

Sommaire

DEDICACE.....	vi
REMERCIEMENTS.....	vii
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES PUBLICATIONS	xiv
RESUME.....	xv
AVANT-PROPOS	xvii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
PARTIE I.1: Diabète du sujet d'origine africaine	6
Section 1: Epidémiologie du diabète en Afrique	6
1.1. Prévalence du diabète de type 2	7
1.2. Principaux facteurs de risque du diabète de type 2	7
1.3. Les projections	9
1.4. Epidémiologie du diabète de type 1	9
Section 2: Spécificités cliniques.....	10
2.1. Les complications.....	10
2.2. Les diabètes atypiques.....	12
Section 3: Diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD)	14
Article 1: Pathophysiology of ketosis-prone atypical diabetes	16
PARTIE I.2: Infections virales et diabète en Afrique	17
Article 2: Infections virales et diabète en Afrique	18
PARTIE I.3: Inflammation et diabète	19
1. Inflammation et diabète de type 2	19
Article 3: Diabetes mellitus and inflammation	20
2. Inflammation et diabète de type 1	21

3. Inflammation et diabète non auto-immun à tendance cétosique	21
CHAPITRE II: OBJECTIFS	22
CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES.....	24
1. Type d'étude.....	25
2. Lieu et durée d'étude	25
3. Population d'étude.....	25
4. Collecte des données	26
4.1. Examen clinique	26
4.2. Echantillons biologiques	28
5. Transfert des échantillons biologiques	29
6. Dosages biochimiques.....	29
6.1. Mesure de la glycémie capillaire.....	29
6.2. Dosage de l'Hémoglobine glyquée	30
6.3. Dosage sérologique des auto-anticorps GAD, IA-2 et ICA	30
6.4. Dosage des paramètres du profil lipidique	31
6.5. Dosage du peptide-C	32
6.6. Dosage de l'insuline	34
7. Interprétation de l'insulinosécrétion et de l'insulinoresistance.....	35
8. Sérologie HHV8 et détection de l'ADN viral HHV8.....	36
8.1. Sérologie HHV8.....	36
8.2. Détection de l'ADN viral HHV8	37
9. Dosage des marqueurs de l'inflammation	38
10. Analyse statistique.....	38
11. Considérations éthiques.....	38
CHAPITRE IV: RESULTATS	39
PARTIE IV.1: Fréquence et caractéristiques cliniques du diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD) dans notre population	41
Article 4: Ketosis-prone atypical diabetes in Cameroonian patients with hyperglycaemic crisis: frequency, clinical and metabolic phenotypes.	42
PARTIE IV.2: Etude de l'association entre l'infection par le virus HHV8 et les phénotypes de diabète	43
1. Fréquence du virus HHV8 dans la population	43
1.1. Sérologie HHV8 dans la population générale (KPD et DT2)	43
1.2. Sérologie HHV8 en fonction du phénotype de diabète (KPD1, KPD2 et DT2).....	43

1.3. Détection de l'ADN viral HHV8 en fonction du phénotype de diabète (KPD1, KPD2 et DT2)	44
2. Association entre la présence du virus HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance)	44
2.1. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) dans la population générale	45
2.2. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients diabétiques de type 2	46
2.3. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD	47
2.4. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD en phase cétosique	48
2.5. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD en phase non cétosique	49
2.6. Association entre la présence de l'ADN viral HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) dans la population générale	50
2.7. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) en l'absence de l'ADN viral dans la population générale.....	51
PARTIE IV.3: Profil inflammatoire associé aux phénotypes de diabète et au statut viral	52
1. Profil inflammatoire en fonction du phénotype de diabète	53
1.1. Profil inflammatoire chez les patients KPD versus patients diabétiques de type 2	53
1.2. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase cétosique versus KPD en phase non cétosique.....	54
1.3. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase cétosique versus patients diabétiques de type 2	55

1.4. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase non cétosique versus patients diabétiques de type 2.....	56
2. Profil inflammatoire en fonction du statut viral	57
2.1. Profil inflammatoire dans la population générale en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	57
2.2. Profil inflammatoire chez les patients diabétiques de type 2 en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	58
2.3. Profil inflammatoire chez les patients KPD en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	59
2.4. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase cétosique en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	60
2.5. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase non cétosique en présence et en absence des anticorps anti-HHV8.....	61
2.6. Profil inflammatoire dans la population générale en présence et en absence de l'ADN viral HHV8.....	62
2.7. Profil inflammatoire chez les patients diabétiques de type 2 en présence et en absence de l'ADN viral HHV8	63
2.8. Profil inflammatoire chez les patients KPD en présence et en absence de l'ADN viral HHV8.....	64
2.9. Profil inflammatoire chez les patients positifs aux anticorps anti-HHV8 et sans ADN viral en comparaison au patients sans anticorps anti-HHV8.....	65
2.10. Profil inflammatoires en présence et/ ou en absence de l'ADN viral HHV8 chez des patients présentant ou pas une cétonurie.	66
2.11. Profil inflammatoire en présence et/ ou en absence des anticorps anti-HHV8 chez des sujets présentant ou pas une cétonurie.....	73
CHAPITRE V: DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	77
DISCUSSION GENERALE	78
Partie V.1: Fréquence et caractéristiques cliniques du diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD) au sein de notre population.....	78
Partie V.2: Etude de l'association entre l'infection par virus HHV8 et les phénotypes de diabète	80
Partie V.3: Profil inflammatoire associé aux phénotypes de diabète et au statut viral. ...	83
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	84
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	86

ANNEXES.....	97
ANNEXE 1: Liste des publications en rapport avec le sujet de thèse	98
Article 5: Association of HLA class II markers with autoantibody-negative ketosis-prone atypical diabetes compared to type 2 diabetes in a population of sub-Saharan African patients.	99
Article 6: Seasonality in diabetes in Yaounde, Cameroon: a relation with precipitation and temperature.	100
Article 7: Fasting insulin sensitivity indices are not better than routine clinical variables at predicting insulin sensitivity among Black Africans: a clamp study in sub-Saharan Africans.	101
ANNEXE 2: Autorisations administratives de recherche	102

DEDICACE

A mes parents le Dr. Yimagou Isaac et Madame Yimagou Hélène

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres du jury: le président, le Professeur Pascal Ferré ; les rapporteurs les Professeurs Freddy Penfornis et Pierre-Jean Guillausseau ; et les examinateurs, le Professeur Wilfred Mbacham et le Docteur Olivier Bourron, qui ont accepté de me consacrer une partie de leur temps précieux.

Ce travail n'aurait pas pu être mené à son terme sans la participation et le soutien de certaines personnes que je voudrais également remercier. Il s'agit:

Du Professeur Jean Claude Mbanya, directeur de ce travail. Professeur, merci pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de superviser ce travail malgré vos multiples occupations. Votre disponibilité, votre rigueur, vos conseils judicieux et votre soutien sans faille ont été précieux pour la réalisation de ce travail.

Du Professeur Eugène Sobngwi, directeur de cette thèse. Professeur, je n'oublierai jamais le jour de notre rencontre dans l'escalier du bâtiment de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I. Tout de suite, j'avais perçu qu'on ferait de grandes choses ensemble. Voilà, vous m'avez initié à la recherche et intensifié en moi l'amour du travail bien fait; la recherche de l'excellence et l'humilité. Merci pour l'encadrement de ce travail et la formation reçue. Apprendre auprès de vous a été et restera une expérience des plus enrichissantes. Si ce travail présente ses mérites, que tout l'honneur vous revienne.

Du Professeur Jean François Gautier, directeur de cette thèse. Professeur, merci d'avoir cru en moi et d'avoir accepté de diriger ce travail. Votre dynamisme, votre rigueur, votre disponibilité ainsi que votre gentillesse m'ont été d'une aide capitale dans la réalisation de ce travail. Je vous en suis infiniment reconnaissant des moyens que vous avez mis en œuvre afin que je puisse le mener à bien. Que ce travail soit le témoignage de ma sincère gratitude.

De tout le personnel du Centre National d'Obésité de l'Hôpital Central de Yaoundé, tous les membres du Laboratoire de Médecine Moléculaire et de Métabolisme de l'Université de Yaoundé I ainsi que tous les membres du groupe de recherche « Health of Populations in Transition » (HoPiT). Merci pour votre collaboration très sympathique ainsi que vos conseils et encouragements.

Du Docteur Fabienne Foufelle, responsable de l'UMR-S 1138, Pathogénèse Cellulaire et Clinique du Diabète, Centre de Recherches des Cordeliers, Paris. Vous m'avez chaleureusement accueilli au sein de votre équipe de recherche. Merci pour vos

conseils, et pour tous les moyens mis à ma disposition pour l'apprentissage des techniques de recherche, et l'enrichissement scientifique à travers les réunions du Mercredi matin.

De tous les membres de l'équipe de recherche de l'UMR-S 1138, pour le soutien, les encouragements et les bons moments passés ensemble.

Du Docteur Jérôme Legoff. Merci pour l'intérêt que vous avez manifesté pour mon travail tout en acceptant d'une part, de m'accueillir au sein de votre service pour les analyses de la partie virologique de ma thèse et, d'autre part, de participer à mon comité de mi-thèse de doctorat en tant qu'expert scientifique. Je vous suis infiniment reconnaissant des moyens que vous avez mis en œuvre afin que je puisse mener à bien ce travail.

Du Docteur Philippe Boudou, votre engagement dans cette étude, votre rigueur scientifique et l'amour du travail qui vous caractérise ont été pour moi une source d'enrichissement à nul autre pareil. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Du Docteur Jean Louis Nguewa. Merci de votre aide. Votre implication maximale dans mon travail de thèse n'a jamais été feinte et je vous en suis très reconnaissant.

Des Docteurs Jean Jacques Noubiap, Eric Balti et Stephane Zingue. Un grand merci pour nos discussions amicales et scientifiques, et pour avoir accepté de relire ce manuscrit.

Des Docteurs Marcel Azabji Kenfack, Barbara Atogho-Tiedeu et Felix Assah. Merci pour vos encouragements, votre disponibilité, votre encadrement et vos précieux conseils.

De mes parents bien aimés, le Docteur Issac YIMAGOU et Mme Helène YIMAGOU. Merci pour tous les sacrifices consentis pour mon bien-être et ma réussite dans mes études et dans la vie. Sans vous, je ne serais pas là aujourd'hui. Je me souviendrai toujours de l'attention particulière que vous portez à vos enfants.

A ma sœur Edwige MAHATA et mes frères Edmond KUETE Yimagou, Edgar KENNE Yimagou, Elvis TIOMATSA Yimagou, Evariste FOPA Yimagou. Merci pour vos encouragements et votre soutien inestimables.

De ma tante Eugenie Fadio. Ta présence et ton soutien ont été des atouts considérables pour l'avancement et l'aboutissement de ce travail.

De tous les autres membres de ma famille ainsi que mes amis, pour tout le soutien et l'appui qu'ils m'ont toujours apportés.

J'adresse des remerciements particuliers à tous les volontaires qui ont contribué à l'avancement de la science en participant à cette étude.

Enfin, mes remerciements vont à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et qui ne sont pas citées ici.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac:	Anticorps
ADA:	<i>American Diabetes Association</i>
ADN:	Acide désoxyribonucléique
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DT1:	Diabète de type 1
DT2:	Diabète de type 2
EDTA:	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FID:	Fédération Internationale du Diabète
GIP:	<i>Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide</i>
GLP-1:	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
HbA1c:	Hémoglobine glycosylée
HDL-C:	<i>High Density Lipoprotein Cholesterol</i>
HHV6:	<i>Human Herpes Virus type 6</i>
HHV8:	<i>Human Herpes Virus type 8</i>
HLA:	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HOMA-IR:	<i>Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance</i>
HOMA- β :	<i>Homeostasis Model Assessment of β cell function</i>
IDF:	<i>International Diabetes Federation</i>
IF:	Immunofluorescence
IgG:	Immunoglobuline
IL-8:	<i>Interleukin-8</i>
IMC:	Indice de Masse Corporelle
KPD:	<i>Ketosis-Prone Diabetes</i>
KPD1:	<i>Acute phase ketosis-prone diabetes</i> (Phase aigüe cétosique du diabète atypique à tendance cétosique)
KPD2:	<i>Acute phase non ketotic-KPD</i> (Phase aigüe non (post)-cétosique du diabète atypique à tendance cétosique)
LDL-C:	<i>Low Density Lipoprotein Cholesterol</i>
MCP-1:	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>

MIP1- α :	<i>Macrophage Inflammatory Protein one alpha</i>
MIP1- β :	<i>Macrophage Inflammatory Protein one beta</i>
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
PAD:	Pression Artérielle Diastolique
PAS:	Pression Artérielle Systolique
PBMC:	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS:	Phosphate-Buffered Saline
PPAR γ :	<i>Peroxisome Proliferator Activating Receptor gamma</i>
RTH:	Ratio tour de Taille sur tour de Hanche
TA:	Tissu Adipeux
TG:	Triglycérides
TNF α :	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Sérologie HHV8 dans la population générale.....	43
Tableau II: Sérologie HHV8 en fonction du phénotype de diabète	43
Tableau III: Détection de l'ADN viral HHV8 en fonction du phénotype de diabète	44
Tableau IV: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques dans la population générale	45
Tableau V: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients diabétiques de type 2	46
Tableau VI: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients KPD	47
Tableau VII: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD1...	48
Tableau VIII: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD2...	49
Tableau IX: Association entre la présence de l'ADN viral HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques dans la population générale	50
Tableau X: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques en l'absence de l'ADN viral dans la population générale	51
Tableau XI: Profil inflammatoire chez les patients KPD versus DT2	53
Tableau XII: Profil inflammatoire chez patients KPD1 vs KPD2	54
Tableau XIII: Profil inflammatoire chez les patients KPD1 vs DT2	55
Tableau XIV: Profil inflammatoire chez les patients KPD2 vs DT2.....	56
Tableau XV: Profil inflammatoire dans la population générale en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	57
Tableau XVI: Profil inflammatoire chez les patients DT2 en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	58
Tableau XVII: Profil inflammatoire chez les patients KPD en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	59
Tableau XVIII: Profil inflammatoire chez les patients KPD cétosique en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	60
Tableau XIX: Profil inflammatoire chez les patients KPD non cétosique en présence et en absence des anticorps anti-HHV8	61

Tableau XX: Profil inflammatoire dans la population générale en présence et en absence de l'ADN viral HHV8.....	62
Tableau XXI: Profil inflammatoire chez les patients diabétiques de type 2 en présence et en absence de l'ADN viral HHV8	63
Tableau XXII: Profil inflammatoire chez les patients KPD en présence et en absence de l'ADN viral HHV8.....	64
Tableau XXIII: Profil inflammatoire chez les patients positifs aux des anticorps anti-HHV8 et sans ADN viral.....	65

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Concentration de MIP1- α chez les sujets KPD1 sans ADN viral versus KPD2 sans ADN viral.....	66
Figure 2: Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD1 sans ADN viral versus DT2 sans ADN viral.....	67
Figure 3: Concentration de TNF- α chez les sujets KPD1 avec ADN viral versus KPD2 sans ADN viral.....	68
Figure 4: Concentration de TNF- α chez les sujets KPD1 avec ADN viral versus DT2 sans ADN viral.....	69
Figure 5: Concentration de TNF- α chez les sujets KPD1 avec ADN viral versus DT2 avec ADN viral.....	70
Figure 6: Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD2 sans ADN viral versus DT2 sans ADN viral.....	71
Figure 7: Concentration de MIP1- β chez les sujets KPD2 sans ADN viral versus DT2 sans ADN viral.....	72
Figure 8: Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 sans anticorps anti-HHV8	73
Figure 9: Concentration de MIP1- β chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 sans anticorps anti-HHV8	74
Figure 10: Concentration de MIP1- α chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 avec anticorps anti-HHV8.....	75
Figure 11: Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 avec anticorps anti-HHV8	76

LISTE DES PUBLICATIONS

Article 1: Eugene Sobngwi, **Lontchi-Yimagou Eric**, Simeon-Pierre Choukem, Jean-Louis Nguewa, Jean Claude Mbanya, Jean-Francois Gautier. Pathophysiology of ketosis-prone atypical diabetes. *Diabetologia*. Soumis, 2015.

Article 2: Nguewa JL, **Lontchi-Yimagou E**, Riveline JP, Choukem SP, Balde N, Mbanya JC, Sobngwi E, Gautier JF. Infections virales et diabète en Afrique. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 2015, 9(2) :151-157.

Article 3: **Lontchi-Yimagou E**, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. *Current Diabetes Report*. 2013, 13(3): 435-444.

Article 4: **Lontchi-Yimagou E**, Nguewa JL, Assah F, Noubiap JJ, Boudou P, Djahmeni E, Atogho-tiedeu B, Gautier JF, Mbanya JC, Sobngwi E. Ketosis-prone atypical diabetes in Cameroonian patients with hyperglycaemic crisis : frequency, clinical and metabolic phenotypes. *BMC Endocrine Disorders*. Soumis, 2015.

Article 5: Balti EV, Ngo-Nemb MC, **Lontchi-Yimagou E**, Atogho-Tiedeu B, Effoe VS, Akwo EA, Dehayem MY, Mbanya JC, Gautier JF, Sobngwi E. Association of HLA class II markers with autoantibody-negative ketosis-prone atypical diabetes compared to type 2 diabetes in a population of sub-Saharan African patients. *Diabetes Research Clinical Practice*. 2015,107 (1): 31-36.

Article 6: **Lontchi-Yimagou Eric**, Maurice Tsalefac, Leonelle Monique Teuwa Tapinmene, Jean Jacques N. Noubiap, Eric Vounsia Balti, Mesmin Dehayem, Jean-Louis Nguewa, Eugene Sobngwi. Seasonality in diabetes in Yaounde, Cameroon: a relation with precipitation and temperature. *BMC Public Health*. Soumis, 2015.

Article 7: Sobngwi E, Kengne AP, Echouffo-Tcheugui JB, Choukem S, Sobngwi-Tambekou J, Balti EV, Pearce MS, Siaha V, Mamdjokam AS, Effoe V, **Lontchi-Yimagou E**, Donfack OT, Atogho-Tiedeu B, Boudou P, Gautier JF, Mbanya JC. Fasting insulin sensitivity indices are not better than routine clinical variables at predicting insulin sensitivity among Black Africans: a clamp study in sub-Saharan Africans. *BMC Endocrine Disorders*. 2014, 9;14:65.

RESUME

Le Ketosis-Prone Diabetes (KPD) est un phénotype de diabète intermédiaire entre le diabète de type 1 et le diabète de type 2, fréquemment rencontré chez le sujet d'origine noire africaine. Cette forme de diabète suscite un intérêt certain de par son évolution clinique marquée notamment par la restauration de l'insulinosécrétion initialement altérée. Sobngwi et coll. en 2008 ont établi une association entre le virus HHV8 et le KPD chez des sujets Africains vivant en France. Nulle part ailleurs l'étude n'a été reproduite. L'objectif de cette thèse était de rechercher la potentielle association entre l'infection à HHV8 et le KPD ; puis d'évaluer l'impact de l'infection à HHV8 sur le profil inflammatoire des phénotypes du diabète de type 2. L'étude s'appuie sur une population de patients Africains vivant en Afrique admis consécutivement pour une décompensation hyperglycémique (glycémie à jeun $\geq 2,5$ g/l) au Centre National d'Obésité de l'Hôpital Central de Yaoundé. Plus spécifiquement, il était question de :

- étudier la fréquence du diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD);
- étudier l'association entre le virus HHV8 et le KPD;
- rechercher si l'infection à HHV8 est associée à un profil inflammatoire pouvant participer aux phénotypes de diabète.

Etait inclus dans l'étude tout patient diabétique âgé de plus de 18 ans présentant un diabète aigu avec syndrome cardinal et cétonurie (KPD1), ceux ayant présenté un diabète inaugural aigu avec syndrome cardinal et cétonurie et en rémission depuis plus de trois mois et sans cétonurie à l'inclusion (KPD2), et ceux présentant un diabète de type 2 connu sans cétonurie (DT2). Etait exclu de l'étude tout patient présentant des stigmates d'auto-immunité du diabète de type 1 A, un diabète « MODY », une endocrinopathie, une maladie du pancréas, ou un diabète de type auto-immun.

Chez l'ensemble des participants admis, nous avons collecté les données cliniques (le poids, la taille, l'IMC, le rapport tour de taille sur tour de hanche, la pression artérielle, et le pourcentage de graisse) et des prélèvements à jeun ont été effectués (sérum et cellules mononuclées du sang périphérique) pour les analyses biologiques : la glycémie par glucose oxydase, l'HbA1c par HPLC, les paramètres du profil lipidique par des méthodes enzymatiques, les concentrations d'insuline et de peptide-C par électrochimiluminescence, les anticorps anti-HHV8 par immunofluorescence, l'ADN viral HHV8 par PCR en temps réel, et les marqueurs de l'inflammation par le Luminex). Les indices HOMA- β et HOMA-IR ont été

utilisés pour évaluer l'insulinosécrétion et la sensibilité à l'insuline respectivement. Les marqueurs sérologiques de l'inflammation recherchés étaient : TNF- α , MCP-1, IL-8, MIP-1 β , VEGF et MIP-1 α .

