1 diabetes and hypomagnesaemia. *Medicine*; 96:11.

Song Y, Hsu Y H, Niu T, Manson J E, Buring J E et *al.*, (2009) Common genetic variants of the ion channel transient receptor potential membrane melastatin 6 and 7 (TRPM6 and TRPM7), magnesium intake, and risk of type 2 diabetes in women. *BMC Med. Genet* ; 10:4.

Stuebe A (2007) Allaitement et diabète : bienfaits et besoins spécifiques .*Diabete voice* 52(1) :26-29.

Suárez A, Pulido N, Casla A, Casanova B, Arrieta F.J et *al.*, (1995) Impaired tyrosine-kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesaemic rats. *Diabetologia* 38:1262–1270.

T

Teragawa H, Matsuura H, Chayama K, Oshima T. Mechanisms responsible for vasodilation upon magnesium infusion in vivo: clinical evidence. *Magnesium Res* 15: 241– 246, 2002.

W

Waernbaum I et Dahlquist G (2016) Low mean temperature rather than few sunshine hours are associated with an increased incidence of type 1 diabetes in children. *European Journal of Epidemiology*; 31 (1):61–65.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le gène de l'insuline (IDDM2) comprend des VNTR (motifs répétés de 14 à 15 bases) en amont du site de transcription (INS-VNTR -23HphI). Le nombre de répétitions des VNTR définit 3 sous classes identifiant des haplotypes de susceptibilité au diabète. Il existe des résultats discordants dans la littérature concernant l'association entre INS VNTR et diabète de type 1.

Notre étude confirme l'implication de l'INS VNTR dans la susceptibilité au diabète de type 1 quand il est associé à des profils de transmission différents selon la consanguinité et le gradient géographique.

Les allèles VNTR du gène de l'insuline étaient répartis de manière plus au moins égale entre les diabétiques et les témoins sauf pour le polymorphisme hétérozygote AT dont il est moins représenté chez les diabétiques que chez les non-diabétiques (26% vs 32%).

L'exploration d'autres polymorphismes au niveau du gène de l'insuline comme les SNP -2221Msp (C/T) et +1140 (A/C) ainsi que d'autres gènes de prédisposition ; tels que le gène de la protéine PTPN2 ; comme éléments génétiques déclencheurs du DT1 dans notre population est en cours d'analyse.

L'introduction précoce des protéines du lait de vache chez les individus génétiquement prédisposés (HLA DR3 et/ou DR4) sont considérés comme des facteurs de risque liés à la pathogenèse du DT1. C'est pourquoi, l'allaitement maternel doit être encouragé et sa durée supérieure à 9 mois est essentielle. Il faut également recommander l'introduction tardive du lait de vache et des aliments à base de lait.

Ce résultat est confirmé par une approche *in silico* qui montre que les protéines de lait de vache (BSA et BLG) partagent une homologie de séquence et de structure avec les auto-antigènes (IA2 et GAD65). De plus, ils sont responsables de l'activation des cellules T auto-réactives et de la perpétuation du DT1.

Les méthodes de prédiction *in silico*, telles que les outils informatiques d'immunologie ont considérablement aidé la recherche immunologique à identifier les épitopes pour de nombreuses raisons pratiques, notamment la compréhension de l'étiologie des maladies, le développement de tests de diagnostic, la modélisation du système immunitaire et la conception de vaccins candidats *in silico*.

Les résultats de l'enquête alimentaire montrent que les jeunes diabétiques présentent un apport alimentaire significativement inférieur à celui des témoins. Le risque du DT1 est associé à un déficit

dans l'apport alimentaire journalier en Mg. Ce risque serait multiplié par trois chez les garçons présentant un apport alimentaire en magnésium inférieur à l'apport journalier recommandé, et serait multiplié par cinq après ajustement à l'âge et à l'IMC faisant craindre l'apparition de complications chroniques du diabète associées aux carences en Mg.

Notre enquête a souligné la non-observance d'une hygiène alimentaire des enfants et adolescents diabétiques.

