

DIABÈTE DE TYPE 1 : VERS DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS

par

Ch. BOITARD et R. MALLONE*

INTRODUCTION

Le diabète de type 1 (DT1) est un problème majeur de santé publique en raison du début souvent précoce de la maladie (avant l'âge de 20 ans chez 50 p. 100 des patients), d'une incidence croissante dans la plupart des populations, de l'absence de traitement curatif et du poids très lourd des complications vasculaires liées à l'hyperglycémie résiduelle malgré des injections pluriquotidiennes d'insuline chez les patients traités. La maladie résulte de la destruction sélective par le système immunitaire des cellules insulinosécrétrices (cellules β) des îlots de Langerhans du pancréas. La présence d'une insulite, la détection d'autoanticorps, de lymphocytes T activés contre des antigènes exprimés par les cellules β et la survenue de la maladie chez des sujets exprimant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) particulières font du diabète une maladie auto-immune. Dans les modèles animaux de diabète de type 1, le rôle prédominant des lymphocytes T ressort des expériences de transfert du diabète d'animaux diabétiques ou prédiabétiques à des receveurs initialement non diabétiques par les lymphocytes T des animaux atteints, de la prévention du diabète par l'injection d'anticorps monoclonaux interférant avec l'activation des lymphocytes T et de l'absence de diabète chez les animaux dont des gènes de différenciation ou d'activation T ont été invalidés [1, 2]. Chez l'homme,

* INSERM U561, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris. Service de Diabétologie, Hôtel Dieu et Hôpital Cochin, Paris.

les lymphocytes T sont largement prédominants dans l'infiltrat insulaire qui précède ou accompagne la maladie chez les sujets diabétiques ou prédiabétiques. Un DT1 a par ailleurs été authentifié chez un sujet qui présentait un déficit de l'immunité humorale abolissant la production d'anticorps [3]. Néanmoins, malgré le rôle central des lymphocytes T dans la maladie, la détection d'autoanticorps demeure en pratique clinique le marqueur biologique unique d'auto-immunité chez les patients présentant un syndrome hyperglycémique et l'apparition des autoanticorps chez les sujets prédiabétiques est toujours considérée comme marquant le point de départ de la maladie auto-immune.

GÈNES VERSUS ENVIRONNEMENT

Si les étapes successives de la réaction auto-immune qui conduit à la destruction des cellules β commencent à être définies, les événements initiaux qui déclenchent l'activation des lymphocytes contre les cellules β demeurent inconnus [4]. Des modifications tant au niveau du système immunitaire que des îlots qui sont la cible de la maladie sont vraisemblables. L'hypothèse la plus souvent avancée est celle d'agents infectieux, en particulier un (ou des) virus, à l'origine de la maladie. Il est toutefois possible que des événements sans lien classique avec le système immunitaire, par exemple métaboliques, jouent un rôle initial. Les techniques à haut débit d'exploration du génome ont conduit à une nouvelle cartographie de la prédisposition aux maladies multifactorielles et multigéniques dont le DT1 est une maladie particulièrement illustrative, mais aussi à une révision de la compréhension que les généticiens avaient de la prédisposition à la maladie dans les années 1980. En dehors de rares DT1 monogéniques observés dans le cadre de syndromes génétiques complexes (mutations de FoxP3 ou AIRE), les gènes associés au DT1 sont multiples, sont tous jusqu'à présent des gènes « normaux », c'est-à-dire des variants de gènes dont chacun imprime à l'individu un sous-phénotype déjà mesurable. Des exemples de ces sous-phénotypes incluent une sélection négative moins efficace des lymphocytes T spécifiques des autoantigènes pancréatiques dans le thymus, une cinétique d'activation des lymphocytes accélérée, une décélération plus rapide de l'activation lymphocytaire, une présentation optimisée des autoantigènes, un fonctionnement particulier des cellules β , une maturation sous-optimale de populations régulatrices de lymphocytes... Si la région génétique principale de prédisposition au DT1, le CMH (système HLA chez l'homme) imprime un risque relatif de prédisposition au DT1 qui peut aller jusqu'à ~8-12 (haplotypes DR4 et DR3) et le VNTR (*variable number of tandem repeats*) en 5' du gène de l'insuline un risque relatif ~2,5, aucun des autres variants génétiques associés à la maladie n'imprime un risque supérieur à 2 [5]. Les mêmes observations ont été faites dans les modèles murins de DT1, conduisant à de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes possibles de déclenchement de la maladie. À l'hypothèse longtemps unique du déclenchement de la maladie auto-immune sous l'effet d'un facteur d'environnement, en fait un virus, il faut aujourd'hui ajouter l'hypothèse avérée dans les modèles murins d'un déclenchement stochastique de l'auto-immunité sur un terrain génétique de forte prédisposition au DT1. Les données de génétique humaine et l'étude des modèles animaux apportent un autre enseignement, le rôle de gènes agissant sur la fonction