Au total, 173 patients ont été inclus, parmi lesquels 124 DT2, 49 KPD dont 34 KPD1 et 15 KPD2. Les patients KPD représentent environ 1/3 de la population étudiée. La séroprévalence des anticorps anti-HHV8 dans la population générale étudiée était de 50,9% (88 sur 173 patients). Elle était de 38,8% (19 sur 49 patients) chez les patients KPD et de 55,6% chez les DT2 (69 sur 124 patients) ($p=0,06$). Notre étude ne fait pas ressortir de séroprévalence HHV8 accrue chez les patients KPD. L'ADN viral HHV8 était absent chez les sujets KPD2. Toutefois les KPD1 et les DT2 ont présenté de l'ADN viral à fréquence comparable (11,8% vs 9%) ($p=0,4$). La charge virale HHV8 médiane était de 555 et 830 copie/ml chez les KPD1 et DT2 respectivement ($p=0,94$). Au plan clinique et métabolique, la présence de l'ADN viral HHV8 est associée à un déficit de sécrétion en insuline (ce traduisant par des concentrations de peptide-c et un HOMA- β bas), des taux de cholestérol total et de LDL cholestérol plus élevés et un indice de masse corporelle plus bas. En revanche, en absence de l'ADN viral, la positivité aux anticorps anti-HHV8 est associée à une meilleure sécrétion en insuline. Au plan de la population générale du groupe de patients sélectionnés parmi les sujets détectés positifs pour les anticorps anti-HHV8 vs les sujets négatifs, indépendamment de leurs phénotypes de diabète, nous ne retrouvons pas de différence significative parmi les six cytokines et chemokines testées (TNF- α , MCP-1, MIP1- α , IL-8, MIP1- β , VEGF). Les mêmes résultats sont obtenus chez les sujets détectés positifs pour l'ADN viral vs les sujets négatifs. Les patients en décompensation cétosique avaient un profil plus proinflammatoire que les patients hors cétose. Au sein de la population des patients en décompensation cétosique, la présence de l'ADN viral ou des anticorps anti-HHV8 est associé à une augmentation du profil inflammatoire.

Contrairement à nos résultats attendus, le KPD n'est pas associé au virus HHV8 en Afrique. Cependant, nous retrouvons chez ceux qui sont en décompensation cétosique un profil plus proinflammatoire qui nécessite de poursuivre l'investigation concernant les déterminants environnementaux asymptomatiques notamment d'autres infections virales.

AVANT-PROPOS

Le présent projet de thèse a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Yaoundé I et l'Université de Paris 6 sous la direction des Professeurs Jean Claude Mbanya et Eugène Sobngwi tous deux enseignants à l'Université de Yaoundé I, et sous la co-direction du Professeur Jean François Gautier enseignant à l'Université de Paris 6. Ledit projet de thèse porte sur la question cruciale de la relation qui lie les maladies infectieuses aux maladies métaboliques. En particulier, il était question d'investiguer le lien entre l'infection par le virus de l'herpès de type 8 et une forme atypique de diabète fréquemment observée en Afrique Sub-Saharienne (le diabète non auto-immun à tendance cétosique). Cette forme de diabète suscite un intérêt certain de par son évolution clinique marquée notamment par la restauration de l'insulinosécrétion initialement altérée. Notre travail s'inscrit dans l'axe de recherche de notre laboratoire qui vise à étudier les événements environnementaux susceptibles de modifier le phénotype de certains diabètes. Celui-ci est le fruit de la collaboration fructueuse entre les gouvernements Camerounais et Français à travers un financement du Service de la Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France au Cameroun. Cette thèse a également reçu le financement de l'Institut Servier à travers une bourse de mobilité. La collecte des données (aspects cliniques) a été menée au Centre National d'Obésité de l'Hôpital Central de Yaoundé, au Cameroun, où nous avons effectué des prélèvements biologiques dans une population de patients suivis pour un diabète. Les dosages préliminaires ont été effectués au Laboratoire de Médecine Moléculaire et de Métabolisme (M3Lab) du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé I au Cameroun. Ces échantillons biologiques ont été acheminés à l'Hôpital Saint Louis de Paris, pour la suite des analyses biologiques. Les dosages virologiques et hormonaux ont été réalisés respectivement dans les Services de Microbiologie et d'Hormonologie de l'Hôpital Saint Louis de Paris.

Cette thèse comprend une introduction générale suivie par une revue de la littérature, qui a été organisée en trois grandes parties. Une première sur le diabète du sujet d'origine africaine. Dans cette partie nous nous intéresserons premièrement aux particularités épidémiologiques du diabète en Afrique (section 1), aux spécificités cliniques du diabète en Afrique (section 2) et à la description du phénotype, des données physiopathologiques du diabète non auto-immun à tendance cétosique (section 3). Dans la seconde partie la place des infections virales dans les phénotypes de diabète en Afrique est présentée. Enfin dans une troisième partie, nous discutons du rôle de l'inflammation dans les phénotypes de diabète. Après la revue de la littérature, nous présenterons les objectifs de la thèse, le matériel et les méthodes utilisées, les résultats obtenus, une discussion générale, et enfin une conclusion et perspectives.

INTRODUCTION

Le diabète demeure un problème de santé publique dans le monde du fait de sa progression épidémique. Selon les estimations de la Fédération Internationale du Diabète (FID), la prévalence du diabète à l'échelle mondiale en 2013 était de 382 millions de personnes. La FID estime qu'en 2035, ce chiffre atteindra 592 millions d'individus. Il touche 5,1% de personnes en Afrique(1). Le diabète est un groupe d'affections métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou des deux. Le diabète de type 1 (DT1) et de type 2 (DT2) constituent les formes majeures. Cependant, il existe une forme particulière de diabète fréquemment observée chez les sujets d'origine africaine: le « diabète atypique » (Ketosis-prone diabetes, KPD) qui a été classifié par l'American Diabetes Association (ADA) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en type 1B (type 1 sans évidence d'autoimmunité) par opposition au type 1A lié à une destruction auto-immune des cellules bêta pancréatiques(2, 3).

En effet, dans le DT1, il existe une auto-immunité spécifique, une inflammation et une infiltration à prédominance lymphocytaire et macrophagique des îlots β -pancréatiques, une destruction des cellules β conduisant à un déficit absolu de sécrétion d'insuline. Le DT2 associe des causes multifactorielles dont la résultante est une sécrétion d'insuline insuffisante en réponse au glucose et une insulino-résistance des tissus sensibles à l'action de l'insuline (foie, muscle, tissus adipeux). D'autres anomalies présentes dans le DT2 vont contribuer à entretenir le désordre métabolique, à savoir la sécrétion inappropriée de glucagon, des anomalies de sécrétion et de l'action des incrétines (glucagon-like peptide-1 [GLP-1] et glucose-dependent insulino-tropic polypeptide [GIP]), et une inflammation de bas grade(4-7). La symptomatologie du DT1 et le DT2 chez le sujet africain est similaire à celle décrite dans d'autres populations. Toutefois, on retrouve chez les sujets originaires d'Afrique subsaharienne les auto-anticorps spécifiques au DT1 chez moins de 50 % des DT1 nouvellement diagnostiqués, comparativement aux caucasiens chez qui, ils sont présents chez 60 à 85% des patients(8, 9). Par ailleurs, le génotype HLA de susceptibilité au DT1 (HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8) serait peu associé au DT1 chez les patients d'Afrique subsaharienne(10). Le KPD est un phénotype de diabète intermédiaire entre DT1 et DT2. Il se déclare comme un DT1, avec une cétose, voire une acidocétose, un déficit absolu de sécrétion d'insuline sans facteur de décompensation évident, mais ne présente pas les stigmates d'auto-immunité observés classiquement dans le cas du DT1. Par la suite, la majorité des KPD pourront arrêter la prise d'insuline sur une période pouvant durer des années en maintenant un excellent contrôle métabolique avec un traitement oral et une alimentation équilibrée(11). Il n'existe aucune association entre les allèles ou haplotypes de susceptibilité du diabète de type 1 classique et le

KPD(11, 12). Les personnes atteintes sont majoritairement de sexe masculin, l'âge moyen au moment du diagnostic est compris entre 40 et 45 ans et une minorité de patients présentent une obésité marquée. Initialement décrit dans des populations noires-américaines(13, 14), le KPD a été plus récemment décrit au sein de populations d'origine asiatique(15-17), et chez des caucasiens(18). Le KPD a également été observé dans une population de patients d'origine africaine vivant en France(3). Ce phénotype pourrait représenter environ 10-15% des cas de diabète des populations noires-américaines et noires-africaines(3, 19). Le KPD présente toutes les anomalies métaboliques du DT2, à savoir l'insulinorésistance hépatique, musculaire et adipocytaire, une désensibilisation des cellules β et des cellules α au glucose, et une sécrétion inappropriée de glucagon(20, 21).

La cétose semble, jusqu'à ce jour, la seule anomalie commune avec le DT1. Il est reconnu que la majorité des phénotypes de diabète résulte d'une interaction gène-environnement. Les infections virales pourraient jouer un rôle dans l'apparition, le maintien, ou l'exacerbation, des désordres métaboliques observés au cours des différents types de diabète(22). Certaines infections virales, telles que les infections aux virus de la rubéole, des oreillons, le cytomégalovirus, le virus Epstein-Barr, les rétrovirus, le rotavirus et les entérovirus, sont évoquées comme jouant un rôle dans le déclenchement de la réaction auto-immune dans le DT1(23). L'infection au virus de l'hépatite C, l'infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le traitement antirétroviral augmentent le risque du DT2(24). L'infection au virus humain de l'herpès de type 8 (HHV-8) a été associée à la cétose observée au cours de la décompensation du KPD(25).

Différents mécanismes étiopathogéniques du KPD ont été proposés, tels que: un stress oxydant important, la lipo-glucotoxicité, des facteurs génétiques(11, 26-33). Notre équipe a suggéré l'hypothèse d'une participation virale, au vu du caractère bruyant de la découverte du diabète (décompensation cétosique) et du déficit transitoire de l'insulinosécrétion(20). Le virus de l'herpès humain type 8 (HHV8) est présent à l'état endémique en Afrique subsaharienne, où 30 à 60 % des adultes ont des marqueurs de l'infection HHV8 sans avoir eu de manifestation clinique dans la majorité des cas. Ce virus a été associé au sarcome de Kaposi, qui à son tour est fréquemment associée au diabète(34, 35). Il convient de noter que la distribution géographique du virus HHV8 dans le monde est à quelques exceptions près superposable à celle du KPD. En 2008, notre équipe a établi une association entre le virus de l'herpès HHV8 et le KPD chez des patients Africains vivant en France sur la base de trois d'arguments(20):

- nous avons retrouvé dans notre étude des anticorps anti-HHV8 chez 87% des KPD, contre 15% chez les DT2 et 40% chez les témoins normoglycémiques ;
- l'ADN viral HHV8 a pu être isolé des cellules mononuclées chez 46% des sujets KPD étudiés en phase aiguë de décompensation cétosique, contre 0 % chez les sujets DT2 ;
- au cours de la culture in vitro de cellules β -pancréatiques humaines en présence de HHV8, nous avons pu retrouver les protéines HHV8 dans les cellules beta en culture, montrant la capacité du virus à infecter la cellule β (25).

Ces résultats in vitro, suggèrent que HHV8 puisse infecter directement et sélectivement les cellules β -pancréatiques, induisant un déficit aigu de sécrétion d'insuline et la cétose résultante. Ingianni et coll. en 2007 dans une population Sarde avaient retrouvé de l'ADN viral HHV8 chez 23% de patients ayant un diabète de type 2 contre 12% chez des sujets normoglycémiques(36). Récemment, l'association entre le virus HHV-8 et le DT2 a été également rapportée par Caselli et coll. (2013) au sein d'une population Sarde(37). La séroprévalence des anticorps anti-HHV8 était de 57% chez les sujets DT2, et 17% chez les sujets normoglycémiques(37). Comme les autres virus herpétiques, le virus HHV-8 a la capacité de rester latent dans un contexte d'immunotolérance (latence), et de réactiver sa réplication selon les conditions de vie offertes par l'hôte (réplication lytique). Cette bivalence dans la relation virus-système immunitaire de l'hôte pourrait se superposer à la phase de déficit absolu de sécrétion d'insuline (réplication du virus) suivie d'une reprise de la sécrétion en phase de rémission (latence du virus) dans le KPD. Le virus pourrait également avoir un effet indirect sur la cellule β . Il est en effet possible que la réactivation du virus induise un état pro-inflammatoire délétère à la fonction β -pancréatique.

Dans la continuité des travaux menés par notre équipe nous nous sommes proposé de rechercher la potentielle association entre l'infection à HHV8 et le KPD ; puis d'évaluer l'impact de l'infection à HHV8 sur le profil inflammatoire des phénotypes du diabète de type 2 dans une cohorte d'Africains vivant en Afrique.

Nous avons choisi des sujets Camerounais atteints de KPD et DT2 comme modèle pour caractériser les interactions entre le virus HHV8, l'inflammation et la fonction beta cellulaire.

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE

PARTIE I.1: Diabète du sujet d'origine africaine

Pourquoi une partie spécifique portant sur le diabète du sujet originaire d'Afrique Subsaharienne ?

D'une part, pour des raisons épidémiologiques : la prévalence du diabète sucré est en très forte augmentation en Afrique Subsaharienne. Il est prévu que le nombre de patients soit multiplié par 2,5 entre 2000 et 2025, avec une nette prédominance urbaine (38). De plus, la prévalence est encore plus élevée dans les populations d'origine africaine résidant dans les pays développés (39).

D'autre part, en raison de l'existence de spécificités cliniques et physiopathologiques du diabète chez les patients d'origine africaine : en effet, il a été décrit un phénotype particulier de diabète, classifié par *l'American Diabetes Association* (ADA) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme diabète de type 1B ou diabète de type 1 idiopathique, qui est observé majoritairement au sein des populations noires (Africaines-Américaines, Afro-Caribéennes, ou Africaines Subsahariennes) (19). Cette forme de diabète suscite un intérêt certain de par son évolution clinique marquée notamment par la restauration de l'insulinosécrétion initialement altérée.

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux particularités épidémiologiques du diabète en Afrique (section 1), aux spécificités cliniques du diabète en Afrique (section 2) et à la description du phénotype, et des données physiopathologiques du diabète non auto-immun à tendance cétosique (section 3 : Article 1).

Section 1: Epidémiologie du diabète en Afrique

Elle est la traduction du phénomène de transition épidémiologique. Ce phénomène se caractérise par la régression de la morbi-mortalité liée aux maladies infectieuses, la diminution de la natalité et de la mortalité infantile, et le vieillissement de la population en relation avec le développement socio-économique, combinés à l'augmentation des maladies non-infectieuses, notamment, cardiovasculaires et métaboliques, dont le diabète de type 2. Ainsi, la prévalence du diabète et des maladies cardiovasculaires est en nette augmentation en Afrique en raison principalement du vieillissement des populations (augmentation de

l'espérance de vie) et des modifications des modes de vie liées aux phénomènes d'urbanisation et d'occidentalisation.

L'Europe, par exemple, a connu une transition épidémiologique très progressive, étalée sur 2 à 3 siècles permettant une adaptation. Par contre, l'Afrique est en train de connaître l'une des plus rapides transitions épidémiologiques de l'histoire, en un demi-siècle.

1.1. Prévalence du diabète de type 2

Les données publiées entre 1959 et 1985 font état de taux de prévalence entre 0 et 1,4 % en Afrique Noire et 0,6 à 3,6 % en République Sud-Africaine. Les données plus récentes, qui reflètent à la fois le bénéfice d'une uniformisation méthodologique, et l'effet de l'urbanisation et de l'occidentalisation, indiquent une augmentation remarquable. Trois à quatre décennies après l'indépendance des pays d'Afrique Noire (intervenu autour des années 1960), on observe une croissance de la prévalence du diabète, avec un gradient positif rural – urbain à travers l'ensemble des populations étudiées. La prévalence du diabète est de l'ordre de 0 à 2% dans les zones rurales, et de 1 à 6% en région urbaine d'Afrique Noire. En Afrique du Sud et au Maghreb, des prévalences de 4 à 9% sont rapportées. Les populations d'origine indienne vivant sur le continent africain ont les prévalences les plus élevées, 10-13%. Il est à noter que les populations Noires des Caraïbes, d'Europe et des Etats Unis d'Amérique ont des prévalences de l'ordre de 12 à 14% (40, 41).

1.2. Principaux facteurs de risque du diabète de type 2

En Afrique noire, les facteurs de risque du diabète de type 2 diffèrent peu de ceux identifiés chez les Caucasiens. L'âge, l'urbanisation, l'inactivité physique, le mode d'alimentation, l'obésité sont associés à l'augmentation de la prévalence du diabète. Comme chez les Caucasiens, les facteurs physiopathologiques intervenant dans le développement du diabète de type 2 sont l'insulinorésistance et un déficit de l'insulinosécrétion (42, 43). In fine, les facteurs de risque peuvent être déclinés en facteurs modifiables et non modifiables. Les facteurs de risque non modifiables sont l'âge et l'origine ethnique, et les facteurs modifiables sont ceux liés aux changements de mode de vie en relation avec l'urbanisation.

L'âge: Comme dans les autres populations, la fréquence du diabète de type 2 augmente avec l'âge. Toutefois, il existe une spécificité démographique en Afrique. Entre les indépendances (vers 1960) et les années 1990, l'espérance de vie a presque doublé dans de nombreux pays. Par exemple au Cameroun, l'espérance de vie est passée de 35 ans en 1960 à 57 ans en 1990.

De plus, la régression des maladies infectieuses, et la réduction de la natalité se sont accompagnées de ce phénomène connu sous le terme de transition démographique qui combine la diminution des classes d'âge jeunes et le vieillissement de la population, et favorise l'augmentation de prévalence du diabète de type 2. La pandémie du SIDA tend cependant à infléchir cette tendance.

L'origine ethnique: L'Afrique est le deuxième continent en superficie et abrite environ 800 millions d'habitants répartis au sein d'une soixantaine de nationalités et un millier d'ethnies. Les études de populations multiethniques mettent en évidence des variations de prévalences inter groupes qui ne sont pas expliquées par le seul niveau socio-économique. Ainsi, les populations africaines d'origine indienne ont les prévalences les plus élevées, suivies des populations maghrébines et des populations noires urbaines (40). Les plus faibles prévalences sont retrouvées dans les populations rurales d'Afrique Subsaharienne. A notre connaissance, aucune étude génétique à grande échelle n'a identifié de mutations, polymorphismes ou gènes candidats spécifiques.

L'urbanisation: La résidence urbaine est associée à des prévalences du diabète 1,5 à 4 fois supérieures à celles observées en milieu rural (44). Cette observation est spécifique à l'Afrique et la Chine, ailleurs, il n'existe plus de grande différence de prévalence urbaine - rurale (38). En plus de la résidence urbaine, la durée totale ou le pourcentage d'années de vie passées en milieu urbain sont aussi des facteurs indépendamment associés au diabète de type 2 (45). La population africaine est en majorité rurale (66% rurale et 34% urbaine), cependant le taux de croissance urbaine est très élevé, et l'on estime à 70% la population du continent africain qui résidera en zone urbaine en 2025 (46).

L'inactivité physique: La principale différence entre les populations urbaines et rurales africaines est le niveau d'activité physique, chez les hommes et chez les femmes, quelle que soit la tranche d'âge. Les activités professionnelles en zone rurale sont essentiellement agropastorales et à haute intensité de main d'œuvre, contrairement aux villes qui sont plus occidentalisées et dont marquées par une proportion croissante d'emploi sédentaire. Par ailleurs, la plus grande différence en terme de dépense énergétique quotidienne entre les populations urbaines et rurales est liée à l'usage de la marche comme moyen de transport (47). Quels que soient la tranche d'âge et le sexe, les populations rurales utilisent la marche comme moyen de transport 2 à 5 fois plus souvent que les populations urbaines, et le nombre de minutes de marche est inversement associé au diabète dans ces mêmes populations (48). Les populations rurales africaines ont une activité physique jusqu'à 5 fois plus importante que celles des pays développés d'âge comparable (49-51).

Les habitudes alimentaires: la différence entre les populations urbaines et rurales est moins nette. Dans certaines populations, la consommation calorique quotidienne et l'apport lipidique sont peu différents (52). Toutefois, la consommation de sucres raffinés augmente dans les villes, et les aliments de consommation fréquente en zone urbaine tendent à être d'index glycémique plus élevé que ceux de consommation courante en zone rurale (53). La relation entre l'alimentation et la prévalence du diabète de type 2 en Afrique a été peu étudiée.