Des études d'intervention sont nécessaires pour élucider d'avantage si le rétablissement de l'équilibre du magnésium à travers la consommation des nutriments riches en magnésium ou par des médicaments pourrait améliorer le contrôle glycémique des diabétiques et prévenir les complications longitudinales potentielles.

ANNEXES

Questionnaire

Nom et Prénom :

Date :

Localité :

N° de téléphone :

Code la famille :

Code du patient :

Origine ethnique :

Age :

sexe :

I)-Les données socio-économiques :

Type d'habitation :

Niveau d'instruction :

Age et Profession père :

mère :

Fratricité :

Nombre de frère	Nombre de sœurs	Range dans la fratrie

Gémellarité :

si oui

vrai jumeaux :

II)- Famille :

Consanguinité :

oui :

non :

Degré de consanguinité :

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

Père :

Mère :

Antécédents familiaux de diabète :

Diabète gestationnel de la mère :

III)-Le cas index :

1) Le diabète :

Poids (kg) :

Taille (cm) :

IMC :

Tour de taille (cm) :

Tour de hanche :

Périmètre crânien :

A la naissance : poids :

Taille :

Périmètre crânien :

Terme gestationnel :

Age au diagnostic :

Complications dégénératives du diabète :

Pathologies associées :

Supplémentation en vitamine D : de à :

Type de l'allaitement :

Maternel (durée) : artificiel (durée) : mixte (durée) :

Antécédents personnels (autres maladies avant le DT1) :

Infections virales : rougeole : varicelle : autres :

IV)-Paramètres biologiques :

Glycémie :

IGF1 :

HDL :

Hémoglobine glyquée (Hba1c) :

Vitamine D :

LDL :

Urée :

Peptide C :

Cholestérol :

Créatinine :

Triglycéride :

TSH :

Anticorps Anti GAD :

Anti insuline :

Anti-IA2 :

V)-Bilan ionique:

Journal alimentaire des 24h

Nom :

prénom :

code :

Horaire	Nom de l'aliment et composition du plat	Quantité consommée
Petit-déjeuner		
Déjeuner		
Gouter		
Diner		
Grignotage		

Tableau des quantités de référence pour les aliments

Aliments décrits	Unité utilisée	Poids (g)	Aliments décrits	Unité utilisée	Poids (g)
Fromage	Portion (P)	20	Mille feuilles	Une moyenne	80
Beurre	C à café	3	Gaufrette	Une moyenne	10
Yaourt sucré	Un pot	125	Mbessess (semoule)	Un morceau	40
Petit suisse (40%)	Un pot	50	Beignet	Un moyen	65
Crème fraîche	C à soupe	10	Frites (20 aines)	Une assiette	150
Flan	Un pot	150	Haricots secs	Une louche	230
Camembert	1/8 de la boîte	25	Ragout de pomme de terre	Une louche	250
Lait de vache	Une tasse	240	Purée	Une louche	200
Lait en poudre	C à soupe	10	Soupe	2 louches	400
Viande	Morceau	25	Maâkouda	Une petite	35
Foie	Tranche	37	Carotte crue	Une moyenne	45
Sardine	Une petite	30	Œuf dur	Un moyen	50
Tomate	Une moyenne	60	Omlette	Une moyenne	80
Datte	Une moyenne	10	Mayonnaise	3 C à soupe	10
Pomme	Une moyenne	90	Margarine	2 C à soupe	15
Orange	Une moyenne	100	Sauce (Ragout)	5 C à soupe	55
Mandarine	Une moyenne	40	Sucre	Un morceau	6
Figue	Une moyenne	30	Eau	Un verre	100
Abricot	Une moyenne	30	Huile	Une C à soupe	20
Melon	Tranche	100	Blanc d'œuf	Un moyen	40
Pêche	Une moyenne	100	Jaune d'œuf	Un moyen	10
Pain	Tranche	50	Café	Une tasse	100
Gâteaux secs	Un Bimo	10	Thé	Une tasse	75

Préparation des solutions pour l'extraction de l'ADN à partir du sang total

➤ Préparation de 500ml EDTA (0,5 M ; pH = 8) :

- Faire dissoudre 93,06g d'EDTA dans 400 ml d'eau distillée puis ajuster jusqu'au 500ml, et avec du NaOH (5M) règle le PH à 8.