des cellules β dans la prédisposition génétique à la maladie. Les modèles animaux indiquent enfin que les facteurs d'environnement peuvent exercer un effet freinateur sur le développement de la maladie une fois celle-ci déclenchée, aussi bien qu'un effet accélérateur ou d'induction de la maladie de novo [5]. On attend de l'étude de l'épigénome et de celle du métagénome dont il n'existe à ce jour aucune donnée, en dehors de données fragmentaires chez la souris, des avancées dans la compréhension de l'interaction du génome de prédisposition à la maladie et de l'environnement.

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

La prévalence du DT1 est de 0,2 à 0,4 p. 100, avec une grande disparité selon les pays. L'incidence de la maladie atteint $65/10^5$ /an en Finlande, plus de $10/10^5$ /an en France et croît dans la plupart des pays où un suivi à long terme a été mis en place (+3-4 p. 100/an en France). La maladie clinique, observée une fois sur deux avant l'âge de 20 ans, deux fois sur trois avant 30 ans, conduit à une insulinodépendance rapidement complète. Les données épidémiologiques indiquent que l'incidence du DT1 varie considérablement en fonction des pays observés avec grossièrement, si l'on excepte la Sardaigne, un gradient nord-sud et, au sein d'un même pays comme la Suède, d'une région géographique à une autre [4]. L'augmentation d'incidence est associée à un âge de plus en plus jeune de son début clinique, avec l'augmentation la plus impressionnante chez les enfants de moins de 5 ans. Le risque relatif chez les enfants de 5-9 ans et de 10-14 ans est néanmoins respectivement de 1,62 et 1,94 en comparaison des enfants de 0-4 ans [6]. L'incidence du DT1 était en 1972 de $20/10^5$ /an, en 1992 de $40/10^5$ /an, aujourd'hui proche de $65/10^5$ /an en Finlande (O. Simell, communication personnelle). Une augmentation de 3-4 p. 100 a également été rapportée en France [7]. Une augmentation de l'incidence du DT1 a été documentée en Finlande dans le groupe d'âge 15-39 ans [8]. Cette augmentation de l'incidence du DT1 chez l'adulte est par ailleurs suggérée par la survenue de plus en plus fréquente de la maladie chez des sujets exprimant des allèles antérieurement connus pour être faiblement associés au DT1. Aucune modification récente du génome ne peut expliquer l'augmentation de l'incidence du DT1, à laquelle seule une modification de l'environnement (par exemple le taux des infections virales, l'accroissement de l'âge maternel, le régime alimentaire, l'exposition à des toxines, un niveau de croissance post-natale augmenté...) et de son interaction avec le génome de prédisposition à la maladie peut contribuer. La prévalence de la maladie est légèrement supérieure dans le sexe masculin à ce qu'elle est dans le sexe féminin [9]. La fréquence de la maladie est un peu supérieure chez les enfants de sexe masculin que chez les enfants de sexe féminin [10], mais le risque de DT1 est environ deux fois supérieur chez les enfants de père diabétique (~6 p. 100) que chez les enfants de mère diabétique (~3 p. 100) [11, 12]. Le rôle de facteurs d'environnement est encore indiqué par la concordance pour la maladie de 30-50 p. 100 chez les jumeaux monozygotes alors qu'elle est inférieure à 10 p. 100 chez les jumeaux dizygotes [13]. Des différences ethniques ont été rapportées quant au risque de DT1. La faible incidence de la maladie dans les populations asiatiques est en partie expliquée par la faible fréquence dans ces populations des allèles

HLA de prédisposition présents chez les Caucasiens – [DRB1*03-DQB1*0201 (DR3) ou DRB1*04-DQB1*0302 (DR4)] et DQA1*0301, DQB1*0302 (DQ8) ou DQA1*0501 DQB1*0201 (DQ2) – et l’observation d’allèles de prédisposition différents – DRB1*0405-DQB1*0401 (DR4) et DRB1*0901-DQB1*0303 (DR9) [9]. Les données portant sur les migrants venant de pays à faible ou forte incidence de DT1 dans des pays dont l’incidence est opposée montrent un risque en règle intermédiaire par rapport à la population d’accueil, indiquant là encore le rôle de facteurs liés à l’environnement.

FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Le taux élevé de discordance pour le DT1 chez les jumeaux monozygotes indique le rôle de facteurs environnementaux à l’origine de la maladie. Dans les modèles murins, les données les plus explicites sont l’induction d’un DT1 dans les souches de rats exprimant la molécule de classe II du CMH RT1^u par le virus de Kilham. L’induction d’un DT1 a également été rapportée chez la souris après infection par le variant D du virus de l’encéphalomyocardite, par un virus coxsackie B4 ou par le virus de la chorioméningite lymphocytaire dans des souris exprimant un transgène viral au niveau des cellules β . Chez l’homme, de nombreux virus ont été associés au développement du DT1 [4]. Le rôle de nombreux virus a été avancé (coxsackie B, rubéole, oreillons, cytomégalovirus, virus d’Epstein-Barr, virus varicelle-zona, rotavirus, échovirus) mais les données rapportées sont souvent contradictoires. Les corrélations les plus convaincantes ont été rapportées entre la détection d’anticorps spécifiques, particulièrement d’isotype IgM, ou de l’ARN de virus coxsackie B (B3 et surtout B4) ou échovirus et la survenue d’un DT1 [14]. Les mêmes entérovirus (coxsackie B, échovirus) ont été incriminés par des études prospectives chez des sujets à risque génétique de développer un DT1, en particulier en Finlande [15]. Ces études ont montré que la détection de l’infection virale était souvent contemporaine de la détection des autoanticorps anti-cellules β [15]. Le rôle possible d’infections par ces entérovirus durant la grossesse a également été avancé en Suède et en Finlande. Mais les observations rapportées demeurent dans tous les cas partielles, le rôle des virus incriminés n’apparaissant que chez une fraction des sujets étudiés. Aucun virus unique n’a été rapporté sur la base de modèles épidémiologiques peut-être inadaptés si l’on considère le rôle de virus souvent multiples, certains protecteurs, d’autres inducteurs dans les modèles animaux de DT1. De façon plus directe, une étude récente a retrouvé l’expression de la protéine de capsid VP1 du virus coxsackie B4 et la présence d’inclusions virales dans les îlots de Langerhans de 3 sur 6 sujets qui présentaient un DT1 [16]. Au-delà des agents infectieux, le rôle de facteurs nutritionnels, en particulier le type d’allaitement dans les premiers mois de la vie [17, 18], l’âge de plus en plus précoce de la puberté ou tardif de la naissance du premier enfant, a été avancé sur la base de données peu reproductibles et semblent infirmé par des études interventionnelles réalisées ou en cours, principalement en Finlande. Un indice de masse corporelle élevé semble également être un facteur de risque de DT1 [19-21].

HISTOIRE NATURELLE DU DIABÈTE DE TYPE 1

Le diagnostic de DT1 repose sur l'apparition d'une hyperglycémie et de son cortège de signes cliniques. Pourtant, l'hyperglycémie témoigne d'un stade déjà avancé de la maladie qui correspond à une destruction de plus de 80 p. 100 de la masse β physiologique. L'apparition des autoanticorps anti-cellules β signe ce que l'on apparente aujourd'hui au début de la maladie auto-immune. Les études de suivi de populations à risque de DT1 (enfants de parents diabétiques, fratries, nouveau-nés exprimant des allèles HLA de prédisposition) montrent toutes que l'apparition des autoanticorps précède la maladie clinique de plusieurs mois chez les très jeunes enfants ou de plusieurs années chez les adolescents et les adultes, suggérant que la maladie auto-immune qui conduit à la destruction des cellules β est en fait un processus chronique, même s'il demeure longtemps asymptomatique. Les premières cohortes de sujets à risque mises en place dans le DT1 ont réuni au sein de fratries les frères et sœurs de sujets atteints de DT1 ou des couples de jumeaux dont l'un des sujets était atteint de DT1. Ces études ont permis dès le début des années 1980 de démontrer la valeur prédictive des autoanticorps anti-cellules d'îlot vis-à-vis du développement d'un DT1 ultérieur chez des sujets encore normoglycémiques. Ces données ont été confirmées dans une cohorte d'enfants de père ou mère diabétique suivis depuis la naissance et dans des cohortes de sujets à risque génétique de DT1 sélectionnés dès la naissance sur l'expression d'allèles HLA de forte prédisposition au DT1 en absence de tout antécédent familial dans la population générale [11, 22-28]. L'étude BABYDIAB en Allemagne [11, 12] a montré la précocité de détection des autoanticorps, dès l'âge de 6 mois chez certains sujets, avec un pic de détection entre 2 et 3 ans chez les enfants de parents diabétiques, indiquant qu'une majorité d'enfants qui deviendront ultérieurement diabétiques développent des autoanticorps très précocement. La prévalence d'apparition d'un autoanticorps dans cette population est à 2 ans de 11 p. 100 et la prévalence d'autoanticorps contre de multiples spécificités antigéniques est de 3,5 p. 100. Pratiquement tous les enfants qui ont développé des autoanticorps à l'âge de 2 ans ont des autoanticorps anti-insuline dans le premier prélèvement positif (> 90 p. 100) et ont d'emblée, ou développent rapidement, des autoanticorps contre des autoantigènes différents (68 p. 100 en moins de 2 ans). La prévalence de détection des autoanticorps est par ailleurs élevée, comparée à la prévalence attendue du DT1 chez les enfants de parents diabétiques, indiquant que tous les enfants ayant des autoanticorps ne développeront pas un DT1.