L'obésité: Découlant des différences de mode d'alimentation et d'activité physique, l'obésité est beaucoup plus fréquente dans les populations urbaines africaines par rapport aux populations rurales. Par exemple 7.3% vs. 0.2% chez les hommes urbains vs. ruraux et 19.8% vs. 4.2% chez les femmes urbaines vs. rurales en Tanzanie (54). L'obésité est associée de façon indépendante au diabète de type 2 dans ces populations. La prévalence de la surcharge pondérale et de l'obésité est plus élevée encore dans les populations d'origine Afro-caribéennes résidant en Europe et en Amérique.

1.3. Les projections

La conjonction du vieillissement de la population et de l'urbanisation rapide avec l'augmentation de l'inactivité physique et de l'obésité donnera lieu à une multiplication de la prévalence du diabète de type 2 en Afrique. Dans ce continent, le nombre d'adultes vivant avec le diabète passera de 19,8 millions en 2013 à 41,4 millions en 2035, soit une augmentation d'environ 109 % de personnes vivant avec le diabète (1). On estimait à 3,5 millions le nombre de patients diabétiques résidant en Afrique Subsaharienne en 2000, et d'ici à 2025, ce nombre pourrait atteindre 8,4 millions (38). Le diabète qui constitue déjà un problème majeur de santé publique représentera un fardeau sur les systèmes de santé disproportionnés par rapport aux ressources consacrées à la santé dans les pays africains.

1.4. Epidémiologie du diabète de type 1

Les données concernant le diabète de type 1 en Afrique sont rares. Le diabète de type 1 représente jusqu'à 25% des populations de patients en Afrique selon les séries (55-58) et l'incidence annuelle varie de façon significative en fonction du pays. Une seule étude d'incidence dans la population générale a été publiée (59). Des données de registres sont également disponibles pour la Libye (60). Globalement, l'incidence est comprise entre 1,5 et 10,1 nouveaux cas pour 100 000 dans la tranche d'âge de 0 à 19 ans. Ces données sont compatibles avec le concept de gradient nord-sud d'incidence du diabète de type 1.

L'incidence du diabète de type 1 chez les Noirs américains est plus faible que chez les Caucasiens: entre 3,3 à 11,8 pour 100 000 vs. 12,3 à 16,9 pour 100 000 (61). Il est possible que l'incidence du diabète de type 1 soit sous-estimée dans certains pays d'Afrique du fait de la difficulté d'accès aux services de santé et à l'insuline ; la survenue de cette maladie étant alors rapidement mortelle. A l'inverse, les cas de diabètes atypiques insulino-traités peuvent induire une surévaluation de l'incidence compte tenu de l'augmentation de la fréquence du diabète de type 2 à révélation cétosique chez les enfants.

Section 2: Spécificités cliniques

Le diabète est caractérisé dans les populations d'origine africaine par une fréquence élevée des complications aiguës et chroniques, et l'existence de formes cliniques atypiques. Le diabète de type 2 représente la majorité des cas (70-90%), la proportion de patients présentant un diabète de type 1 est variable, pouvant atteindre 25% selon les séries (55, 62). Le diabète dit tropical représente moins de 1% des cas ; alors qu'environ 10 à 16% pourraient avoir un diabète de type 2 à tendance cétosique (40). Le diabète de type 2 est caractérisé chez les patients d'origine africaine par un âge de survenue plus précoce que chez les patients européens ; en moyenne 10 ans plus tôt.

2.1. Les complications

Les complications aiguës sont fréquentes. La mortalité par manque d'insuline n'est cependant pas anecdotique dans certaines régions d'Afrique pour des raisons socio-économiques. Gill et coll. ont rapporté une mortalité de 16% sur 10 ans dans une cohorte de patients ayant un diabète de type 1. La moitié de ces décès était due à des épisodes infectieux ou à une acidocétose (63). Les épisodes infectieux sont fréquents et peuvent être le mode de révélation du diabète chez près d'un patient sur quatre (64).

La prévalence des complications microvasculaires est plus élevée chez les Noirs que chez les Caucasiens. Aux Etats Unis d'Amérique, les patients afro-américains ayant un diabète de type 2 ont 2 à 4 fois plus de risques de développer ce type de complications que les sujets caucasiens (65). Il a été suggéré que ceci soit en relation avec une prédisposition génétique sans que cette hypothèse ne soit jamais confirmée. L'hypertension artérielle et le mauvais équilibre glycémique sont toutefois fréquents, et sont des facteurs de confusion qui rendent difficile l'interprétation des différences inter-ethniques. La prévalence de l'hypertension

artérielle dans les populations d'Afrique Noire, des Caraïbes et des Etats Unis d'Amérique est estimée à 14,26 et 33% respectivement, avec un ratio Noir / Caucasien de l'ordre de 1,5 (66), et contribue probablement à l'aggravation et à la précocité de survenue des complications. Au sein des communautés multiethniques, l'équilibre glycémique est en moyenne moins satisfaisant dans les populations Noires, probablement du fait du statut social et de la difficulté d'accès aux soins (67-69). De plus, l'interprétation des données de prévalence des complications chroniques du diabète est difficile car la durée du diabète peut être sous-évaluée.

Rétinopathie: Elle est observée chez 15 à 55 % des patients, avec une proportion élevée des stades graves (rétinopathie proliférative, atteinte maculaire) chez ceux dont la durée du diabète est supérieure à 5 ans (environ 15%) (70). Le diagnostic tardif du diabète pourrait expliquer que jusqu'à 21 – 25 % des patients de type 2 et 9,5 % des patients de type 1 ont déjà une rétinopathie au moment du diagnostic du diabète (44, 48, 49).

Néphropathie: Les études réalisées en milieu hospitalier révèlent que 32 à 57% des patients ayant une durée connue du diabète moyenne comprise entre 5 et 10 ans ont une micro albuminurie. Un tiers des patients des services d'hémodialyse sont des patients diabétiques, et la fréquence de macro protéinurie est de 5,3 à 28% et augmente avec la durée du diabète. Cependant la prévalence de néphropathie diabétique est probablement moins importante, compte tenu de l'existence de protéinurie d'étiologie parasitaire et drépanocytaire qui n'ont pas été exclues dans toutes les études (70).

Neuropathie: Les symptômes de neuropathies périphériques sont rapportés chez 9,5 à 42% des patients. La dysfonction érectile atteindrait jusqu'à 49% des patients (70). La neuropathie autonome cardiaque lorsqu'elle est recherchée est retrouvée chez un patient diabétique de type 1 sur trois (89). Globalement les symptômes de neuropathie sont très fréquents au moment du diagnostic du diabète et semblent moins influencés par la durée du diabète que la rétinopathie ou la néphropathie (74). Des différences ethniques pourraient exister compte tenu de la fréquence élevée des neuropathies douloureuses chez les patients d'origine maghrébine (97).

Coronaropathie: Les complications macro vasculaires seraient moins fréquentes en Afrique Subsaharienne, mais il existe peu de données sur le sujet en raison de la rareté des facilités diagnostiques. La cardiopathie ischémique est rapportée chez 8,7 % d'une population de diabétiques de type 2 au Burkina Faso (71).

L'hypertrophie et la dysfonction ventriculaires gauches sont plus fréquentes (jusqu'à 50% de patients asymptomatiques) et pourraient expliquer la fréquence élevée d'insuffisance

cardiaque congestive (72, 73). Le caractère pathologique de toutes les anomalies ventriculaires gauches rapportées n'a cependant pas été confirmé par des comparaisons à des populations africaines non diabétiques.

Artériopathie des membres inférieurs et pied diabétique: En fonction de la méthode diagnostique (absence de pouls à l'examen clinique ou lésion objectivable à l'écho-Doppler), des fréquences de 4,4% à 28% sont rapportées dans des séries hospitalières (70).

Les amputations de membre inférieur sont effectuées chez 1,4% à 6,7% des patients et la fréquence des ulcérations des pieds est estimée à 12% parmi les patients diabétiques hospitalisés (16). Au sein d'une cohorte de 2250 patients, l'âge moyen au moment de l'amputation était de 37 ans chez les patients diabétiques de type 1 et 59 ans chez les patients diabétiques de type 2 ; 20% des cas étant considérés d'étiologie ischémique (74). Les lésions d'artérite semblent en effet moins souvent en cause que la neuropathie périphérique et les infections dans le développement et l'évolution des lésions de pied chez les patients d'origine africaine (16).

Accidents vasculaires cérébraux: Leur incidence est difficile à évaluer en raison de la mortalité extrahospitalière. Cependant, la mortalité par des accidents cardiovasculaires en Afrique est 3 à 6 fois supérieure à celle retrouvée en Grande Bretagne, du fait de la prévalence élevée de l'hypertension artérielle non traitée (98).

En conclusion, les lésions macro vasculaires semblent moins fréquentes chez les patients africains vivant en Afrique que chez ceux vivant dans les pays développés et chez les patients caucasiens. A l'inverse, il existe une prévalence élevée des complications micro vasculaires quel que soit le lieu de résidence, mais il a été rapporté que la prévalence des complications néphropathiques étaient plus élevées chez les Africains vivant en Afrique par rapport aux Africains vivant en France et aux caucasiens(75). De ce fait, il est difficile de dire si elle relève d'une prédisposition génétique ou de facteurs de confusion tels que la prévalence élevée d'hypertension artérielle non traitée et le contrôle métabolique non satisfaisant.

2.2. Les diabètes atypiques

Les autres types particuliers comportent le diabète dit tropical ou diabète lié à la malnutrition et le diabète non auto-immun à tendance cétosique.

2.2.1. Le diabète dit « tropical »

Historique: Initialement évoqué en 1907, il fut décrit pour la première fois par Hugh-Jones sous le nom de diabète de type J (pour Jamaïque) dans un sous-groupe de 13 patients d'une population de 215 sujets diabétiques en Jamaïque. Plusieurs descriptions similaires ont suivi en Indonésie, en Ouganda et en Inde (76).

Clinique: Ce type de diabète survient en général avant l'âge de 30 ans et se caractérise par une forte hyperglycémie, un indice de masse corporelle inférieur à 19 kg/m^2 , des antécédents de malnutrition, des besoins quotidiens en insuline élevés ($\geq 1.5 \text{ UI/kg/j}$), une absence de cétose à l'arrêt de l'insuline. Il peut s'accompagner de douleurs abdominales et de calcifications pancréatiques en l'absence d'alcoolisme, d'hyperparathyroïdie et de calculs biliaires. On lui décrit deux formes : l'atteinte pancréatique par carence protéique et la pancréatite fibro-calculuse (77).

La malnutrition: Elle est incriminée comme facteur étiologique, d'où l'appellation de diabète sucré lié à la malnutrition. En effet, au cours du kwashiorkor, état de malnutrition protéino-énergétique sévère, on observe une tendance à une diminution de l'insulinosécrétion et de la tolérance au glucose qui sont réversibles avec la correction de la malnutrition.

Relation avec la consommation de manioc: L'effet possible des toxines de manioc (cyanides) dans l'étiopathogénie de ce type de diabète a été évoqué par Mc Millan et Geevarghese en observant que la distribution géographique du diabète est superposable aux zones de forte consommation de manioc (78). Cependant, bien qu'il ait été montré que l'administration prolongée de manioc chez le rat peut entraîner une hyperglycémie modérée sans diabète franc, des données plus récentes semblent exclure un rôle diabétogène du manioc chez l'animal (79). Les études cas-témoins chez l'homme présentant une pancréatite chronique calcifiante ne retrouvent pas non plus d'association avec la consommation de manioc (76). D'autre part, des prévalences similaires d'intolérance au glucose et de diabète ont été retrouvées dans deux populations rurales tanzaniennes, l'une ayant une alimentation essentiellement à base de manioc et l'autre n'en consommant pratiquement pas (80). De notre point de vue, il n'y a donc pas assez d'évidence en faveur de l'implication du manioc dans l'étiopathogénie du diabète en région tropicale.

2.2.2. Diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD)

Le diabète non auto-immun à tendance cétosique fait l'objet de la section 3 de cette partie.

Section 3: Diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD)

Le KPD est un phénotype de diabète intermédiaire entre DT1 et DT2. Il est caractérisé par la survenue d'un syndrome cardinal avec cétose, chez des sujets âgés en moyenne de 40-45 ans, sans facteur de décompensation au moment du diagnostic évoquant un diabète de type 1. Après un traitement initial par l'insuline, plus de 50% des sujets bénéficient d'un sevrage de l'insuline allant de quatre mois à plus de 10 ans, et présentent un phénotype similaire au diabète de type 2 (non insulino-dépendant), justifiant l'appellation de diabète de type 2 cétosique(81).

Il n'existe aucune association entre les allèles ou haplotypes de susceptibilité du diabète de type 1 classique et le KPD. Nous avons démontré précédemment qu'il n'existe aucune différence dans la fréquence des allèles, des haplotypes et des génotypes de susceptibilité du diabète de type 1 (DRB1, DQB1) chez les KPD en comparaison au DT2(12). Ce travail préliminaire effectué par notre équipe a fait l'objet d'une publication (**Article 5 présenté en annexe**) dans le Journal *Diabetes Research and Clinical Practice*. J'en suis l'un des co-auteurs. Les personnes atteintes du KPD sont majoritairement de sexe masculin, l'âge moyen au moment du diagnostic est compris entre 40 et 45 ans et une minorité de patients présentent une obésité marquée. Initialement décrit dans des populations noires-américaines, le KPD a été plus récemment décrit au sein de populations d'origine asiatique et chez les caucasiens. Le KPD a également été observé dans une population de patients d'origine africaine vivant en France. Ce phénotype pourrait représenter environ 10-15% des cas de diabète des populations noires-américaines et noires-africaines(19). Le KPD présente toutes les anomalies métaboliques du DT2, à savoir l'insulinorésistance hépatique, musculaire et adipocytaire, une désensibilisation des cellules β et des cellules α au glucose, et une sécrétion inappropriée de glucagon. Les études métaboliques suggèrent la présence d'un déficit transitoire de l'insulinosécrétion en réponse au glucose ou au glucagon(20, 21). Les mécanismes à l'origine de ce déficit ne sont pas connus. De nombreuses hypothèses ont été suggérées, notamment: un stress oxydant important, la lipo-glucotoxicité et des facteurs génétiques(82). Aucune de ces hypothèses n'a jusqu'à présent été validée. Pourtant, la compréhension des mécanismes du déficit transitoire de l'insulinosécrétion ouvrirait de nouvelles voies thérapeutiques en vue de

la prolongation de la rémission du type 2 à tendance cétosique et pour la restauration de la capacité fonctionnelle des cellules β dans les autres types de diabète. Au vu du caractère bruyant de la découverte du KPD (décompensation cétosique) et du déficit transitoire de l'insulinosécrétion, notre équipe a suggéré l'hypothèse d'une participation virale. Le virus de l'herpès humain type 8 (HHV8) est présent à l'état endémique en Afrique sub-saharienne, où 30 à 60 % des adultes ont des marqueurs de l'infection HHV8 sans avoir eu de manifestation clinique dans la majorité des cas. Ce virus a été associé au sarcome de Kaposi, qui, à son tour, est fréquemment associé au diabète. En 2008, notre équipe a établi une association entre le virus de l'herpès HHV8 et le KPD chez des patients Africains vivant en France sur la base de trois faisceaux d'arguments:

- premièrement, nous avons retrouvé dans notre étude des anticorps anti-HHV8 chez 87 % des KPD, contre 15 % chez les DT2 et 40 % chez les témoins normoglycémiques;
- deuxièmement, l'ADN viral HHV8 a pu être isolé des cellules mononuclées chez 46 % des sujets KPD étudiés en phase aiguë de décompensation cétonique, contre 0 % chez les DT2 ;
- enfin, au cours de la culture in vitro de cellules β -pancréatiques humaines en présence de HHV8, nous avons pu retrouver les protéines HHV8 dans les cellules β en culture, montrant la capacité du virus à infecter la cellule β (25).

Ingianni et coll. en 2007 dans une population Sarde avaient retrouvé de l'ADN viral HHV8 chez 23% de patients ayant un diabète de type 2 contre 12% chez des sujets normoglycémiques(36). Plus récemment, l'association entre le virus HHV8 et le DT2 a été également rapporté par Caselli et coll. en 2013 au sein d'une population caucasienne (Sarde)(37).

La revue de la littérature portant sur ce phénotype de diabète présenté ci-après a fait l'objet d'une revue de synthèse que nous avons soumise dans le Journal *Diabetologia*.

Article 1: Pathophysiology of ketosis-prone atypical diabetes

Eugene Sobngwi, **Lontchi-Yimagou Eric**, Simeon-Pierre Choukem, Jean-Louis Nguewa, Jean Claude Mbanya, Jean-Francois Gautier. Pathophysiology of ketosis-prone atypical diabetes. *Diabetologia*. 2015, Soumis.

PARTIE I.2: Infections virales et diabète en Afrique

Il est reconnu que la majorité des phénotypes de diabète résultent d'une interaction gène-environnement. Les infections virales en tant que facteur environnemental pourraient jouer un rôle dans l'apparition, le maintien, ou l'exacerbation, des troubles métaboliques observés au cours des différents types de diabète. Certains agents viraux tels que le virus ourlien, les rubiviridae, le cytomégalovirus, le virus Epstein-Barr, les rétrovirus, le rotavirus et les entérovirus, sont évoqués comme jouant un rôle dans le déclenchement de la réaction auto-immune du DT1(23, 83). L'infection au virus de l'hépatite C, l'infection au virus de l'immunodéficience humaine et le traitement antirétroviral augmentent le risque de DT2(24). En 2008, notre équipe a établi une association entre le virus de l'herpès HHV8 et le KPD chez des patients Africains vivant en France(25). Le virus de l'herpès humain type 8 (HHV8) est présent de façon endémique en Afrique sub-saharienne, où 30 à 60 % des adultes asymptomatiques ont des marqueurs de l'infection HHV8. Ce virus a été associé au sarcome de Kaposi, qui à son tour est fréquemment associé au diabète(35, 84).

Il a été démontré que les pathologies qui ont une incidence saisonnière peuvent être attribuées à des infections virales(85). Nous avons précédemment retrouvé une incidence saisonnière du diabète et des décompensations diabétiques à Yaoundé. Pendant 9 ans entre l'année 2000 à 2008 à Yaoundé (Cameroun) nous avons observé que la variation de l'incidence du diabète et ses décompensations était quasiment superposable à celle des précipitations, et que cette incidence semblait plus importante pendant la saison des pluies (**Article 6 présenté en annexe et en révision dans le Journal *BMC Public Health***).

Dans l'article ci-dessous nous présentons une revue sur les infections virales et le diabète en Afrique.

Article 2: Infections virales et diabète en Afrique

Nguewa JL, **Lontchi-Yimagou E**, Riveline JP, Choukem SP, Balde N, Mbanya JC, Sobngwi E, Gautier JF. Infections virales et diabète en Afrique. *Médecine des Maladies Métabolique*. 2015, 9(2): 151-157.

PARTIE I.3: Inflammation et diabète

1. Inflammation et diabète de type 2

Le diabète de type 2 est associé à une inflammation de bas grade qui serait non seulement associée à une carence de sécrétion d'insuline, mais aussi une résistance à l'insuline(5, 86-88). De nombreuses études mettent en évidence une corrélation positive entre l'augmentation du niveau des marqueurs et des médiateurs de l'inflammation et l'incidence du diabète de type 2 et ses complications(89, 90). Le tissu adipeux semble être le site majeur de production de ces marqueurs de l'inflammation qui est le résultat des interactions entre les cellules du tissu adipeux, les macrophages et les autres cellules immunitaires qui infiltrent le tissu adipeux. Les macrophages sont des acteurs majeurs de l'inflammation par leur polarisation M1 ou M2. Ils acquièrent le phénotype M1 après stimulation par l'interféron gamma (IFN- γ) et sécrètent des niveaux élevés de cytokines et chemokines pro-inflammatoires entre autre le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), l'IL-6, MCP-1, IL-8, IL-1 β , et MIP1- α . Les macrophages M2 sont stimulés par IL-4, IL-13 et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β , IL-4, MIP1- β) essentielles pour la résolution de la réponse inflammatoire. Les macrophages M1 produisent des cytokines jouant un rôle clé dans la physiopathologie du diabète. Le lien entre les cytokines pro-inflammatoires et déficit de sécrétion d'insuline a été largement étudié (88, 91-94). Les niveaux de cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages M1 sont élevés dans le sang périphérique des patients présentant un DT2 et ceci a été associé à une altération de la sécrétion d'insuline(86). En outre, les macrophages de type M1 (cytokines pro-inflammatoires) ont été identifiés dans l'autopsie du pancréas des individus atteints de DT2(86, 95) et étaient associés à une déficience de sécrétion en insuline. Les facteurs déclenchants le processus inflammatoire dans le diabète sont mal connus. Cependant, quelques hypothèses ont été suggérées, notamment l'obésité, l'alimentation, les maladies parodontales, le microbiote, l'exposition aux polluants de l'air, le déficit en vitamine C et des facteurs génétiques.