➤ Préparation de 500ml EDTA Na₂ (0,5 M ; pH = 8) :

- Faire dissoudre 118.53g d'EDTA dans 400 ml d'eau distillée puis ajuster jusqu'au 500ml, et avec du NaOH (5M) règle le PH à 8.

➤ Préparation de 500ml Tris HCl (1M ; pH=8) :

- Faire dissoudre 60,57g d'EDTA dans 400 ml d'eau distillée puis ajuster jusqu'au 500ml, et avec du HCl règle le pH à 8.

➤ Préparation de 100ml de SDS 10% :

- Pour 10% : 10 g -----> 100ml eau distillée.

➤ Préparation de NaCl (5M) :

- Pour 5M: 292,25 g -----> 1000ml eau distillée.

➤ Préparation de 2L de TE10/10 :

- 20ml tris-Hcl (1M, pH=8)
- 40ml EDTA (0.5M, pH=8)
- qsp 2L eau distillée.

➤ Préparation de 1L de TE10/1 :

- 10ml tris-Hcl (1M, pH=8)
- 2 ml EDTA (0.5M, pH=8)
- qsp 1L eau distillée.

➤ Préparation de 200ml de solution de lyse des globules blancs (SLB) :

- 2ml tris-Hcl (1M, pH=8)
- 40ml EDTA (0.5M, pH=8)
- 10ml SDS (10%)
- qsp 200ml eau distillée.

Protocole d'extraction par la technique de NaCl "Salting out"

1. Lyse des globules rouges :

La lyse des globules rouges est réalisée en complétant le volume de sang (2 à 5ml) ; initialement décongelé à 37°C ; avec un volume de 10 ml d'une solution hypotonique qui est le tris-EDTA (TE10/10) (Tris/acide chlorhydrique (HCl) 10 mM et EDTA 10 mM ; pH = 8,0). Après lavage, 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. Ce qui permet de séparer le surnageant qui contient les débris de globules rouges, des globules blancs qui sont précipités au fond du tube formant un culot.

Par la suite le surnageant est éliminé contenant les débris des globules rouge. Cette opération de lavage est répétée plusieurs fois en ajoutant 10ml de TE10/10 au culot obtenu. Les tubes sont mis dans la glace pendant 10minutes, puis on centrifugé à 2500 tour /mn pendant 15 min. Le surnageant est ensuite éliminé et cette dernière étape est répétée afin d'obtenir un culot blanchâtre de globules blancs.

2. Lyse des leucocytes :

Au culot des globules blancs, 5ml de solution de lyse de globules blancs (SLB) et 125µl de protéinase K (20mg/ml) sont ajoutés. Après homogénéisation les tubes sont mis dans un récipient contenant de l'eau puis incubés dans l'étuve à 37°C pendant une nuit sous agitation douce.

3. Précipitation des débris cellulaires :

Après incubation, 2ml de NaCl (5M) sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont mélangés vigoureusement puis centrifugés à 4000 tours pendant 10 minutes (on obtient un culot contenant les débris cellulaires, protéiques et le surnageant contenant l'ADN). Le surnageant est récupéré dans des tubes à essais.

4. Précipitation de l'ADN :

Deux volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés dans chaque tube. L'ADN est précipité par agitation douce en retournant délicatement le tube afin de visualiser les filaments de l'ADN sous forme de méduse.

La méduse d'ADN est récupérée par une pipette pasteur à usage unique bien scellée puis rincée une fois à l'éthanol à 70%, la placer dans un tube Eppendorf et la laisser sécher à l'air libre afin de faire évaporer l'éthanol.

5. Dissolution et conservation de l'ADN :

La méduse est dissoute dans 200 à 500µl de TE10/1 selon sa taille puis conservée dans des tubes pendant 24h à une température ambiante ensuite à 4°C pour quelques jours ; à -20°C pour plus de 10 ans.