Plusieurs autoantigènes sont la cible des autoanticorps et des lymphocytes T autoréactifs détectés au cours du DT1, en particulier l'insuline et la pro-insuline, la glutamate décarboxylase, l'*islet antigen 2 IA-2*, le transporteur de zinc ZnT8 [30, 31]. La GAD et IA-2 sont exprimés par les cellules β , mais aussi par les autres cellules endocrines de l'îlot et par certaines populations de neurones. L'insuline et ZnT8 sont en revanche plus spécifiquement exprimés par les cellules β . L'insuline est l'autoantigène qui semble avoir le rôle prédominant dans le développement de l'auto-immunité anti-cellules β . C'est une cible antigénique commune des autoanticorps [11] et des cellules T chez les sujets diabétiques et prédiabétiques [32-39] et le premier autoanticorps en règle détecté chez les sujets prédiabétiques. Les autoanticorps anti-insuline ont une valeur prédictive positive élevée chez ces sujets [11]. Chez la souris NOD, le transfert de clones T spécifiques de l'insuline accélère

la survenue du diabète et l'immunisation des souris contre l'insuline a au contraire un effet préventif. L'inactivation du gène de l'insuline 1 et de l'insuline 2 a respectivement un effet préventif et accélérateur de la maladie sur le fond NOD [40, 41] alors que l'inactivation des gènes de la GAD ou d'IA-2 est sans effet [42, 43]. Les souris NOD transgéniques exprimant le gène de l'insuline dans les cellules présentant l'antigène sont protégées de la maladie [44]. La sensibilité des différents autoanticorps pour le diagnostic de diabète est inégale. Les autoanticorps anti-GAD sont retrouvés de façon fréquente (~70-80 p. 100) mais ont une valeur prédictive positive de survenue du DT1 chez les sujets prédiabétiques faible. Les autoanticorps anti-IA-2 et anti-insuline ont une valeur prédictive positive élevée mais sont retrouvés avec une fréquence plus faible (~50 p. 100) chez les sujets atteints de diabète clinique. Il demeure une fraction importante (> 10 p. 100) de patients atteints d'un diabète imposant l'instauration d'une insulinothérapie chez lesquels aucun autoanticorps n'est détecté. Les autoanticorps anti-ZnT8 sont récemment apparus comme un nouveau marqueur de DT1 [31], mais dont la prévalence est inversement corrélée à l'âge d'apparition de la maladie et la détection parfois en défaut aux stades précoces de développement de l'auto-immunité. La présence d'autoanticorps dirigés contre plusieurs spécificités antigéniques des cellules β indique un risque élevé de survenue d'un diabète insulino-dépendant, mais elle ne donne aucune indication sur son délai d'apparition. Elle ne résout pas en outre le problème posé par la situation la plus fréquente dans toutes les études prospectives rapportées, la détection d'autoanticorps dirigés contre un seul antigène. Celle-ci indique un risque faible, mais cependant non négligeable (environ 15 p. 100 dans une étude récente) de développement d'un DT1 sans discriminer entre les sujets qui développeront et ceux qui ne développeront pas un DT1 [14]. L'étude des enfants de parents diabétiques a enfin confirmé le risque plus élevé de DT1 chez les enfants de père diabétique que chez les enfants de mère diabétique et montré que la détection d'autoanticorps anti-GAD et/ou anti-IA-2 chez la mère ou dans le sang de cordon était associée à un risque atténué de DT1 [45].