Dans la revue ci-après, nous présentons les évidences qui associent l'inflammation de bas grade et le diabète de type 2, ayant fait l'objet d'une publication dans le Journal *Current Diabetes Reports*.

Article 3: Diabetes mellitus and inflammation

Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. *Current Diabetes Report*. 2013, 13(3): 435-44.

2. Inflammation et diabète de type 1

Le DT1 est une maladie auto-immune avec une forte composante inflammatoire. L'inflammation peut contribuer à l'induction précoce et à l'amplification de l'agression immunitaire contre la cellule bêta du pancréas et, à un stade ultérieur, à la stabilisation et à l'entretien de l'inflammation des îlots (insulite). Les médiateurs inflammatoires contribuent probablement à la baisse de la fonction de la cellule beta et à l'apoptose subséquente; ils peuvent également inhiber ou stimuler la régénération de la cellule bêta et pourraient entraîner une résistance périphérique à l'insuline(96). L'inflammation est médiée à la fois par les cytokines et les chimiokines qui sont libérées par la cellule beta et les cellules immunitaires, et par des signaux immunogènes qui sont livrés par la mort des cellules bêta(96).

3. Inflammation et diabète non auto-immun à tendance cétosique

Très peu d'informations sur le rôle de l'inflammation consécutive au déficit de sécrétion d'insuline au moment du diagnostic du diabète, et à la restauration de la fonction β -cellulaire dans le KPD sont décrites. À notre connaissance, seule l'étude de Brooks-Worrell et coll. en 2013 a montré que la réponse des cellules T spécifiques de la cellule beta était élevée chez les patients KPD(97). Cette étude a également montré que le pourcentage des monocytes pro-inflammatoires CD14 + CD16 + était plus élevé dans le KPD et altéraient plus qu'ils ne préservaient la fonction beta cellulaire. Cependant, cette étude n'a pas identifié le profil des cytokines des macrophages M1 ou M2 et leur relation avec la sécrétion d'insuline. En outre, le *design* de cette étude ne permet pas de distinguer les patients KPD en début de cétose de ceux qui sont en phase non cétosique (rémission).

CHAPITRE II: OBJECTIFS

La question principale que nous nous sommes posés lorsque nous débutions cette thèse était de savoir s'il existe une relation entre l'infection par le virus de l'herpès HHV8 et le KPD. Comme nous l'avons présenté dans notre introduction, en 2008, notre équipe a établi une association entre le virus de l'herpès HHV8 et le diabète atypique à tendance cétosique chez des patients d'origine Africaine vivant en France. L'association entre HHV8 et le diabète de type 2 a été également rapportée par d'autres auteurs parmi lesquels, Ingianni et coll. (2007) et par Caselli et coll. (2013) au sein d'une population Sarde. Cependant le phénotype de diabète n'a pas été décrit dans ces deux études. En dehors des travaux de Sobngwi et coll. en 2008 nul par ailleurs l'association entre le virus HHV8 et le KPD n'avait été reproduite.

Il n'est pas exclu, au vu des résultats des travaux antérieurs que le virus HHV8 puisse directement infecter sélectivement les cellules β -pancréatiques, à l'origine du déficit aigu de sécrétion d'insuline et la cétose résultante. Le virus pourrait également avoir un effet indirect sur la cellule β . Il est en effet possible que la réactivation du virus induise un état pro-inflammatoire délétère à la fonction β -pancréatique.

Au moment où nous avons entrepris ce travail de recherche, il n'existait à notre connaissance aucune donnée concernant la prévalence du KPD en Afrique Sub-saharienne.

Nous avons cherché à répondre à plusieurs questions non résolues jusque-là :

- quelle est l'importance du diabète non auto immunitaire à tendance cétosique (KPD) dans une population de patients vivant avec le diabète en Afrique Sub-saharienne ?
- existe-t-il une association entre HHV8 et le KPD ?
- quels sont les mécanismes possibles associés ?

Dans la continuité des travaux menés par notre équipe, nous nous sommes proposés de rechercher la potentielle association entre l'infection par le virus HHV8 et le KPD ; puis d'évaluer l'impact de l'infection à HHV8 sur le profil inflammatoire des phénotypes du diabète de type 2. Il s'agissait spécifiquement, dans une population de patients admis pour une décompensation hyperglycémique au Centre National d'Obésité de l'Hôpital Central de Yaoundé de:

- étudier la fréquence du diabète non auto-immunitaire à tendance cétosique (KPD) (Partie 1),
- étudier l'association entre le virus HHV8 et le KPD (Partie 2),
- rechercher si l'infection à HHV8 est associée à un profil inflammatoire pouvant participer au phénotype du diabète (Partie 3).

CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES

1. Type d'étude

Il s'agissait d'une étude transversale à visée analytique.

2. Lieu et durée d'étude

Le recrutement des patients, l'examen clinique, la collecte des échantillons sanguins ont été effectués au Centre National d'Obésité (CNO) de l'Hôpital Central de Yaoundé (HCY), Cameroun. Les échantillons biologiques collectés ont été conservés à -80°C au Laboratoire de Médecine Moléculaire et de Métabolisme (M3Lab) du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé I, puis acheminés à l'Hôpital Universitaire Saint-Louis à Paris-France pour les analyses biologiques. La collecte des données a duré 4 mois au total.

3. Population d'étude

La population d'étude était composée de patients diabétiques âgés de plus de 18 ans admis consécutivement au CNO de l'HCY une décompensation hyperglycémique (glycémie capillaire à jeun $\geq 2,5$ g/L).

Critères d'inclusion des patients KPD:

- patient âgé de plus de 18 ans présentant un diabète aigu avec syndrome cardinal et cétonurie. Ils ont été nommés KPD1,
- patient âgé de plus de 18 ans, ayant présenté un diabète inaugural aigu avec syndrome cardinal et cétonurie ; en rémission depuis plus de trois mois, sans traitement par insuline ou par insulinosécréteur oral (sulfamides hypoglycémiants, glinides). Ceux-ci ont été nommés KPD2,
- patient ayant accepté de participer à l'étude et ayant signé librement le consentement éclairé.

Critères d'inclusion des patients DT2:

- patient âgé de plus de 18 ans présentant un diabète de type 2 connu et ayant une glycémie à jeun $\geq 2,5$ g/L sans cétonurie,
- patient ayant accepté de participer à l'étude et ayant signé librement le consentement éclairé.

Critères d'exclusion des patients KPD et DT2:

- tout patient présentant des stigmates d'auto-immunité du diabète de type 1 A (une détermination positive de la décarboxylase de l'acide glutamique 65, phosphatase antityrosine, et des anticorps anti-cellules d'îlots,
- tout patient présentant un diabète « MODY », une endocrinopathie, une maladie du pancréas, ou un diabète de type auto-immun.

Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon a été calculée sur la base de nos objectifs de thèse.

Pour le premier objectif, la prévalence attendue du KPD était de 10 à 15%(19) sur 2000 patients enregistrés aux Centre National d'Obésité de l'Hôpital central de Yaoundé. En considérant une marge d'erreur de 5%, un intervalle de confiance de 95% et la prévalence minimale du KPD attendus (10%), la taille de l'échantillon calculée est de 130 patients.

Pour l'objectif numéro 2, le critère de jugement principal était une différence attendue de 25% de la prévalence de HHV8 entre les patients KPD et les DT2, en prenant en compte une prévalence de 15% des anticorps anti-HHV8 observée dans la population DT2(25), un coefficient α de 5%, β de 20%, une puissance statistique de 90% et un ratio TD2/KPD de 2, la taille minimum d'échantillon calculée est de 54 sujets KPD et 108 sujets DT2 en utilisant un test statistique bilatéral.

4. Collecte des données

La collecte des données a été faite grâce à un questionnaire préétabli lors de l'examen clinique au terme duquel, les prélèvements pour les analyses biologiques ont été effectués.

4.1. Examen clinique

Les participants étaient reçus le matin à partir de 7h 30. Les sujets retenus pour l'étude ont été interrogés et examinés.

4.1.1. Interrogatoire

- ***Antécédents personnels, antécédents familiaux de diabète***

Il a été réalisé à partir d'un questionnaire préétabli. Pour chaque patient nous insistions sur l'âge en années, le sexe, l'âge de découverte du diabète. Les informations étaient gardées

confidentielles, codées, dans une banque de données uniquement accessible par l'équipe scientifique.

- ***Analyse du profil évolutif (cétose initiale et rémission prolongée subséquente)***

Un examen d'urine a été effectué pour la recherche des cétones à l'aide des bandelettes urinaires.

4.1.2. Examen physique

Un examen physique complet a été effectué incluant une mesure du poids, de la taille, de l'indice de masse corporelle, du tour de taille et du tour de hanche, de la pression artérielle et du pourcentage de graisse :

- **Le poids corporel**

Le pèse-personne a été ajusté à 0 kg avant chaque mesure, le patient habillé uniquement de vêtements légers et de chaussettes fines et après avoir vidé sa vessie, se mettait debout au milieu du pèse personne. Les parures étaient éliminées pour permettre une mesure fiable; pendant que le sujet droit debout respirait normalement. Son poids en kilogrammes était noté à 0,5 kg près.

- **La taille**

Le sujet était placé debout droit, le dos contre la base verticale de la toise, les talons joints, et les pointes des pieds légèrement écartées pour permettre une distribution équitable du poids sur les deux jambes. Les bras pendaient librement de part et d'autre du tronc, les paumes faisant face aux cuisses, l'occiput, les épaules, les fesses et les mollets touchaient la base verticale de la toise. La plaque coulissante de la toise (graduée à 0,5 cm près) permettait de localiser le repère supérieur.

- **L'indice de masse corporelle (IMC)**

L'IMC (kg/m²) était obtenu en divisant le poids (exprimé en kilogramme) par le carré de la taille (exprimé en mètre).

- **Le tour de taille**

Le tour de taille était mesuré à l'aide d'un mètre ruban chez le sujet debout en expiration, au milieu de la distance sur la ligne médio-axillaire, entre le sommet de la crête iliaque et la cage thoracique. Il était exprimé à 0,1 cm près.

- **Le tour de hanche**

Au moyen d'un mètre ruban, nous avons effectué à 0,1 cm près, la mesure du tour de hanche à hauteur du tiers supérieur de la distance entre l'épine iliaque antérosupérieure et la rotule.

- **La pression artérielle**

La pression artérielle était obtenue en effectuant la moyenne de deux mesures réalisée à 5 min d'intervalle au bras droit à l'aide d'un tensiomètre électronique (OMRON® MX2 Basic, OMRON HEALTHCARE, INC. Bannockburn, Illinois 60015.CHINA).

- **Bioimpédancemétrie**

La mesure indirecte de l'adiposité totale s'est faite par utilisation de la méthode bio-impédancemétrique par le biais d'un moniteur calibré (TANITA®, TANITA corporation 1-14-2 Maeno-cho, Tabashi-Ku, Tokyo-Japan).

4.2. Echantillons biologiques

Chez l'ensemble des participants à jeun, nous avons effectué un prélèvement veineux à l'aide des aiguilles Vacutainer®. Les échantillons de sang veineux ont été prélevés dans des tubes secs et EDTA (Éthylène Diamine Tétra Acétique); puis laissés 30 minutes au repos dans une pièce à température ambiante. Ces échantillons ont été centrifugés à 2500 tours/min à 4°C pendant 10 minutes. Les sérums et plasmas obtenus ont été mis dans des cryotubes étiquetés grâce à des pipettes Pasteur et stockés à -80°C. Cinq millilitres de sang collecté dans les tubes EDTA ont servi à l'extraction des cellules mononucléaires du sang périphérique (*PBMC*).

- **Séparation *PBMC*:** Dix mL de sang dilué au demi avec du PBS (tampon phosphate pH 7,4, Gibco, Royaume-Uni) sont centrifugés à volume égal de Ficoll (Ficoll de densité $1,077 \pm 0,001$, Amersham Biosciences) à 2500 g pendant 20 minutes. Les *PBMC* concentrées dans un anneau à l'interface plasma / Ficoll sont lavées 2 fois dans du PBS, centrifugées à 1500 g pendant 10 minutes puis éluées dans 1 mL de *freezing medium* (DMSO, 10% et FBS, 90%).

Principe de la séparation des *PBMC* sur gradient de Ficoll:

Après centrifugation du sang total, les érythrocytes et granulocytes sédimentent au fond du tube. Les cellules mononucléaires du sang périphérique (lymphocytes et monocytes) sont isolées sous la forme d'une monocouche au niveau de l'interface plasma / Ficoll.

La densité et la viabilité cellulaire sont mesurées dans du bleu Trypan à 0,4% (Sigma) et à l'aide d'une cellule de Thoma à partir de la formule suivante :

$$N = n \times Fd \times 10000$$

N = nombre de cellules par mL

n = nombre de cellules comptées sur la lame

Fd = facteur de dilution au bleu Trypan

La distinction entre cellules vivantes et cellules mortes se fait grâce au bleu trypan, colorant non toxique, qui a tendance à s'accumuler dans les cellules mortes devenues perméables mais qui est exclu des cellules viables :

- Les cellules bleues correspondent aux cellules mortes : leur numération permet de déterminer la viabilité des cellules,
- Les cellules blanchâtres de taille moyenne sont les cellules mononucléaires,
- Les petites cellules sont les plaquettes.

Les PBMC ont été mis, grâce à des pipettes pasteur dans des cryotubes étiquetés puis conservés à -80°C.

5. Transfert des échantillons biologiques

Tous les échantillons collectés ont été acheminés à l'Hôpital Universitaire Saint-Louis à Paris-France pour les analyses biologiques, dans des glacières contenant la carboglace conservant la chaîne de froid. Le transport était assuré par une compagnie de transport spécialisée.

6. Dosages biochimiques

Les dosages réalisés étaient : la glycémie capillaire, l'hémoglobine glyquée, les paramètres du profil lipidique, l'insuline, le peptide-C, des stigmates d'auto-immunité du diabète de type 1 A (décarboxylase d'acide antigelutamique 65, phosphatase antityrosine, anticorps anti-cellules d'îlots), les anticorps anti HHV8, la charge virale HHV8 (détection de l'ADN viral) et les marqueurs de l'inflammation.

6.1. Mesure de la glycémie capillaire

Le dosage de la glycémie capillaire a été fait à l'aide du lecteur glycémique OneTouch Ultra 2

- **Principe**

Le glucose présent dans l'échantillon de sang s'est mélangé aux biocapteurs de la glucose oxydase de la bandelette de test pour produire un faible courant électrique.

L'intensité du courant électrique variait en fonction de la quantité de glucose dans l'échantillon de sang. Le lecteur mesurait ce courant électrique, calculait le résultat de glycémie, affichait le résultat et le gardait en mémoire.

- ***Procédure***

Une goutte de sang était obtenue en appuyant fermement le dispositif de prélèvement contre le bout du doigt. La deuxième goutte de sang devant être utilisée pour le dosage était obtenue en pressant délicatement le bout du doigt jusqu'à ce qu'une goutte de sang bien ronde se forme. Le sang était aspiré dans la bandelette de test et le niveau de glycémie apparaissait au bout de 5 secondes.

6.2. Dosage de l'Hémoglobine glyquée

La valeur de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) était déterminée à partir d'une goutte de sang, prélevée du sang veineux collecté dans un tube EDTA.

L'automate LabonaCheckTMA1c HbA1c a permis de quantifier l'HbA1c en utilisant les réactifs correspondants.

- ***Principe***

Le test utilise la méthode de chromatographie par affinité de boronate. Le réactif mixé au sang permet la libération de l'hémoglobine par lyse des érythrocytes et sa liaison au boronate. La mixture obtenue est déposée sur une cassette et filtrée. Toute l'hémoglobine (Hb) est retenue formant ainsi un précipité au-dessus du filtre et l'excès de boronate éliminé. Le ratio entre l'HbA1c et l'Hb totale sera déterminé à partir du précipité après introduction dans l'automate.

6.3. Dosage sérologique des auto-anticorps GAD, IA-2 et ICA

Les auto-anticorps de type décarboxylase de l'acide glutamique 65 (GAD), phosphatase antityrosine (IA-2), et des anticorps anti-cellules d'îlots (ICA) ont été recherchés par des méthodes non isotopiques à double anticorps de type ELISA (GAD et IA-2) et par l'immunofluorescence indirect pour ICA.

Le dosage a été effectué chez 72 patients dont, 49 KPD (34 KPD1 et 15 KPD2), et 23 patients diabétiques de type 2 appariés pour le sexe, age, l'indice de masse corporel et la serologie HHV8.

- Le kit *NOVA Lite[®] indirect immunofluorescent assays (Primate Pancreas)* a été utilisé pour la détermination semi quantitative des anti-corps ICA dans le sérum.
- Le kit *RSR GAD65 autoantibody (GAD Ab) ELISA* à été utilisé pour le dosage de l'anti corps GAD dans le sérum.
- Le kit *RSR IA-2 autoantibody (IA-2 Ab) ELISA* à été utilisé pour le dosage de l'anti corps IA-2 dans le sérum.

6.4. Dosage des paramètres du profil lipidique

Le profil lipidique consiste à quantifier le cholestérol total, le HDL-cholestérol, les triglycérides et le LDL-cholestérol présents dans le sérum. A cet effet, les kits cholestérol total, HDL-cholestérol et triglycérides ont respectivement été utilisés, et la formule de Friedewald et collaborateurs a été utilisée pour le calcul du taux sérique de LDL-cholestérol(98).

6.4.1. Dosage du cholestérol total (CT)

Le cholestérol total du sérum a été dosé par une technique enzymatique et colorimétrique modifiée de celle décrite par Allain et collaborateurs en 1974(99).

- ***Principe***

L'enzyme cholestérol estérase catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol pour donner le cholestérol et les acides gras libres. Le cholestérol libre est ensuite oxydé en cholest-4-en-3-one et en peroxyde d'hydrogène en présence de l'enzyme cholestérol oxydase. Le 4-aminoantipyrine et le 4-chlorophénol se combinent à l'eau oxygénée en présence de l'enzyme peroxydase pour produire une quinoneimine de couleur rose, absorbant la lumière à 505 nm. La concentration en cholestérol total de l'échantillon est proportionnelle à l'intensité de la coloration.

6.4.2. Dosage du HDL-cholestérol (HDL-C)

Le HDL-cholestérol présent dans le sérum a été dosé suivant une technique enzymatique et colorimétrique indirecte dérivée de celle décrite par Burstein et collaborateurs en 1970 (100).

- ***Principe***

Les lipoprotéines de très faible densité (*Very Low Density Lipoproteins* ou VLDL), les lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoproteins* ou LDL) et les chylomicrons du

sérum sont précipités par le phosphotungstate en présence d'ions magnésium. Après centrifugation (4000 tpm/20 min), le HDL-cholestérol contenu dans le surnageant est dosé selon le même principe que le cholestérol total.

6.4.3. Dosage des triglycérides (TG)

Les triglycérides présents dans le sérum ont été dosés suivant une technique enzymatique et colorimétrique dérivée de celle décrite par Buccolo et David en 1973(101).

- **Principe**

En présence d'une lipoprotéine lipase (LPL), les triglycérides libèrent le glycérol et les acides gras libres. Ce glycérol est ensuite phosphorylé en glycérol-3-phosphate (G3P) par une glycérol kinase (ATP présent). Le G3P est alors converti par le glycérol phosphate oxydase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier réagit avec le 4-aminoantipyrine et le 4-chlorophénol en présence d'une peroxydase pour produire une quinoneimine de couleur rose absorbant la lumière à 505 nm. La concentration de triglycérides dans le sérum est proportionnelle à l'intensité de la coloration.

6.4.4. Calcul du taux sérique de LDL-cholestérol (LDL-C)

La concentration de lipoprotéine de faible densité a été déterminée grâce à la formule de Friedewald et collaborateurs en 1972(98) :

$$LDL\text{-cholestérol} = \text{Cholestérol total} - HDL\text{-cholestérol} - \text{Triglycérides}/5 \text{ (mg/dL)}$$

NB: Cette formule ne s'applique que lorsque les triglycérides ont une concentration strictement inférieure à 400mg/dL.

6.5. Dosage du peptide-C

Le peptide-C sérique a été dosée par électrochimiluminescence « ECLIA » qui est un test immunologique de type « Sandwich » sur les analyseurs automatiques MODULAR E 170.

- **Principe**

C'est une méthode « Sandwich » utilisant deux anticorps monoclonaux dont l'interaction est spécifique au peptide-C.

1^{ère} incubation : dans une prise d'essai de 20 µL, l'échantillon est mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-peptide-C spécifique biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-peptide-C marqué au ruthénium (Ru (bpy)²⁺3 : Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)). Il se forme un « sandwich ».

2^{ème} incubation : les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.

Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

Réactifs – composition et concentrations

M : Microparticules tapissées de streptavidine, 1 flacon contenant 6,5 mL: microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/mL, conservateur.

R1 : Ac anti- peptide-C~biotine, 1 flacon contenant 9 mL : anticorps monoclonaux (de souris) anti- peptide-C biotinylés 1mg/L ; tampon MES 50 mmol/L, pH 6,0 ; conservateur.

R2 : Ac anti- peptide-C~(Ru(bpy)²⁺₃), 1 flacon contenant 9 mL : anticorps monoclonaux (de souris) anti-peptide-C marqués au ruthénium 1,75 mg/L ; tampon MES 50 mmol/L, pH 6,0 ; conservateur.

MES : acide morpholino-2 éthanesulfonique

Réalisation du test

L'analyseur a effectué automatiquement l'homogénéisation des microparticules. Les informations spécifiques du test mémorisées dans le code-barres étaient saisies. Exceptionnellement, lorsque le code-barres ne pouvait être lu par l'appareil, une saisie manuelle de la série des 15 chiffres inscrits sur l'étiquette était effectuée. Les réactifs préalablement réfrigérés entre 2 et 8°C étaient amenés à environ 20°C avant le chargement et placés dans le plateau réactif de l'appareil thermostaté à 20°C. La formation de la mousse était évitée. L'analyseur a géré le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

Caractéristiques du test

La méthode était standardisée par rapport à la première préparation internationale : 1st IRP WHO reference Standard 66/304 (NIBSC).

Le code-barres des réactifs Elecsys peptide-C contenait toutes les informations nécessaires à la calibration du lot. La courbe de référence était adaptée à l'analyseur à l'aide des calibrateurs Elecsys peptide-C Cal Set.

Une calibration par lot était effectuée en utilisant du réactif frais (ayant été enregistré depuis au maximum 24 heures sur l'analyseur).

L'analyseur calculait automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon.

Le coefficient de variation était de 10%.

6.6. Dosage de l'insuline

L'insulinémie a été dosée par électrochimiluminescence « ECLIA » qui est un test immunologique de type « Sandwich » sur les analyseurs automatiques MODULAR E 170.

• Principe

C'est une méthode « Sandwich » utilisant deux anticorps monoclonaux dont l'interaction est spécifique à l'insuline.

1^{ère} incubation : dans une prise d'essai de 20 µL, l'échantillon est mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-insuline marqué au ruthénium ($\text{Ru}(\text{bpy})^{2+}_3$: Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)). Il se forme un « sandwich ».

2^{ème} incubation : les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.

Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle - ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

Réactifs – composition et concentrations

M : Microparticules tapissées de streptavidine, 1 flacon contenant 6,5 mL: microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/mL, conservateur.

R1 : Acanti-insuline~biotine, 1 flacon contenant 10 mL : anticorps monoclonaux (de souris) anti-insuline biotinylés 1mg/L ; tampon MES 50 mmol/L, pH 6,0 ; conservateur.

R2 : Ac anti-insuline~(Ru(bpy)²⁺₃ , 1 flacon contenant 10 mL : anticorps monoclonaux (de souris) anti-insuline marqués au ruthénium 1,75 mg/L ; tampon MES 50 mmol/L, pH 6,0 ; conservateur.

MES : acide morpholino-2 éthanesulfonique

Réalisation du test

L'analyseur a effectué automatiquement l'homogénéisation des microparticules. Les informations spécifiques du test mémorisées dans le code-barres étaient saisies. Exceptionnellement, lorsque le code-barres ne pouvait être lu par l'appareil, une saisie manuelle de la série des 15 chiffres inscrits sur l'étiquette était effectuée. Les réactifs préalablement réfrigérés entre 2 et 8°C étaient amenés à environ 20°C avant le chargement et placés dans le plateau de l'appareil thermostaté à 20°C. La formation de la mousse était évitée. L'analyseur a géré le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

Caractéristiques du test

La méthode était standardisée par rapport à la première préparation internationale : 1st IRP WHO reference Standard 66/304 (NIBSC).

Le code-barres des réactifs Elecsysinsulin® contenait toutes les informations nécessaires à la calibration du lot. La courbe de référence était adaptée à l'analyseur à l'aide des calibrateurs Elecsys Insulin Cal Set.

Une calibration par lot était effectuée en utilisant du réactif frais (ayant été enregistré depuis au maximum 24 heures sur l'analyseur).

L'analyseur calculait automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon.

Le coefficient de variation était de 10%.

7. Interprétation de l'insulinosécrétion et de l'insulinorésistance

L'insulinosécrétion et l'insulinorésistance ont été interprétés par l'indice HOMA (homeostasis model assessment). C'est l'une des méthodes les plus simples et plus populaires d'évaluation l'insulinorésistance et de la fonction des cellules β dans les études épidémiologiques où seuls les échantillons à jeun sont disponibles car la réalisation des

tests dynamiques est difficile(102). Il dérive des mesures basales de l'insuline/de peptide-C et du glucose(103).

- *L'insulinosécrétion a été interprétée par l'indice suivant:*

HOMA- β (C-P) = $0,27 \times \text{peptide-C à jeun } (\mu\text{U/mL}) / (\text{glycémie à jeun} - 3,5 \text{ mmol/L})$.

C-P : peptide C

- *L'insulinoresistance a été déterminé par l'indice suivant :*

HOMA-IR = $[\text{glycémie à jeun } (\text{mmol/L}) \times \text{insulinémie } (\text{mU/L})] / 22,5$

Nous avons précédemment validé cet indice dans notre contexte (104) (**voir article 7 de l'annexe**)

8. Sérologie HHV8 et détection de l'ADN viral HHV8

La séroprévalence du virus HHV-8 a été évaluée chez l'ensemble des patients recrutés. Nous avons également recherché l'ADN viral du HHV-8 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) des participants. Cependant deux patients ne disposaient pas de PBMC.

8.1. Sérologie HHV8

La détection sérologique de l'infection à HHV-8 est toujours entravée par l'absence d'une technique de critère de référence. La détection des anticorps anti HHV-8 a été réalisée en utilisant deux techniques différentes:

- ✓ Une immunofluorescence (IF) indirecte pour le dosage des anticorps contre les antigènes lytiques utilisant la lignée cellulaire ISI-1,
- ✓ Une immunofluorescence indirecte pour le dosage des anticorps contre les antigènes latents nucléaires utilisant la lignée cellulaire BCP-1.

La séropositivité était marquée lorsque les deux techniques donnaient des résultats concordants.

- **Principe**

La sérologie HHV8 pour la détection des IgG (immunoglobuline) est basée sur la méthode d'immunofluorescence indirecte. On fait réagir le sérum du patient avec des lignées cellulaires HHV8 ISI-1 et BCP. La présence d'anticorps dirigés contre l'HHV8 est révélée par un anticorps secondaire anti IgG humain marqué à la fluorescéine.

- **Procédure**

Elle comporte une phase de préparation des cellules, fixation, perméabilisation, préparation des lames, préparation des sérums, la réaction IF, préparation du conjugué anti IgG humain, et de rendu des résultats (lecture au microscope à fluorescence).

Résultats positifs : marquage fluorescent vert moucheté au niveau nucléaire.

Résultats négatifs : aucun marquage, fluorescence rouge.

8.2. Détection de l'ADN viral HHV8

Le test permet de quantifier le génome HHV8 dans les prélèvements sanguins. La charge virale est mesurée grâce à une gamme de quantification préparée au laboratoire.

La PCR (Polymérase Chain Réaction) quantitative en temps réel par amplification pour la détection de l'ADN du HHV-8 a été réalisée en utilisant des cellules mononuclées du sang (PBMC) obtenues à partir d'échantillons de sang après séparation par gradient de Ficoll.

L'ADN a été extrait en utilisant un système automatisé d'extraction des acides nucléiques (NucliSENS[®] easyMAG[®]).

- **Principe d'extraction de l'ADN par easyMAG[®]**

- ✓ Après lyse des échantillons, tous les acides nucléiques sont capturés par les particules de silice magnétique.
- ✓ Le système d'aimantation de NucliSENS^R easyMAGTM permet le lavage dynamique puis la fixation de la silice.
- ✓ Lors de l'étape finale, la silice magnétique est séparée de l'éluât par le système d'aimantation.

L'ADN extrait est amplifié par PCR quantitative en temps réel (ABI PRISM 7500 *Applied Biosystems-Courtaboeuf France*). En bref, les dilutions des quantités connues (10^{-10} exemplaires) d'un fragment d'ADN viral (KS 330-233 séquences d'amorce) cloné dans un plasmide sont utilisées pour établir la courbe standard. En traçant les valeurs seuils du cycle

contre numéros copie donnée, une amplification linéaire de 10^2 à 10^7 exemplaires avec un coefficient de variation de moins de 3% est obtenu. Ensuite, la valeur seuil de 100 copies / μg d'ADN défini la limite inférieure de la linéarité de la courbe standard.

9. Dosage des marqueurs de l'inflammation

Les cytokines inflammatoires (Flt-3 ligand, Fractalkine, IFN- γ , IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , sCD40L, VEGF) ont été quantifié en utilisant la technologie du Luminex xMAP®. Le Kit utilisé était le MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay (HCYTOMAG-60K) de Merck. Cette technologie est basée sur le principe d'un ELISA combiné à de la cytométrie en flux, et permet le dosage simultané de nombreuses cibles protéiques dans de faibles volumes d'échantillons.

10. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 16.0. Les variables quantitatives ont été exprimées sous forme de moyennes, avec écart-type associé, médianes et avec écart interquartile ; et les variables qualitatives quant à elles, sous forme d'effectifs et de pourcentages. Les associations entre variables qualitatives étaient établies par le test du χ^2 ou par le test exact de Fisher si nécessaire. Le test de Student et l'analyse de variance (ANOVA) ont été utilisés pour la comparaison des variables quantitatives lorsque les variables suivaient la loi de la distribution normale. Dans le cas contraire nous utilisons des tests analogues non paramétriques (Mann Whitney et Kruskal wallis). Une valeur de $p < 0,05$ était considérée statistiquement significative.

11. Considérations éthiques

Le protocole de recherche a été approuvé par le Comité National d'Ethique et de la Recherche du Cameroun (Annexe 2a).

Aussi, nous avons obtenu une autorisation de l'Hôpital Central de Yaoundé (Annexe 2b). Nous avons tenu au respect du secret médical tout au long de ce travail. Les données informatisées ont été traitées de façon anonyme.

CHAPITRE IV: RESULTATS

Les résultats de cette thèse sont présentés en 3 parties. Dans la première partie, nous présentons les résultats sur la prévalence, les caractéristiques cliniques, et métaboliques du diabète non auto-immun à tendance cétosique (Article 4), dans la seconde partie, suivent les résultats sur l'association entre le virus HHV8 et les phénotypes de diabète. Enfin, nous présentons l'étude de l'association entre inflammation et les phénotypes de diabète.

PARTIE IV.1: Fréquence et caractéristiques cliniques du diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD) dans notre population

Lorsque nous avons commencé cette thèse, le Ketosis-prone diabetes était très peu décrit en Afrique Sub-saharienne. Nous n'avions pas de données sur la prévalence ainsi que les caractéristiques cliniques et métaboliques du KPD. Nous nous sommes proposés dans la première partie de cette thèse d'évaluer l'importance de ce phénotype atypique de diabète dans une population de patients diabétiques. Les participants ont été recrutés parmi les patients qui étaient admis avec une crise hyperglycémique au Centre National de Diabétologie de l'Hôpital Central de Yaoundé (Cameroun), qui est le centre de référence de prise en charge du diabète dans la région.

En quatre mois de recrutement consécutif, au total, nous avons inclus 173 patients dans cette étude parmi lesquels 71,7% (n = 124) présentaient un DT2 (diabète de type 2) et 28,3% (n = 49) présentaient un KPD. Parmi les patients KPD, 34 étaient admis en phase cétosique (KPD1) et les 15 autres étaient admis en phase non cétosique (KPD2). Les caractéristiques sociodémographiques et cliniques de notre population sont présentées dans les tableaux 1, 2 et 3 de l'article 4 ci-dessous.

Article 4: Ketosis-prone atypical diabetes in Cameroonian patients with hyperglycaemic crisis: frequency, clinical and metabolic phenotypes.

Lontchi-Yimagou E, Nguewa JL, Assah F, Noubiap JJ, Boudou P, Djahmeni E, Atoghotiede B, Gautier JF, Mbanya JC, Sobngwi E. Ketosis-prone atypical diabetes in Cameroonian patients with hyperglycaemic crisis : frequency, clinical and metabolic phenotypes. ***BMC Endocrine Disorders.*** Soumis, 2015.

PARTIE IV.2: Etude de l'association entre l'infection par le virus HHV8 et les phénotypes de diabète

1. Fréquence du virus HHV8 dans la population

Nous avons recherché la fréquence du virus HHV8 chez les 124 DT2 et les 49 KPD inclus, dont 34 étaient admis en phase cétosique (KPD1) et 15 en phase non cétosique (KPD2).

Les caractéristiques cliniques et métaboliques des patients sont celles décrites dans l'article 4.

1.1. Sérologie HHV8 dans la population générale (KPD et DT2)

Tableau I: Sérologie HHV8 dans la population générale

Sérologie HHV8 des participants			
	Population générale	KPD	DT2
	(n =173)	(n =49)	(n =124)
Positif BCP-1 et ISI 1,n(%)	88(50,9)	19(38,8)	69(55,6)

HHV8: Human Herpes Virus type 8, KPD: ketosis-prone diabetes, DT2: diabète de type 2, BCP-1: lignée cellulaire BCP-1, ISI-1: lignée cellulaire ISI-1.

La prévalence des anticorps anti-HHV8 (séroprévalence) dans la population générale étudiée était de 50,9% (88 sur 173 patients). Elle était de 38,8% (19 sur 49 patients) chez les patients KPD et de 55,6% chez les DT2 (69 sur 124 patients) ($p = 0,06$). Les résultats sont présentés dans le tableau I ci-dessus.

1.2. Sérologie HHV8 en fonction du phénotype de diabète (KPD1, KPD2 et DT2)

Tableau II: Sérologie HHV8 en fonction du phénotype de diabète

Sérologie HHV8 chez les patients KPD1 vs KPD2 vs DT2			
	KPD1	KPD2	DT2
	(n =34)	(n =15)	(n =124)
Positif BCP-1 et ISI-1, n(%)	12(35,3)	7(46,7)	69(55,6)

HHV8: Human Herpes Virus type 8, BCP-1: lignée cellulaire BCP-1, ISI-1: lignée cellulaire ISI-1, KPD: ketosis-prone diabetes, KPD1: KPD avec cétose, KPD2: KPD sans cétose, DT2: diabète de type 2.

La séroprévalence de HHV8 était comparable dans les trois groupes à savoir, 35,3% (12 sur 34 patients) chez les KPD1, 46,7% (7 sur 15 patients) chez les KPD2 et 55,6% chez les patients DT2 (69 sur 124 patients) ($p = 0,10$). Les résultats sont consignés dans le tableau II.

1.3. Détection de l'ADN viral HHV8 en fonction du phénotype de diabète (KPD1, KPD2 et DT2)

Tableau III: Détection de l'ADN viral HHV8 en fonction du phénotype de diabète

	KPD1	KPD2	DT2
	(n =34)	(n=15)	(n =122)
Résultat positif, n(%)	4(11,8)	0(0)	11(9,9)
Charge virale [mediane (ecart-interquartile)]^a	555 (184-2135)	-	830 (280-1483)

HHV8: Human Herpes Virus type 8, KPD, KPD: ketosis-prone diabetes, KPD1: KPD avec cétose, KPD2: KPD sans cétose, ^aCopie/ml

L'ADN viral HHV8 était absent chez les sujets KPD hors cétose. Toutefois les KPD en cétose et les DT2 ont présentés de l'ADN viral à fréquence comparable (11,8% vs 9%) ($p=0,4$).

Parmi les quatre patients KPD1 détectés positif pour l'ADN viral, un était négatif pour la détection des anticorps anti HHV8, et des 11 patients DT2 avec l'ADN viral, deux ne présentaient pas d'anticorps anti-HHV8.

La charge virale HHV8 médiane était de 555 et 830 copie/ml chez les KPD1 et DT2 respectivement ($p=0,94$).

2. Association entre la présence du virus HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance)

L'objectif de cette partie était de rechercher les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) des phénotypes de diabète qui seraient associées à l'infection par le virus HHV8.

2.1. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) dans la population générale

Tableau IV: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques dans la population générale

Variables	HHV8 + (n =88)	HHV8 – (n =85)	P-value
IMC (kg/m²)	27,5±5,6	26,6± 5,1	0,26
TT/TH	0,9±0,7	0,9±0,6	0,79
PAS (mmHg)	136,2±20,6	130,5±20,7	0,08
PAD (mmHg)	81,4±11,7	83,6±12,0	0,22
Glycémie à jeun (mmol/l)	20,2±5,9	20,9±5,5	0,39
HbA1c (%)	8,8±2,1	8,9±2,2	0,56
CT (g/l)	4,6±1,4	4,8±1,4	0,48
TG (g/l)	1,6±0,6	1,4±0,7	0,09
HDL (g/l)	1,0±0,4	1,0±0,4	0,96
LDL (g/l)	3,0±1,2	3,0±1,2	0,59
Peptide-C (nmol/l)	0,7±0,4	0,6±0,5	0,84
Insuline (mU/ml)	0,2±0,02	0,2±0,01	0,56
HOMA-β (10⁻³)	1±6	9±5	0,07
HOMA-IR	10,2±6,6	9,2±6,4	0,39

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±écart-type. HHV8: Human Herpes Virus type 8, HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-β: Homeostasis model assessment of β cell function.

Nous n'avons observé aucune différence significative des caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients positifs et négatifs aux anticorps anti-HHV8 dans la population générale.

2.2. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients diabétiques de type 2

Tableau V: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients diabétiques de type 2

Variables	HHV8 + (n =69)	HHV8 – (n =55)	P-value
IMC (kg/m²)	27,4±5,6	26,5± 5,2	0,37
TT/TH	0,9±0,7	0,9±0,6	0,60
PAS (mmHg)	137,0±20,9	134,0±20,2	0,44
PAD (mmHg)	80,9±11,4	84,2±12,8	0,15
Glycémie à jeun (mmol/l)	19,7±5,7	20,5±5,6	0,47
HbA1c (%)	8,6±2,1	8,9±2,2	0,35
CT (g/l)	4,5±1,4	4,9±1,5	0,16
TG (g/l)	1,6±0,7	1,5±0,8	0,29
HDL (g/l)	1,0±0,4	1,0±0,4	0,90
LDL (g/l)	2,9±1,1	3,2±1,2	0,16
Peptide-C (nmol/l)	0,7±0,4	0,7±0,5	0,93
HOMA-β (10⁻³)	10±6	10±5	0,22
HOMA-IR	10,9±6,8	10,0±6,8	0,48

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±écart-type. HHV8: Human Herpes Virus type 8, HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-β: Homeostasis model assessment of β cell function

Nous n'avons observé aucune différence significative des caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 en comparaison aux négatifs dans la population de diabétiques de type 2.

2.3. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD

Tableau VI: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients KPD

Variables	HHV8+ (n =30)	HHV8 – (n =19)	P-value
IMC (kg/m²)	28,1±5,7	26,8± 5,9	0,42
TT/TH	0,9±0,7	0,9±0,6	0,96
PAS (mmHg)	133,1±19,6	124,1±20,6	0,14
PAD (mmHg)	82,9±12,8	83,6±10,6	0,93
Glycémie à jeun (mmol/l)	22,0±5,5	21,0±5,3	0,96
HbA1c (%)	9,3±2,2	8,9±2,4	0,62
CT (g/l)	5,0±1,6	4,5±1,1	0,33
TG (g/l)	1,6±0,5	1,3±0,6	0,16
HDL (g/l)	1,0±0,5	1,0±0,4	0,99
LDL (g/l)	3,2±1,4	2,8±1,0	0,31
Peptide-C (nmol/l)	0,6±0,3	0,5±0,3	0,15
HOMA-β (10⁻³)	8±2	7±4	0,82
HOMA-IR	7,9±5,4	8,1±6,6	0,89

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±écart-type. HHV8: Human Herpes Virus type 8, HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-β: Homeostasis model assessment of β cell function

Nous n'avons observé aucune différence significative des caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 en comparaison aux négatifs chez les KPD.

2.4. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD en phase cétosique

Tableau VII: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD1

Variables	HHV8+ (n =12)	HHV8 – (n =22)	<i>P-value</i>
IMC (kg/m ²)	26,3±4,7	25,8±4,4	0,50
TT/TH	0,9±0,07	0,9±0,06	0,74
PAS (mmHg)	129,0±20,8	117,6±16,4	0,87
PAD (mmHg)	80,3±14,9	81,9±11,4	0,13
Glycémie à jeun (mmol/l)	22,0±5,5	23,4±4,1	0,74
HbA1c (%)	10,2±1,9	9,8±2,0	0,61
CT (g/l)	4,9±1,4	4,6±1,1	0,56
TG (g/l)	1,6±0,4	1,4±0,6	0,29
HDL (g/l)	0,8±0,4	0,9±0,2	0,31
LDL (g/l)	3,1±1,3	2,9±1,0	0,58
Peptide-C (nmol/l)	0,5±0,3	0,3±0,3	0,15
HOMA-β (10 ⁻³)	7±3	6±3	0,29
HOMA-IR	6,5±4,6	8,28±6,3	0,38

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±écart-type. HHV8: Human Herpes Virus type 8, HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-β: Homeostasis model assessment of β cell function

Nous n'avons observé aucune différence significative des caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 en comparaison aux négatifs chez les KPD1.