MARQUEURS LYMPHOCYTAIRES T

Les autoanticorps ne jouent pas de rôle direct dans la pathogénie du DT1, même s'ils constituent le seul marqueur d'auto-immunisation aujourd'hui accessible à une utilisation clinique. Les lymphocytes B jouent un rôle physiopathologique, vraisemblablement comme cellules présentant l'antigène. L'isotype des autoanticorps détectés au cours du DT1, essentiellement des IgG, indique bien que la réponse auto-immune est une réponse immunitaire dépendante de sa régulation par des lymphocytes T. Toutes les données obtenues dans les modèles murins démontrent le rôle central des lymphocytes T. Chez l'homme, la plupart des observations indiquent en outre la prédominance des lymphocytes T dans l'insulite [3].

Les études réalisées chez la souris NOD montrent le rôle central des cellules T CD4+ et CD8+ dans le DT1. Les souris NOD invalidées tant pour la β 2-microglobuline que pour les molécules de classe II du CMH sont protégées de l'insulite et du diabète. Le diabète est restauré chez les souris invalidées pour la β 2-microglobuline ré-exprimant sous la forme d'un transgène des molécules de classe I de façon ciblée dans les cellules β des îlots de Langerhans [46]. L'injection de clones T

spécifiques d'autoantigènes insulaires, tant CD4+ que CD8+, induit un diabète après transfert chez des souris immunodéficientes. Chez l'homme, l'infiltrat des îlots est constitué de façon prédominante de cellules T soit CD4+, soit CD8+, en fonction des observations qui ont été rapportées [47-52].

Le rôle prédominant des lymphocytes T souligne la nécessité d'une caractérisation fine des autoantigènes et surtout des épitopes reconnus aux différentes étapes du processus qui conduit au DT1. C'est là une clé vers des applications tant diagnostiques que thérapeutiques, fondées sur une immunothérapie peptide-spécifique, dans une maladie au cours de laquelle le rapport bénéfice/risque élimine des stratégies immunosuppressives. L'étude des cellules T CD4+ a porté sur la reconnaissance de l'insuline, de la GAD et d'IA-2 [53-55]. Plusieurs épitopes classe II-restreints ont été définis dans le DT1 humain [56] et chez des souris transgéniques exprimant des allèles HLA de classe II [57-59]. La prévalence et l'intensité des réponses prolifératives (30-80 p. 100) sont cependant variables selon les études. La disparité des résultats s'explique en partie par l'hétérogénéité des techniques utilisées (sources d'antigène) et des populations étudiées (allèles du CMH portés par les sujets étudiés). La réponse de sujets normoglycémiques sans risque génétique connu demeure en outre souvent mal établie. Enfin, les caractères de présentation des antigènes insulaires (nature des cellules et des molécules de classe II présentatrices) et le profil des cytokines produites par les cellules T dirigées contre les antigènes insulaires demeurent en règle inconnus. Les tentatives de standardisation de ces techniques se sont heurtées à une reproductibilité insuffisante [60]. Les données publiées à ce jour ont permis des avancées significatives dans la compréhension physiopathologique de la maladie mais n'ont pas permis de mettre en place des tests diagnostiques accessibles à une utilisation clinique.

Des épitopes de l'insuline, de la GAD du polypeptide amyloïde de l'îlot (IAPP) présentés par l'allèle de classe I A2.1 aux lymphocytes T CD8+ ont été définis par immunisation ADN chez des souris transgéniques exprimant A2.1, des résidus C-terminaux ont été caractérisés *in vitro* par digestion de longs fragments peptides des antigènes par des préparations de protéasome, la liaison des peptides définis a pu être étudiée vis-à-vis d'allèles de classe I purifiés et la reconnaissance de ces peptides étudiée par des tests ELISpot interféron γ [35-37, 39, 61-64]. L'utilisation de tétramères peptide/classe I a permis dans certains cas de définir les cellules T CD8+ circulantes [38,62]. Une région de la pro-insuline est localisée dans la chaîne B de l'insuline et sa jonction avec le peptide C [37, 65, 66]. D'autres ont été localisées dans la chaîne A [35]. Plus récemment, des épitopes localisés dans la séquence signal de la prépro-insuline ont été définis comme reconnus par les lymphocytes T CD8+ des sujets atteints de DT1 [38, 65].