2.5. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD en phase non cétosique

Tableau VIII: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) chez les patients KPD2

Variables	HHV8+ (n =7)	HHV8 – (n =8)	<i>P-value</i>
IMC (kg/m ²)	31,1±6,4	29,9±5,5	0,72
TT/TH	0,9±0,1	0,9±0,1	0,82
PAS (mmHg)	139,4±16,8	140,5±21,6	0,91
PAD (mmHg)	87,3±7,3	84,3±8,7	0,47
Glycémie à jeun (mmol/l)	22,0±8,3	18,2±6,3	0,34
HbA1c (%)	7,7±1,9	6,7±1,9	0,36
CT (g/l)	5,0±1,8	4,3±0,9	0,41
TG (g/l)	1,3±0,5	0,9±0,3	0,08
HDL (g/l)	1,2±0,3	1,0±0,5	0,39
LDL (g/l)	3,3±1,7	2,5±0,7	0,34
Peptide-C (nmol/l)	0,7±0,2	0,7±0,2	0,72
HOMA-β (10 ⁻³)	8±2	10±5	0,16
HOMA-IR	10,0±6,1	7,6±2,4	0,37

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±écart-type. HHV8: Human Herpes Virus type 8, HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-β: Homeostasis model assessment of β cell function

Nous n'avons observé aucune différence significative des caractéristiques cliniques et métaboliques chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 en comparaison aux négatifs chez les KPD2.

2.6. Association entre la présence de l'ADN viral HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) dans la population générale

Tableau IX: Association entre la présence de l'ADN viral HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques dans la population générale

Variables	ADN VIRAL HHV8 + (n =15)	ADN VIRAL HHV8 - (n =156)	P-value
IMC (kg/m ²)	24,4±4,0	27,2± 5,4	0,03
TT/TH	0,9±0,4	0,9±0,7	0,67
PAS (mmHg)	126,4±21,3	134,1±20,9	0,25
PAD (mmHg)	77,6±11,1	82,9±11,9	0,11
Glycémie à jeun (mmol/l)	21,5±5,2	20,6±5,8	0,39
HbA1c (%)	9,3±1,6	8,8±2,2	0,34
CT (g/l)	5,7±1,4	4,6±1,5	0,00
TG (g/l)	1,6±0,8	1,5±0,8	0,47
HDL (g/l)	1,0±0,3	1,0±0,4	0,41
LDL (g/l)	3,8±1,2	2,9±1,1	0,01
Peptide-C (nmol/l)	0,5±0,3	0,7±0,4	0,02
HOMA-β (10 ⁻³)	8±3	10±5	0,04
HOMA-IR	7,7±4,8	9,9±6,6	0,13

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±écart-type. HHV8: Human Herpes Virus type 8, HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-β: Homeostasis model assessment of β cell function

L'IMC des sujets détectés positifs pour l'ADN viral était bas par rapport aux sujets négatifs (24,4±4,0 vs 27,2± 5,4) (p=0,03).

La concentration de cholestérol total était plus élevée chez les patients détectés positifs pour l'ADN viral par rapport aux négatifs (5,7±1,4 g/l et de 4,6±1,5 g/l) (p=0,009).

De même, la concentration de cholestérol LDL était aussi élevée chez les patients détectés positif pour l'ADN viral (3,8±1,2 g/l vs 2,9±1,1 g/l) (p=0,01).

La concentration de peptide-C était basse chez les patients détectés positifs pour l'ADN viral comparativement aux négatifs (0,5±0,3 nmol/l vs 0,7±0,4 nmol/l) (p=0,02).

Le HOMA-β était plus bas chez les patients détectés positifs pour l'ADN viral en comparaison aux négatifs (0,008±0,003 vs 0,01±0,005) (p=0,04).

Nous n'avons observé aucune différence significative dans les groupes de patients concernant les autres caractéristiques cliniques et métaboliques.

2.7. Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques (insulinosécrétion et insulinoresistance) en l'absence de l'ADN viral dans la population générale

Tableau X: Association entre la présence des anticorps anti-HHV8 et les caractéristiques cliniques et métaboliques en l'absence de l'ADN viral dans la population générale

Variables	HHV8 + (n =73)	HHV8 – (n =85)	P-value
IMC (kg/m ²)	27,8±5,5	26,6± 5,2	0,18
TT/TH	0,9±0,7	0,9±0,6	0,82
PAS (mmHg)	137,4±20,5	131,0±20,8	0,07
PAD (mmHg)	81,7±11,9	84,0±11,9	0,23
Glycémie à jeun (mmol/l)	20,1±6,0	21,0±5,5	0,32
HbA1c (%)	8,7±2,2	8,9±2,2	0,52
CT (g/l)	4,5±1,4	4,7±1,3	0,3
TG (g/l)	1,6±0,7	1,4±0,7	0,03
HDL (g/l)	1,0±0,4	1,0±0,4	0,92
LDL (g/l)	2,8±1,2	3,0±1,1	0,41
Peptide-C (nmol/l)	0,7±0,4	0,6±0,5	1,14
HOMA-β (C-P)	0,011±0,006	0,009±0,005	0,023
HOMA-IR	10,5±6,7	9,4±6,5	0,36

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±écart-type. HHV8: Human Herpes Virus type 8, HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-β: Homeostasis model assessment of β cell function

La concentration de triglycérides était plus élevée chez les patients positifs aux anticorps anti-HHV8 en comparaison aux négatifs (1,6±0,7 g/l vs 1,4±0,7 g/l) (p=0,03).

Par contre, l'indice HOMA-β était significativement plus élevé chez les patients positifs aux anticorps anti-HHV8 (0,011±0,006) en comparaison aux patients négatifs (0,009±0,005) (p=0,04).

PARTIE IV.3: Profil inflammatoire associé aux phénotypes de diabète et au statut viral

L'objectif de cette partie était de rechercher si l'infection à HHV8 est associée à un profil inflammatoire pouvant participer au phénotype du diabète.

Nous avons évalué le profil inflammatoire d'une part en fonction du phénotype de diabète, et d'autre part en fonction du statut viral (sujets infectés *vs* non infectés par HHV8).

Nous avons systématiquement choisis les 49 patients présentant un KPD, les 11 patients DT2 détectés positif pour l'ADN viral HHV8 et 12 autres patients DT2. Ceux-ci étaient appariés pour le sexe, l'âge et l'IMC.

Parmi les 19 cytokines et chemokines testées, nous présentons les résultats de ceux dont 90 pourcent étaient supérieurs ou égaux au seuil de détection. Au total 6 marqueurs inflammatoires ont été retenus dont 5 proinflammatoires (TNF- α , MCP-1, IL-8, MIP-1 β , VEGF) et un qui n'était pas proinflammatoire (MIP-1 α).



1. Profil inflammatoire en fonction du phénotype de diabète

1.1. Profil inflammatoire chez les patients KPD versus patients diabétiques de type 2

Tableau XI: Profil inflammatoire chez les patients KPD versus DT2

Variables (pg/ml)	KPD (n=49)	DT2 (n=23)	P-value
TNF-α	15,4(9,5-19,7)	9,9(7,7-14,0)	0,02
MCP-1	265,5(173,2-348,5)	276,9(251,1-361,3)	0,22
MIP1-α	47,2(17,5-91,7)	153,0(22,7-931,8)	0,08
IL-8	32,6(10,9-114,4)	9,5(4,8-22,5)	0,003
MIP1-β	75,4(43,5-131,2)	51,2(31,9-89,9)	0,11
VEGF	214,4(116,1-274,7)	236,2(80,3-325,3)	0,93

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). KPD: ketosis-prone diabetes, DT2: diabète de type 2, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

La concentration médiane de TNF- α était plus élevée chez les patients KPD par rapport aux DT2 [15,4(9,5-19,7) vs 9,9(7,7-14,0)], (p=0,02).

De même, la concentration médiane d'IL-8 était plus élevée chez les patients KPD comparé aux DT2 [32,6(10,9-114,4) vs 9,5(4,8-22,5)], (p=0,03).

Aucune différence significative n'a été observée pour les autres marqueurs de l'inflammation (Tableau XI).

1.2. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase cétosique versus KPD en phase non cétosique

Tableau XII: Profil inflammatoire chez patients KPD1 vs KPD2

Variables (pg/ml)	KPD1 (n=34)	KPD2 (n=15)	<i>P-value</i>
TNFα	17,4(9,5-20,3)	13,5(9,4-16,4)	0,13
MCP-1	315,9(163,8-351,1)	240,4(202,2-309,7)	0,31
MIP1-α	30,9(13,7-76,4)	72,8(33,6-437,7)	0,04
IL-8	30,9(11,1-149,01)	72,4(10,2-140,9)	0,93
MIP1-β	66,7(43,5-115,6)	99,6(48,4-180,3)	0,34
VEGF	219,4(116,1-282,5)	165,9(98,1-268,6)	0,72

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). KPD: ketosis-prone diabetes, KPD1: KPD avec cétose, KPD2: KPD sans cétose, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

La concentration d'MIP1- α était plus basse chez les patients KPD1 par rapport aux KPD2 [30,9(13,7-76,4) vs 72,8(33,6-437,7)], ($p=0,04$).

Aucune différence significative n'a été observée pour les autres marqueurs de l'inflammation (Tableau XII).

1.3. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase cétosique versus patients diabétiques de type 2

Tableau XIII: Profil inflammatoire chez les patients KPD1 vs DT2

Variables (pg/ml)	KPD1 (n=34)	DT2 (n=23)	<i>P-value</i>
TNF-α	17,4(9,5-20,3)	9,9(7,7-14,0)	0,01
MCP-1	315,9(163,8-351,1)	276,9(251,1-361,3)	0,6
MIP1-α	30,9(13,7-76,4)	153,0(22,7-931,8)	0,03
IL-8	30,9(11,1-149,01)	9,5(4,8-22,5)	0,00
MIP1-β	66,7(43,5-115,6)	51,2(31,9-89,9)	0,24
VEGF	219,4(116,1-282,5)	236,2(80,3-325,3)	0,98

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). KPD: ketosis-prone diabetes, KPD1: KPD avec cétose, DT2: diabète de type 2, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

La concentration de TNF- α était plus élevée chez les patients KPD1 par rapport aux patients DT2 [17,4(9,5-20,3) vs 9,9(7,7-14,0)], ($p=0,01$). De même la concentration d'IL-8 était plus élevée chez les patients KPD1 par rapport aux DT2 [30,9(11,1-149,01) vs 9,5(4,8-22,5)], ($p=0,00$).

La concentration médiane de MIP1- α était plus basse chez les patients KPD1 versus DT2 [9,5(4,8-22,5) vs 30,9(11,1-149,01)], ($p=0,03$).

Aucune différence significative n'a été observée pour les autres marqueurs de l'inflammation (Tableau XIII).

1.4. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase non cétosique versus patients diabétiques de type 2

Tableau XIV: Profil inflammatoire chez les patients KPD2 vs DT2

Variables (pg/ml)	KPD2 (n=15)	DT2 (n=23)	<i>P-value</i>
TNFα	13,5(9,4-16,4)	9,9(7,7-14,0)	0,21
MCP-1	240,4(202,2-309,7)	276,9(251,1-361,3)	0,04
MIP1-α	72,8(33,6-437,7)	153,0(22,7-931,8)	0,65
IL-8	72,4(10,2-140,9)	9,5(4,8-22,5)	0,01
MIP1-β	99,6(48,4-180,3)	51,2(31,9-89,9)	0,07
VEGF	165,9(98,1-268,6)	236,2(80,3-325,3)	0,76

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). KPD: ketosis-prone diabetes, DT2: diabète de type 2, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

La concentration de MCP-1 était plus basse chez les patients KPD2 par rapport aux patients DT2 [240,4(202,2-309,7) vs 276,9(251,1-361,3)], (p=0,04). La concentration d'IL-8 était plus élevée chez les patients KPD2 versus DT2 [72,4(10,2-140,9) vs 9,5(4,8-22,5), (p=0,01)].

Aucune différence significative n'a été observée pour les autres marqueurs de l'inflammation (Tableau XIV).

2. Profil inflammatoire en fonction du statut viral

2.1. Profil inflammatoire dans la population générale en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Tableau XV: Profil inflammatoire dans la population générale en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Variables (pg/ml)	HHV8+ (n=34)	HHV8- (n=38)	<i>P-value</i>
TNFα	12,6(8,1-19,3)	14,1(9,5-18,2)	0,47
MCP-1	276,1(243,0-362,7)	263,5(185,9-343,9)	0,40
MIP1-α	52,3(24,4-532,5)	47,2(13,6-91,7)	0,08
IL-8	17,83(5,6-75,8)	25,9(9,8-142,4)	0,29
MIP1-β	56,8(32,9-101,1)	69,2(51,2-131,7)	0,37
VEGF	195,9(6,9-310,2)	226,7(131,2-303,1)	0,53

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, TNF α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Dans la population globale, nous n'avons observé aucune différence significative du profil inflammatoire chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 en comparaison aux négatifs (Tableau XV).

2.2. Profil inflammatoire chez les patients diabétiques de type 2 en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Tableau XVI: Profil inflammatoire chez les patients DT2 en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Variables (pg/ml)	HHV8+ (n=15)	HHV8- (n=8)	<i>P-value</i>
TNFα	9,9(7,7-1,3)	11,1(7,4-1,6)	0,77
MCP-1	275,4(251,1-361,2)	305,1(243,5-411,0)	0,84
MIP1-α	238,9(31,1-931,8)	40,2(9,4-1433,7)	0,35
IL-8	9,5(5,25-33,9)	9,9(4,3-20,5)	0,69
MIP1-β	60,5(31,9-95,4)	47,6(24,2-61,3)	0,16
VEGF	198,2(73,3-381,8)	255,3(122,9-303,1)	0,92

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Chez les sujets DT2, nous n'avons observé aucune différence significative du profil inflammatoire chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 en comparaison aux patients négatifs à ces anticorps (Tableau XVI).

2.3. Profil inflammatoire chez les patients KPD en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Tableau XVII: Profil inflammatoire chez les patients KPD en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Variables (pg/ml)	HHV8+ (n=19)	HHV8- (n=30)	<i>P-value</i>
TNFα	17,5(8,2-19,5)	14,7(10,8-20,1)	0,99
MCP-1	309,7(165,6-366,9)	257,2(175,8-333,9)	0,58
MIP1-α	44,7(20,6-153,5)	47,2(13,6-91,7)	0,50
IL-8	28,9(10,2-127,7)	34,9(11,1-149,0)	0,49
MIP1-β	54,88(33,3-117,4)	78,1(57,7-138,7)	0,14
VEGF	195,9(69,8-268,6)	216,9(127,1-311,2)	0,59

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Chez les sujets KPD, le profil inflammatoire était comparable chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 et les patients négatifs à ces anticorps (Tableau XVII).

2.4. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase cétosique en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Tableau XVIII: Profil inflammatoire chez les patients KPD cétosique en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Variables (pg/ml)	HHV8+ (n=12)	HHV8- (n=22)	<i>P-value</i>
TNFα	19,0(9,6-20,11)	15,1(9,51-20,7)	0,66
MCP-1	328,82(111,6-362,5)	295,8(175,8-348,4)	0,90
MIP1-α	51,08(23,2-106,9)	22,3(9,9-68,6)	0,18
IL-8	40,1(10,0-117,3)	30,9(11,1-169,7)	0,85
MIP1-β	49,2(21,1-104,2)	75,4(58,2-139,9)	0,07
VEGF	224,4(69,8-299,4)	216,9(122,7-292,1)	0,93

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Chez les sujets KPD1, nous n'avons observé aucune différence significative du profil inflammatoire chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 en comparaison aux patients négatifs (Tableau XVIII).

2.5. Profil inflammatoire chez les patients KPD en phase non cétosique en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Tableau XIX: Profil inflammatoire chez les patients KPD non cétosique en présence et en absence des anticorps anti-HHV8

Variables (pg/ml)	HHV8+ (n=7)	HHV8- (n=8)	<i>P-value</i>
TNFα	13,1(8,2-13,1)	14,6(11,3-16,2)	0,48
MCP-1	259,5(202,2-370,6)	235,7(112,8-258,2)	0,35
MIP1-α	35,6(17,8-704,3)	110,5(57,5-272,6)	0,26
IL-8	16,9(10,2-206,8)	102,3(15,6-133,5)	0,56
MIP1-β	86,5(33,3-183,6)	106,4(54,9-138,7)	0,94
VEGF	165,85(80,3-268,6)	323,7(105,9-400,9)	0,50

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). HHV8+: présence des anticorps anti-HHV8, HHV8- : absence des anticorps anti-HHV8, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Chez les sujets KPD2, nous n'avons observé aucune différence significative du profil inflammatoire chez les patients positifs pour les anticorps anti-HHV8 en comparaison aux patients négatifs à ces anticorps (Tableau XIX).

2.6. Profil inflammatoire dans la population générale en présence et en absence de l'ADN viral HHV8

Tableau XX: Profil inflammatoire dans la population générale en présence et en absence de l'ADN viral HHV8

Variables (pg/ml)	ADN HHV8+ (n=15)	ADN HHV8- (n=57)	<i>P-value</i>
TNFα	11,51(8,1-19,8)	13,5 (8,9-19,0)	0,78
MCP-1	274,6(247,2-323,7)	275,4 (195,4-358,8)	0,98
MIP1-α	83,61(22,6-207,9)	47,2(16,7-135,8)	0,23
IL-8	33,9(9,2-239,7)	18,91(9,2-107,7)	0,51
MIP1-β	65,3(42,7-95,3)	62,4(42,5-113,2)	0,94
VEGF	162,59(38,4-329,6)	229,1(120,3-303,3)	0,34

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). ADN HHV8+ : présence de l'ADN viral HHV8, ADN HHV8- : absence de l'ADN viral HHV8, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Nous n'avons observé aucune différence significative du profil inflammatoire chez les patients détectés positifs pour l'ADN HHV8 en comparaison aux patients négatifs (Tableau XX).

2.7. Profil inflammatoire chez les patients diabétiques de type 2 en présence et en absence de l'ADN viral HHV8

Tableau XXI: Profil inflammatoire chez les patients diabétiques de type 2 en présence et en absence de l'ADN viral HHV8

Variables (pg/ml)	ADN HHV8+ (n=11)	ADN HHV8- (n=12)	P-value
TNFα	9,9(7,8-12,7)	10,7(7,4-17,0)	0,68
MCP-1	269,1(277,2-319,1)	317,2(260,0-380,3)	0,21
MIP1-α	108,4(23,6-632,2)	529,5(16,5-1130,5)	0,77
IL-8	16,4(9,2-198,5)	5,3(3,7-12,8)	0,008
MIP1-β	65,3(31,5-95,4)	49,9(34,9-63,6)	0,38
VEGF	162,6(24,6-374,4)	238,5(122,8-312,0)	0,62

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). ADN HHV8+ : présence de l'ADN viral HHV8, ADN HHV8- : absence de l'ADN viral HHV8, TNF α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

La concentration médiane d'IL-8 était plus élevée chez les patients DT2 détectés positifs pour l'ADN viral HHV8 en comparaison aux négatifs [16,4(9,2-198,5) vs 5,3(3,7-12,8)], (p=0,01).

Aucune différence significative n'a été observée pour les autres marqueurs de l'inflammation dans les deux groupes (Tableau XXI).

2.8. Profil inflammatoire chez les patients KPD en présence et en absence de l'ADN viral HHV8

Tableau XXII: Profil inflammatoire chez les patients KPD en présence et en absence de l'ADN viral HHV8

Variables (pg/ml)	ADN HHV8+ (n=4)	ADN HHV8- (n=30)	<i>P-value</i>
TNFα	20,2(18,1-22,4)	14,4(9,4-19,2)	0,13
MCP-1	299,9(145,4-331,4)	261,5(173,2-352,8)	0,70
MIP1-α	83,6(19,9-17,7)	45,9(16,6-89,5)	0,17
IL-8	143,0(12,9-505,6)	32,6(10,8-138,2)	0,45
MIP1-β	74,4(48,4-109,5)	75,4(42,4-139,9)	0,75
VEGF	160,4(70,4-254,9)	219,4(116,0-282,5)	0,32

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). ADN HHV8+ : présence de l'ADN viral HHV8, ADN HHV8- : absence de l'ADN viral HHV8, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Chez les sujets KPD, nous n'avons observé aucune différence significative du profil inflammatoire chez les patients détectés positifs pour l'ADN HHV8 en comparaison aux patients négatifs (Tableau XXII).