HYPOTHÈSE MÉTABOLIQUE

La détection très précoce des autoanticorps chez les sujets à risque génétique de DT1, le rôle de facteurs environnementaux initialement indépendants du système immunitaire, la possible association des facteurs d'environnement indépendants – l'indice de masse corporelle, l'insulinorésistance – dans la survenue de la maladie, à l'instar de l'association de multiples variants génétiques dans le terrain de

prédisposition tel qu'il est aujourd'hui défini, justifie la recherche de facteurs très précoces susceptibles de jouer un rôle dans l'initiation de la maladie. Une étude récente, encore unique, indique que des anomalies métaboliques peuvent précéder le déclenchement de la maladie auto-immune, dont le meilleur marqueur demeure l'apparition des autoanticorps. Dans une cohorte d'enfants suivis depuis la naissance, considérés comme à risque génétique de DT1 en raison de l'expression d'allèles HLA de prédisposition à la maladie, le profil de certains métabolites (acide succinique, phosphatidylcholine, triglycérides, éther-phospholipides, lysophosphatidylcholine) était modifié très en amont de l'apparition des autoanticorps, voire dès la naissance et dans le sang du cordon [67].

CONCLUSION

L'activation précoce des lymphocytes T autoréactifs, avant toute détection d'autoanticorps, soulève toute une série d'hypothèses. Certaines ont une retombée clinique potentielle immédiate, d'autres sont encore exploratoires mais susceptibles d'ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques. Les réponses T contre les autoantigènes des cellules insulinosécrétrices sont-elles détectables avant l'apparition des autoanticorps ? Existe-t-il une corrélation entre la présence des réponses T et l'apparition ultérieure des autoanticorps ? Peut-on mieux prédire la survenue ultérieure d'un DT1 en combinant la détection des autoanticorps et de réponses T ? Ces lymphocytes T sont-ils détectables dans le sang de cordon ? L'identification d'un « autoantigène précoce » dans le DT1 humain, aussi bien que la découverte de facteurs non-immunitaires, sont susceptibles d'ouvrir la voie à de nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques dans cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE

1. FAIDEAU B, LARGER E, LEPAULT F et al. Role of beta-cells in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes*, 2005, 54 (Suppl. 2) : S87-S96.
2. ANDERSON MS, BLUESTONE JA. The NOD mouse : a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23 : 447-485.
3. MARTIN S, WOLF-EICHBAUM D, DUINKERKEN G et al. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N Engl J Med*, 2001, 345 : 1036-1040.
4. ZIPRIS D. Epidemiology of type 1 diabetes and what animal models teach us about the role of viruses in disease mechanisms. *Clin Immunol*, 2009, 131 : 11-23.
5. CONCANNON P, RICH SS, NEPOM GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med*, 2009, 360 : 1646-1654.
6. DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med*, 2006, 23 : 857-866.
7. CHARKALUK ML, CZERNICHOV P, LEVY-MARCHAL C. 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*, 2002, 52 : 859-862.
8. LAMMI N, BLOMSTEDT PA, MOLTCHANOVA E et al. Marked temporal increase in the incidence of type 1 and type 2 diabetes among young adults in Finland. *Diabetologia*, 2008, 51 : 897-899.

9. GILLESPIE KM, BAIN SC, BARNETT AH et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet*, 2004, *364* : 1699-1700.
10. HARIJUTSALO V, SJÖBERG L, TUOMILEHTO J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children : a cohort study. *Lancet*, 2008, *371* : 1777-1782
11. ZIEGLER AG, HUMMEL M, SCHENKER M, BONIFACIO E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes : the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes*, 1999, *48* : 460-468.
12. ACHENBACH P, BONIFACIO E, KOCZWARA K, ZIEGLER AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*, 2005, *54* (Suppl. 2) : S25-S31.
13. HYTINEN V, KAPRIO J, KINNUNEN L et al. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs : a nationwide follow-up study. *Diabetes*, 2003, *52* : 1052-1055.
14. SALMINEN KK, VUORINEN T, OIKARINEN S et al. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Diabet Med*, 2004, *21* : 156-164.
15. FUCHTENBUSCH M, IRNSTETTER A, JAGER G, ZIEGLER AG. No evidence for an association of coxsackie virus infections during pregnancy and early childhood with development of islet autoantibodies in offspring of mothers or fathers with type 1 diabetes. *J Autoimmun*, 2001, *17* : 333-340.
16. DOTTA F, CENSINI S, VAN HALTEREN AG et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, *104* : 5115-5120.
17. NORRIS JM, BEATY B, KLINGENSMITH G et al. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell auto-immunity. *Diabetes Auto-immunity Study in the Young (DAISY)* *JAMA*, 1996, *276* : 609-614.
18. HUMMEL M, BONIFACIO E, SCHMID S et al. Brief communication : early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med*, 2004, *140* : 882-886.
19. KIBIRIGE M, METCALF B, RENUKA R, WILKIN TJ. Testing the accelerator hypothesis : the relationship between body mass and age at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003, *26* : 2865-2870.
20. CLARKE SL, CRAIG ME, GARNETT SP et al. Increased adiposity at diagnosis in younger children with type 1 diabetes does not persist. *Diabetes Care*, 2006, *29* : 1651-1653.
21. FOURLANOS S, DOTTA F, GREENBAUM CJ et al. Latent auto-immune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia*, 2005, *48* : 2206-2212.
22. GORSUCH AN, SPENCER KM, LISTER J et al. Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet*, 1981, *2* : 1363-1365.
23. BINGLEY PJ, GALE EA. Progression to type 1 diabetes in islet cell antibody-positive relatives in the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial : the role of additional immune, genetic and metabolic markers of risk. *Diabetologia*, 2006, *49* : 881-890.
24. YU L, CUTHBERTSON DD, MACLAREN N et al. Expression of GAD65 and islet cell antibody (ICA512) autoantibodies among cytoplasmic ICA+ relatives is associated with eligibility for the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes*, 2001, *50* : 1735-1740.
25. REWERS M, BUGAWAN TL, NORRIS JM et al. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM : diabetes auto-immunity study in the young (DAISY). *Diabetologia*, 1996, *39* : 807-812.
26. HONEYMAN MC, COULSON BS, STONE NL et al. Association between rotavirus infection and pancreatic islet auto-immunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes*, 2000, *49* : 1319-1324.
27. VERGE C, GIANANI R, KAWASAKI E et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, 1996, *45* : 926-933.
28. BENNETT JOHNSON S, BAUGHUM AE, CARMICHAEL SK et al. Maternal anxiety associated with newborn genetic screening for type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2004, *27* : 392-397.
29. KUPILA A, MUONA P, SMIELL T et al. Feasibility of genetic and immunological prediction of type 1 diabetes in a population-based birth cohort. *Diabetologia*, 2001, *44* : 290-297.
30. ATKINSON MA, MACLAREN NK. Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*, 1993, *92* : 1608-1616.
31. WENZLAU JM, JUHL K, YU L et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, *104* : 17040-17045.

32. YU L, ROBLES DT, ABIRU N et al. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse : evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, *97* : 1701-1706.
33. DUBOIS-LAFORGUE D, CAREL JC, BOUGNERES PF et al. T-cell response to proinsulin and insulin in type 1 and pretype 1 diabetes. *J Clin Immunol*, 1999, *19* : 127-134.
34. ARIF S, TREE TI, ASTILL TP et al. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J Clin Invest*, 2004, *113* : 451-463.
35. MALLONE R, MARTINUZZI E, BLANCOU P et al. CD8+ T-Cell Responses Identify Beta-Cell Autoimmunity in Human Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2007, *56* : 613-621.
36. REJONEN H, MALLONE R, HENINGER AK et al. GAD65-Specific CD4+ T-Cells with High Antigen Avidity Are Prevalent in Peripheral Blood of Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 2004, *53* : 1987-1994.
37. TOMA A, HADDOUK S, BRIAND JP et al. Recognition of a subregion of human proinsulin by class I-restricted T cells in type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, *102* : 10581-10586.
38. TOMA A, LAIKA T, HADDOUK S et al. Recognition of human proinsulin leader sequence by class I-restricted T-cells in HLA-A*0201 transgenic mice and in human type 1 diabetes. *Diabetes*, 2009, *58* : 394-402.
39. KENT SC, CHEN Y, BREGOLI L et al. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature*, 2005, *435* : 224-228.
40. THEBAULT-BAUMONT K, DUBOIS-LAFORGUE D, KRIEF P et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest*, 2003, *111* : 851-857.
41. MORIYAMA H, ABIRU N, PARONEN J et al. Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin 1) for insulinitis and diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, *100* : 10376-10381.
42. YAMAMOTO T, YAMATO E, TASHIRO F et al. Development of auto-immune diabetes in glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) knockout NOD mice. *Diabetologia*, 2004, *47* : 221-224.
43. KUBOSAKI A, MIURA J, NOTKINS AL. IA-2 is not required for the development of diabetes in NOD mice. *Diabetologia*, 2004, *47* : 149-150.
44. FRENCH MB, ALLISON J, CRAM DS et al. Transgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 1997, *46* : 34-39.
45. KOCZWARA K, BONIFACIO E, ZIEGLER AG. Transmission of maternal islet antibodies and risk of auto-immune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes. *Diabetes*, 2004, *53* : 1-4.
46. KAY TW, PARKER JL, STEPHENS LA et al. RIP-beta 2-microglobulin transgene expression restores insulinitis, but not diabetes, in beta 2-microglobulin null nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 1996, *157* : 3688-3693.
47. BOTTAZZO GF, DEAN BM, MCNALLY JM et al. In situ characterization of auto-immune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med*, 1985, *313* : 353-360.
48. HANNINEN A, JALKANEN S, SALMI M et al. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1992, *90* : 1901-1910.
49. ITOH N, HANAFUSA T, MIYAZAKI A et al. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest*, 1993, *92* : 2313-2322.
50. SOMOZA N, VARGAS F, ROURA-MIR C et al. Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *J Immunol*, 1994, *153* : 1360-1377.
51. CONRAD B, WEIDMANN E, TRUCCO G et al. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature*, 1994, *371* : 351-355.
52. FOULIS AK, MCGILL M, FARQUHARSON MA. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol*, 1991, *165* : 97-103.
53. HARRISON LC, HONEYMAN MC, DE AIZPURUA HJ et al. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 1993, *341* : 1365-1369.