2.9. Profil inflammatoire chez les patients positifs aux anticorps anti-HHV8 et sans ADN viral en comparaison au patients sans anticorps anti-HHV8

Tableau XXIII: Profil inflammatoire chez les patients positifs aux des anticorps anti-HHV8 et sans ADN viral

Variables (pg/ml)	HHV8+ (n=15)	HHV8- (n=57)	<i>P-value</i>
TNF-α	13,0(8,2-19,2)	14,1(9,4-18,3)	0,69
MCP-1	309,6(236,0-370,6)	258,2(175,8-343,9)	0,21
MIP1-α	44,9(23,2-584,9)	47,2(12,6-104,4)	0,28
IL-8	16,9(5,1-54,3)	25,9(9,9-142,4)	0,11
MIP1-β	53,4(31,9-97,9)	73,7(51,2-128,7)	0,11
VEGF	224,4(76,8-289,4)	233,9(141,2-313,8)	0,49

Les résultats sont présentés sous forme de médiane et de domaine interquartile (25^{ème} et 75^{ème}). ADN HHV8+ : présence de l'ADN viral HHV8, ADN HHV8- : absence de l'ADN viral HHV8, TNF α : Tumor necrosis factor alpha, MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, MIP1- α : Macrophage inflammatory protein one alpha, IL-8: Interleukin-8, MIP1- β : Macrophage inflammatory protein one beta, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Nous n'avons observé aucune différence significative du profil inflammatoire chez les patients détectés positifs pour anticorps anti-HHV8 sans ADN viral en comparaison aux patients négatifs (Tableau XXIII).

2.10. Profil inflammatoires en présence et/ ou en absence de l'ADN viral HHV8 chez des patients présentant ou pas une cétonurie.

2.10.1. Concentration de MIP1- α chez les patients KPD1 sans ADN viral patients KPD2 sans ADN viral

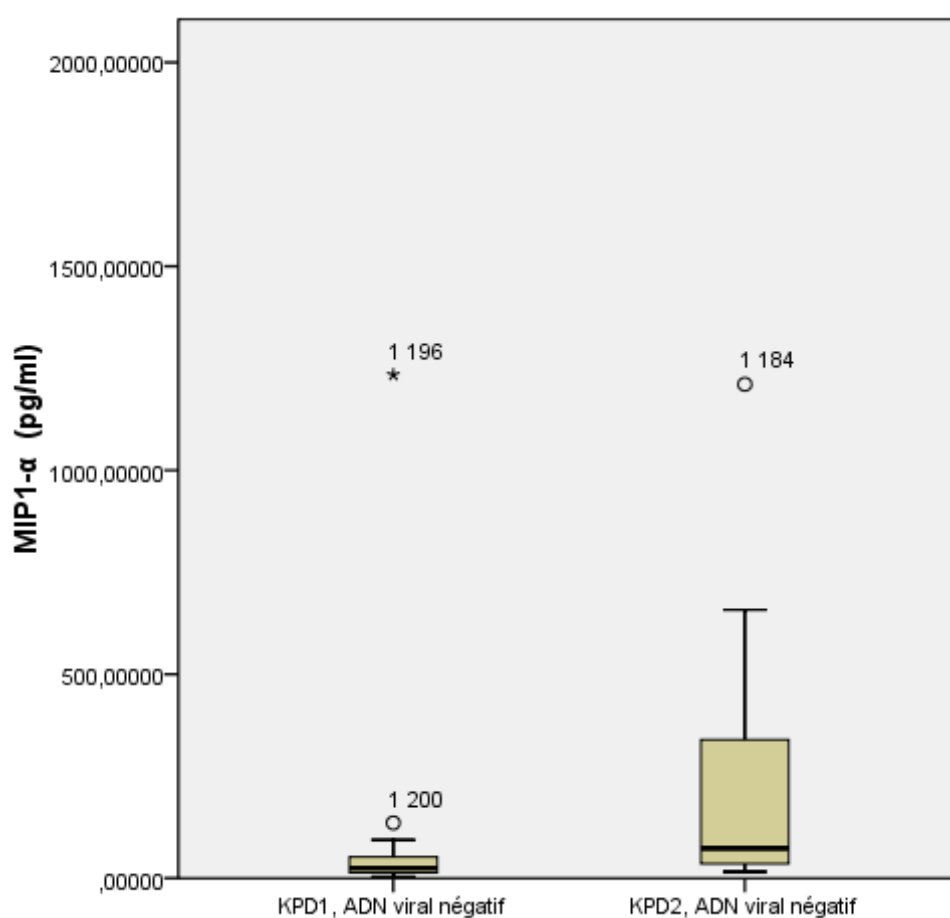


Figure 1: Concentration de MIP1- α chez les sujets KPD1 sans ADN viral versus KPD2 sans ADN viral

Les sujets KPD1 dont l'ADN viral n'avait pas été détecté, avaient des concentrations de médiane de MIP1- α inférieures aux sujets KPD2 sans ADN viral [24,7(11,9-58,5) pg/ml vs 72,8(33,6-437,7) pg/ml, $p=0,02$].

2.10.2. Concentration d'IL-8 chez les patients KPD1 sans ADN viral versus patients DT2 sans ADN viral

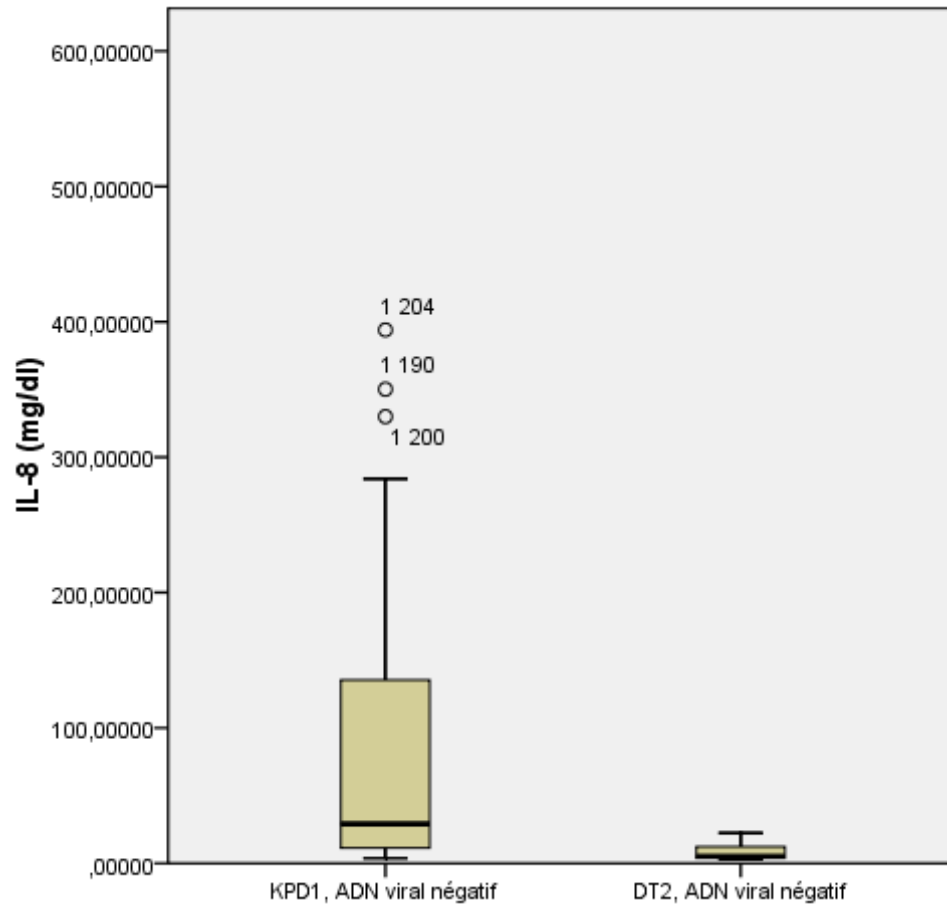


Figure 2: Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD1 sans ADN viral versus DT2 sans ADN viral

La concentration médiane d'IL-8 était plus élevée chez les sujets KPD1 vs les sujets DT2, tous sans ADN viral [29,1(11,1-138,2) pg/ml vs 5,3 (3,7-12,7) pg/ml, $p=0,001$].

2.10.3. Concentration de TNF- α chez les patients KPD1 avec ADN viral versus patients KPD2 sans ADN viral

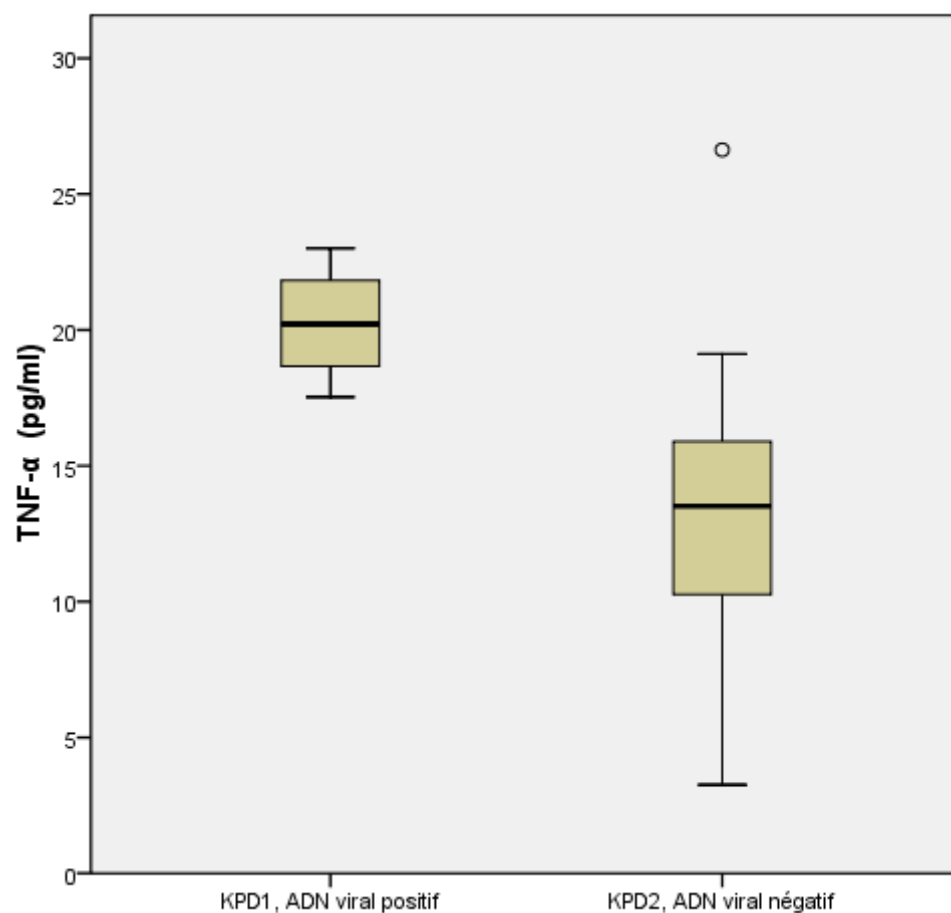


Figure 3: Concentration de TNF- α chez les sujets KPD1 avec ADN viral versus KPD2 sans ADN viral

La concentration médiane de TNF- α était plus élevée chez les sujets KPD1 avec ADN viral vs les sujets KPD2 sans ADN viral [20,2(18,0-22,4) pg/ml vs 13,5 (9,4-16,4) pg/ml, $p=0,01$].

2.10.4. Concentration de TNF- α chez les sujets KPD1 avec ADN viral versus DT2 sans ADN viral

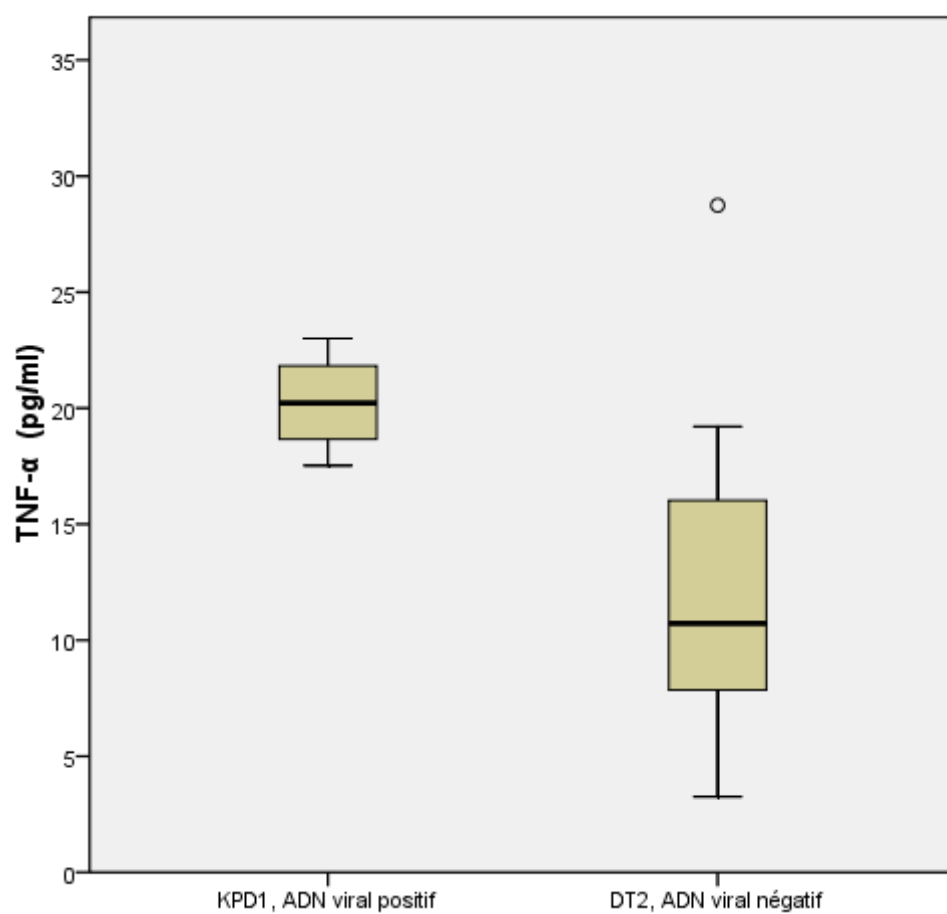


Figure 4: Concentration de TNF- α chez les sujets KPD1 avec ADN viral versus DT2 sans ADN viral

La concentration médiane de TNF- α était plus élevée chez les sujets KPD1 avec ADN viral vs les sujets DT2 sans ADN viral [20,2 (18,1-22,4) pg/ml vs 10,7(7,4-17,0) pg/ml, $p=0,029$].

2.10.5. Concentration de TNF- α chez les sujets KPD1 avec ADN viral versus DT2 avec ADN viral

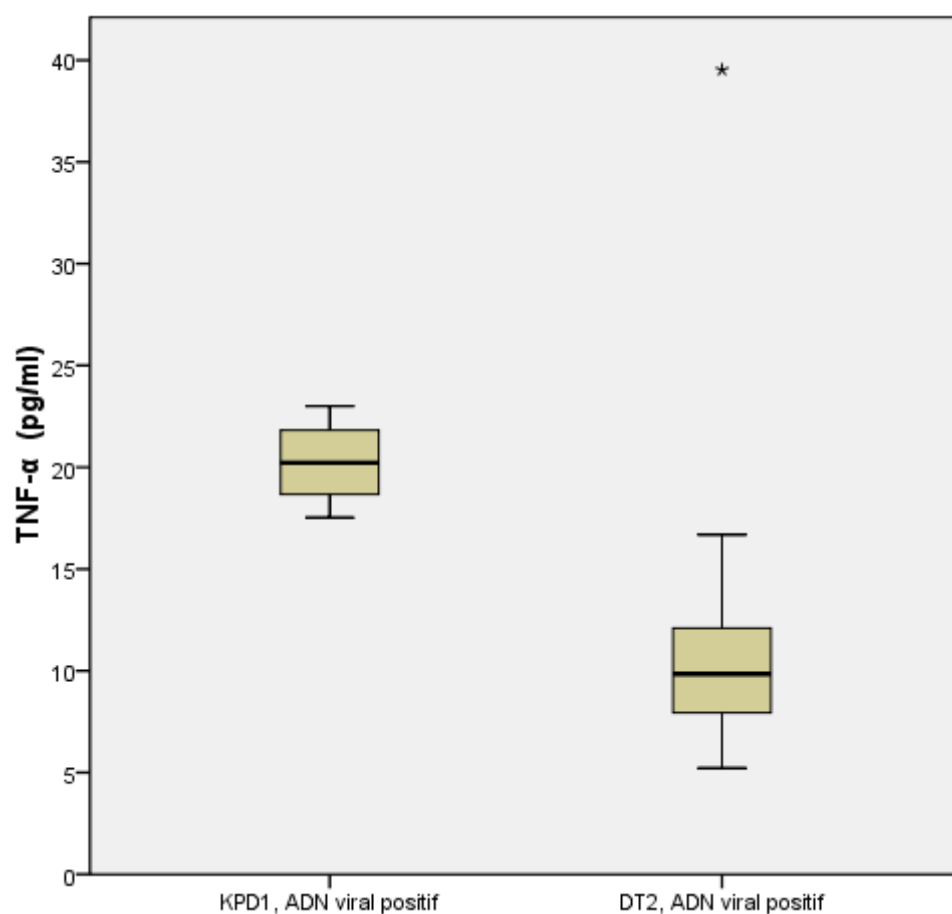


Figure 5: Concentration de TNF- α chez les sujets KPD1 avec ADN viral versus DT2 avec ADN viral

La concentration moyenne de TNF- α était plus élevée chez les sujets KPD1 avec ADN viral vs les sujets DT2 avec ADN viral [20,2(18,0-22,4) pg/ml vs 9,9(7,7-12,7) pg/ml, $p=0,01$].

2.10.6. Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD2 sans ADN viral versus DT2 sans ADN viral

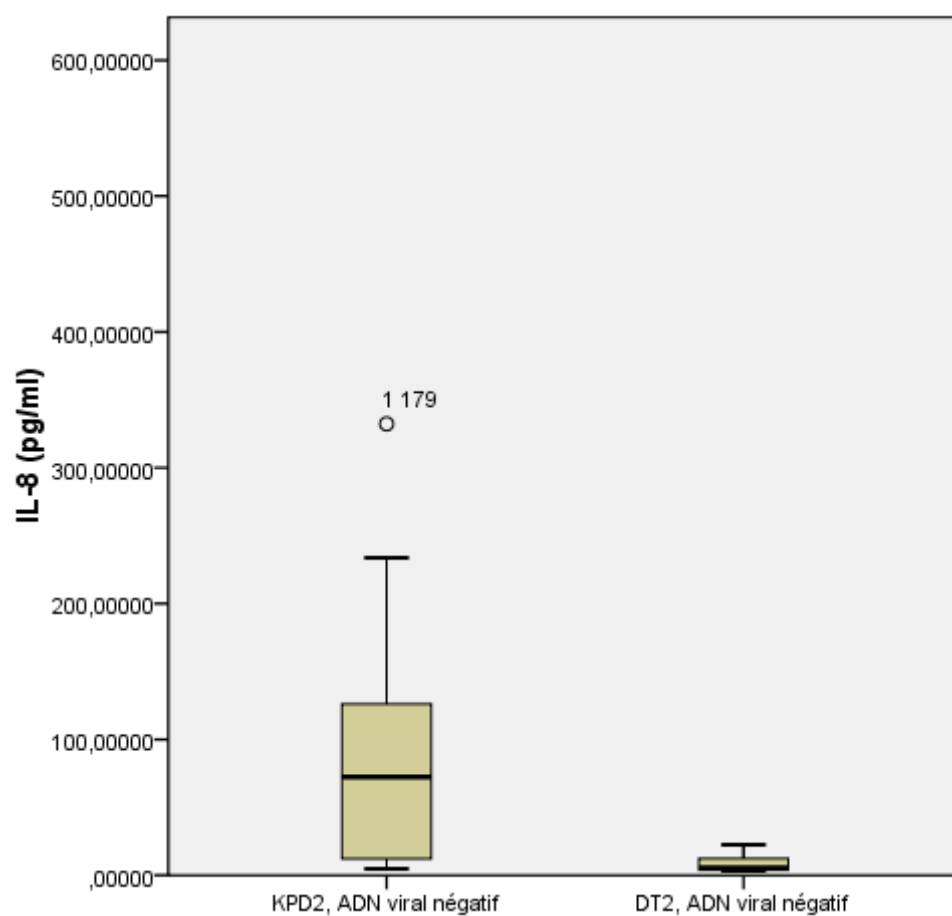


Figure 6: Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD2 sans ADN viral versus DT2 sans ADN viral

La concentration médiane d'IL-8 était plus élevée chez les sujets KPD2 sans ADN viral vs les sujets DT2 sans ADN viral [72,4(10,2-140,9) pg/ml vs 5,3 (3,7-12,8) pg/ml, p=0,00].