54. DURINOVIC-BELLO I, HUMMEL M, ZIEGLER AG. Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes*, 1996, *45* : 795-800.
55. TREE TI, DUINKERKEN G, WILLEMEN S et al. HLA-DQ-regulated T-cell responses to islet cell autoantigens insulin and GAD65. *Diabetes*, 2004, *53* : 1692-1699.
56. ALLEVA DG, CROWE PD, JIN L et al. A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin. *J Clin Invest*, 2001, *107* : 173-180.
57. RAJU R, MUNN SR, DAVID CS. T cell recognition of human pre-proinsulin peptides depends on the polymorphism at HLA DQ locus : a study using HLA DQ8 and DQ6 transgenic mice. *Hum Immunol*, 1997, *58* : 21-29.
58. HERMAN AE, TISCH RM, PATEL SD et al. McDevitt. Determination of glutamic acid decarboxylase 65 peptides presented by the type I diabetes-associated HLA-DQ8 class II molecule identifies an immunogenic peptide motif. *J Immunol*, 1999, *163* : 6275-6282.
59. ENDL J, OTTO H, JUNG G et al. Schendel. Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T lymphocytes of recent onset IDDM patients. *J Clin Invest*, 1997, *99* : 2405-2415.
60. PEAKMAN M, TREE TI, ENDL J et al. Characterization of preparations of GAD65, proinsulin, and the islet tyrosine phosphatase IA-2 for use in detection of autoreactive T-cells in type 1 diabetes : report of phase II of the Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T-cell assays in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2001, *50* : 1749-1754.
61. MARTINUZZI E, NOVELLI G, SCOTTO M et al. The frequency and immunodominance of islet-specific CD8+ T-cell responses change after type 1 diabetes diagnosis and treatment. *Diabetes*, 2008, *57* : 1312-1320.
62. HASSAINYA Y, GARCIA-PONS F, KRATZER R et al. Identification of naturally processed HLA-A2--restricted proinsulin epitopes by reverse immunology. *Diabetes*, 2005, *54* : 2053-2059.
63. JARCHUM I, NICHOL L, TRUCCO M et al. Identification of novel IGRP epitopes targeted in type 1 diabetes patients. *Clin Immunol*, 2008, *127* (3) : 359-365.
64. BAKER C, PETRICH DE MARQUESINI LG, BISHOP AJ et al. Human CD8 responses to a complete epitope set from preproinsulin : implications for approaches to epitope discovery. *J Clin Immunol*, 2008, *28* (4) : 350-360.
65. PINKSE GG, TYSMA OH, BERGEN CA et al. Autoreactive CD8 T cells associated with β -cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, *102* : 18425-18430.
66. SKOWERA A, ELLIS RJ, VARELA-CALVIÑO R et al. CTLs are targeted to kill β cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J Clin Invest*, 2008, *118* : 3390-3402.
67. ORESIC M, SIMELL S, SYSI-AHO M et al. Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet auto-immunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med*, 2008, *205* : 2875-2984.