2.10.7. Concentration de MIP1- β chez les sujets KPD2 sans ADN viral versus DT2 sans ADN viral

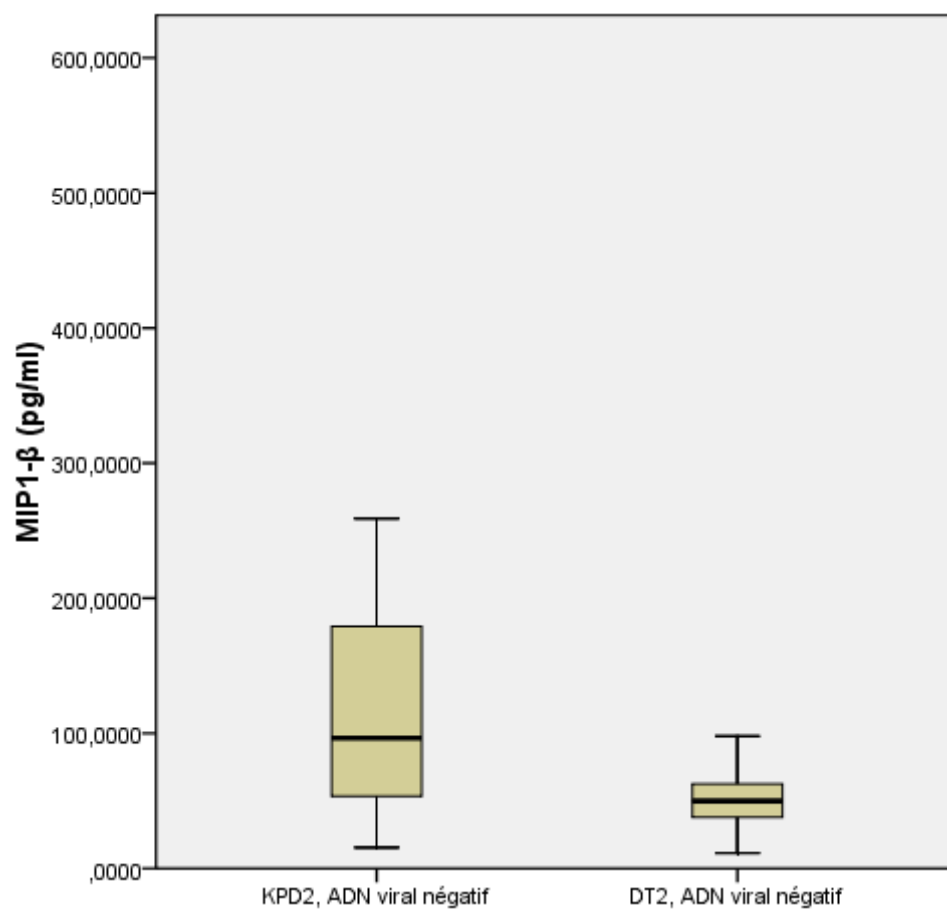


Figure 7: Concentration de MIP1- β chez les sujets KPD2 sans ADN viral versus DT2 sans ADN viral

La concentration médiane de MIP1- β était plus élevée chez les sujets KPD2 sans ADN viral vs les sujets DT2 sans ADN viral [96,5(48,4-180,2) pg/ml vs 49,9(34,9-63,5) pg/ml, $p=0,02$].

2.11. Profil inflammatoire en présence et/ ou en absence des anticorps anti-HHV8 chez des sujets présentant ou pas une cétonurie.

2.11.1. Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 sans anticorps anti-HHV8

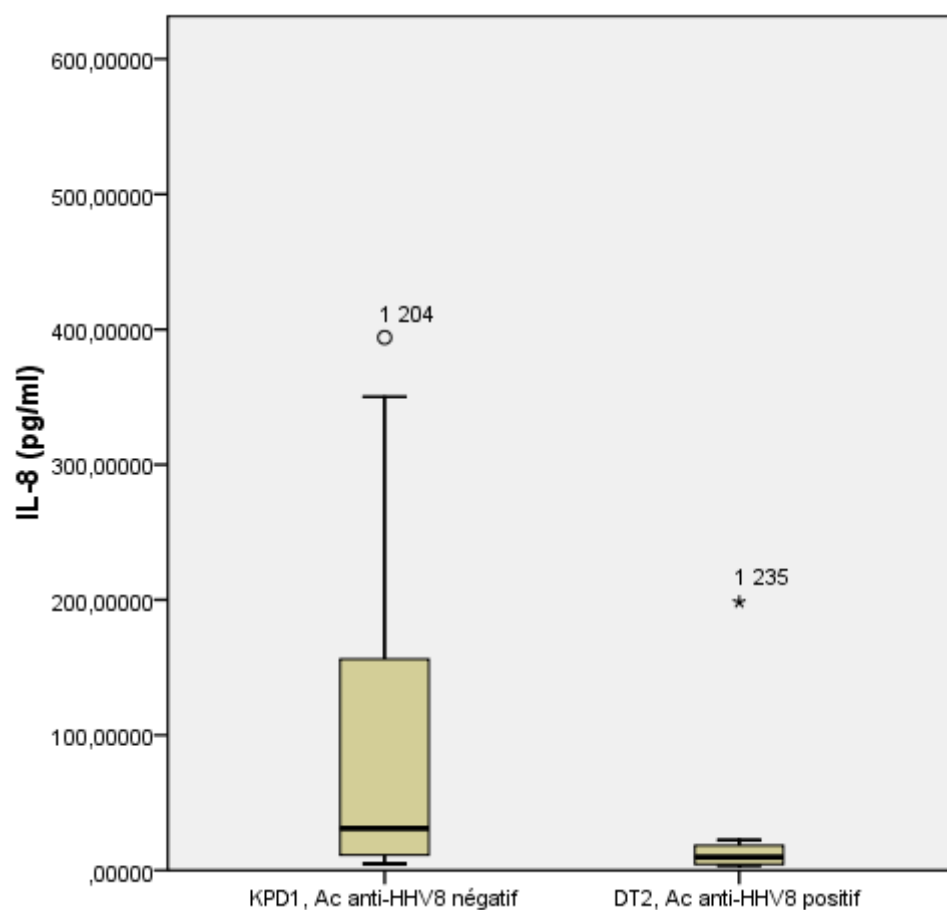


Figure 8: Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 sans anticorps anti-HHV8

La concentration médiane d'IL-8 était plus élevée chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 sans anticorps anti-HHV8 [30,9(1,11-169,7) pg/ml vs 9,9(4,2-20,4) pg/ml, $p=0,02$].

2.11.2. Concentration de MIP1- β chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 sans anticorps anti-HHV8

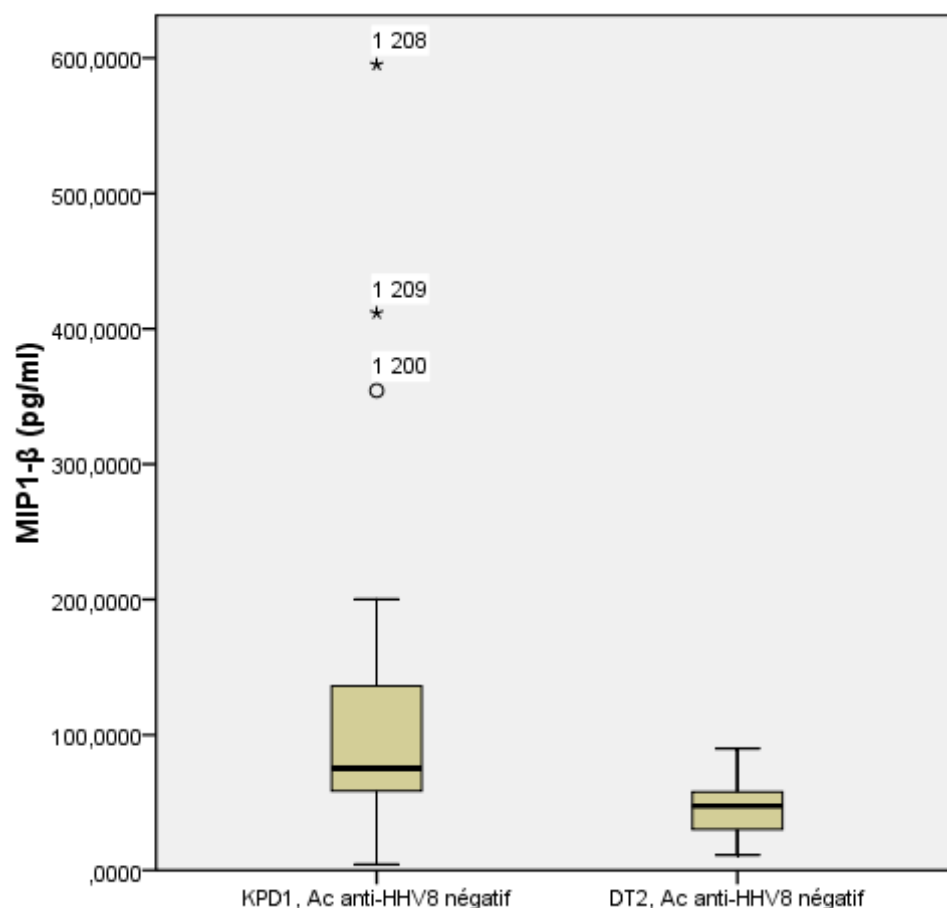


Figure 9: Concentration de MIP1- β chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 sans anticorps anti-HHV8

La concentration moyenne de MIP1- β était plus élevée chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 sans anticorps anti-HHV8 [75,4(58,1-139,9) pg/ml vs 47,6(24,2-61,2) pg/ml, $p=0,02$].

2.11.3. Concentration de MIP1- α chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 avec anticorps anti-HHV8

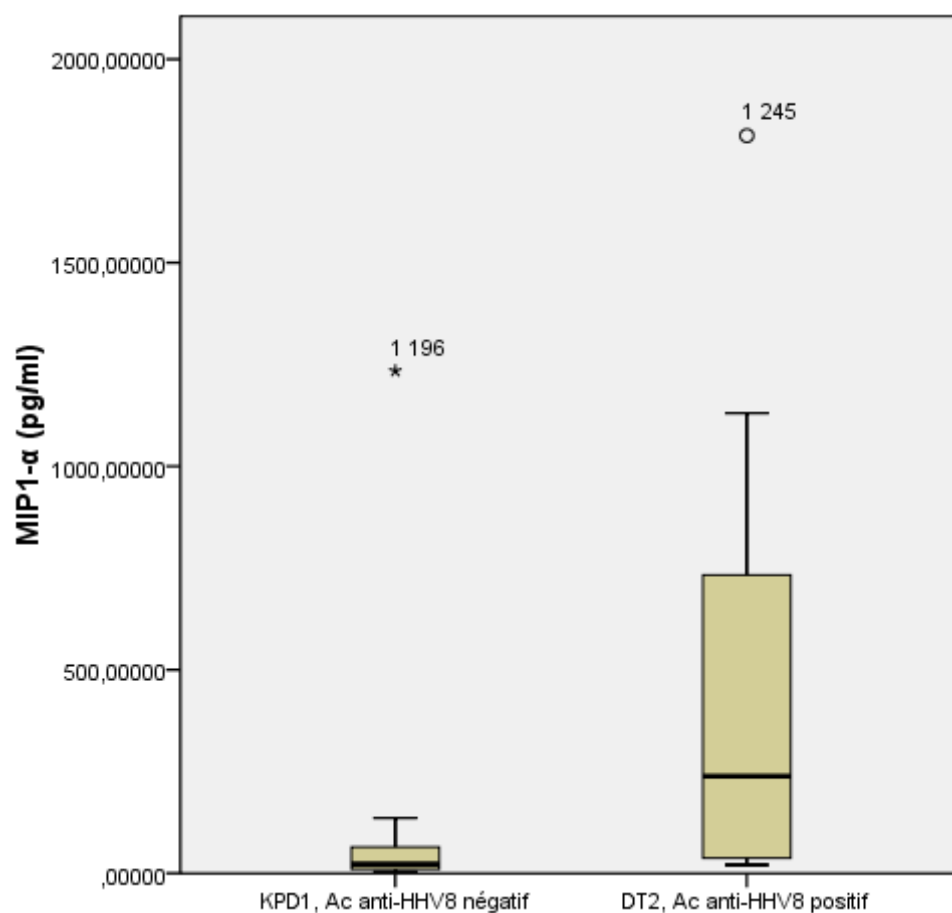


Figure 10: Concentration de MIP1- α chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 avec anticorps anti-HHV8

La concentration moyenne de MIP1- α était plus basse chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 avec anticorps anti-HHV8 [22,3(9,9-68,5) pg/ml vs 238,8(31,0-931,7) pg/ml, $p=0,00$].

2.11.4. Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 avec anticorps anti-HHV8

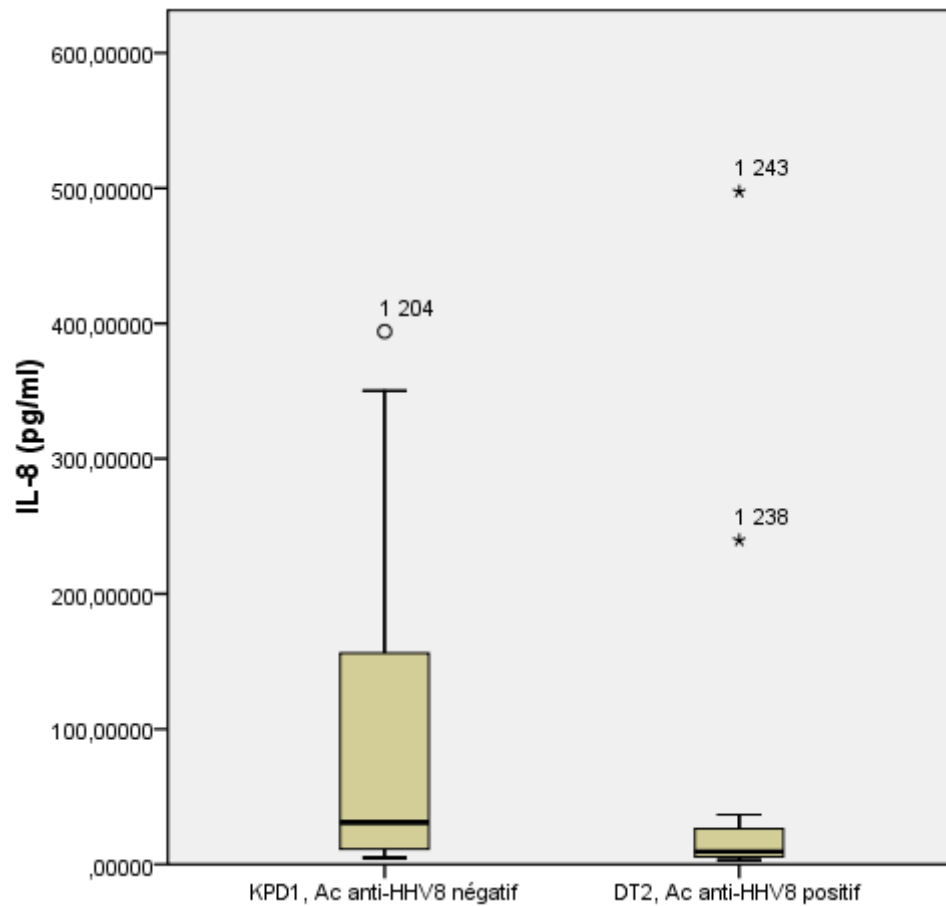


Figure 11: Concentration d'IL-8 chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 avec anticorps anti-HHV8

La concentration moyenne d'IL-8 était élevée chez les sujets KPD1 sans anticorps anti-HHV8 versus DT2 avec anticorps anti-HHV8 [30,9(11,1-169,7) pg/ml vs 9,5(5,2-33,9) pg/ml, p=0,03].

CHAPITRE V: DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE

Le but de ce travail a été de rechercher la potentielle association entre l'infection par le virus HHV8 et le KPD ; puis d'évaluer l'impact de l'infection à HHV8 sur le profil inflammatoire des phénotypes du diabète de type 2.

L'étude s'appuie sur une population de patients admis avec une décompensation hyperglycémique au Centre National d'Obésité de l'Hôpital Central de Yaoundé. Les objectifs étaient de :

- étudier la fréquence du diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD);
- étudier l'association entre le virus HHV8 et le KPD;
- rechercher si l'infection à HHV8 est associée à un profil inflammatoire pouvant participer au phénotype du diabète.

Partie V.1: Fréquence et caractéristiques cliniques du diabète non auto-immun à tendance cétosique (KPD) au sein de notre population.

Environ un tiers des patients (28,3%) parmi les patients admis pour une décompensation hyperglycémique dans le centre hospitalier ont un KPD. Cette observation montre une fréquence plus importante que celle estimée par Sobngwi et coll. en 2002 (82). Elle est également supérieure à celles rapportées par Djrolo et coll. en 2011 dans une population de diabétiques au Bénin (5,7%) et par Lokrou et coll. en 2004 à Abidjan (7%) (105, 106). La forte prévalence du KPD au sein de notre population peut en partie être attribuée aux critères d'inclusion, puisqu'il s'agissait d'une population de patients déséquilibrés hospitalisés pour cela (biais de recrutement). Djrolo et Lokrou s'appuyant sur les dossiers de patients diabétiques tous phénotypes confondus hospitalisés dans leurs services respectifs.

L'âge moyen lors du diagnostic du diabète chez tous nos patients KPD était de 47 ± 11 ans, comparables à ceux préalablement décrits entre 35 et 46 ans (19, 107). Il n'y'a pas de prévalence masculine prédominante chez nos patients KPD, bien que la littérature ait rapporté unanimement une prédominance du sexe masculin (19, 107-109). A l'instar du DT2, surpoids ou obésité ont été souvent retrouvés dans le KPD. Il en est de même dans notre population d'étude. L'IMC fluctue entre 26 et 37 kg/m² selon les auteurs et la localisation des études menées. Ces données font ressortir que la majorité des sujets est en surpoids et quelques uns sont obèses(19, 107).

Les patients KPD de notre étude ont été subdivisés en deux sous-groupes. Ceux nouvellement diagnostiqués et présentant une cétonurie (KPD1), et ceux admis en phase non cétosique (KPD2) mais ayant eu antérieurement une décompensation cétosique sans facteurs de précipitation. Ces derniers ont présenté, après une rémission initiale, une nouvelle crise d'hyperglycémie sans cétose. Les patients KPD1 avaient un IMC, une concentration de peptide-C à l'état basal et une sécrétion d'insuline (HOMA- β) bas par rapport aux KPD2 et aux DT2. Les concentrations d'insuline à l'état basal sont similaires chez les KPD2 et DT2. A contrario, l'insulinémie, à l'état basal, des patients KPD1 était inférieure à celle des patients KPD2 et DT2.

Dans le KPD, lors du diagnostic initial, les perturbations métaboliques sont plus importantes qu'au moment des rechutes. Cette observation devrait être relativisée car nous n'avons pas mené d'étude longitudinale.

La résistance à l'insuline est généralement considérée comme une des caractéristiques métaboliques retrouvée chez les patients DT2(110). Nos patients DT2 étaient plus insulino-résistants que nos patients KPD1. Parallèlement, la sensibilité à l'insuline et la concentration de peptide-C à l'état basal étaient comparables chez les patients DT2 et KPD2 ; reflétant probablement des troubles métaboliques comparables. Bien que les patients KPD1 aient une sensibilité à l'insuline comparable aux patients KPD2, leur concentration d'insuline à l'état basal était inférieure. Ces observations sont similaires à celles préalablement rapportées faisant état d'une amélioration de 80% de la sécrétion en insuline après rémission de la cétose initiale(81). De fait, un meilleur profil insulino-sécrétoire observé chez les KPD2 n'est pas surprenant. D'autre part, les patients KPD2 présentent des concentrations de HDL-cholestérol plus élevées et de triglycérides plus basses que celles retrouvées chez les patients KPD1. Cette observation reflète un profil moins athérogène chez les patients KPD non cétosiques. Le pourcentage d'HbA1c était plus élevé chez les sujets KPD1.

Notre étude montre que le KPD est fréquent chez les patients hospitalisés pour une décompensation hyperglycémique. Il est comparable aux patients DT2, vis-à-vis notamment de ceux qui ne sont pas en cétose. Les patients KPD1 ont une sécrétion en insuline plus basse. Les patients KPD en phase cétosique sécrètent moins d'insuline que ceux en phase non cétosique. Ceci s'appuie sur une concentration de peptide-C à l'état basal et un HOMA- β significativement plus bas chez les patients KPD1. Toutefois, nous n'avons pas de mesures dynamiques d'insulinosécrétion. Il serait utile de mener des études longitudinales.

Partie V.2: Etude de l'association entre l'infection par virus HHV8 et les phénotypes de diabète

A notre connaissance, seules trois études ont étudié le lien entre le virus HHV8 et le diabète(25, 36, 37). Seule l'étude de Sobngwi et coll. en 2008 a recherché le lien entre le virus HHV8 et le KPD. Celle-ci a montré une très forte séroprévalence des anticorps anti-HHV8 chez les patients KPD (87%) comparés aux sujets DT2 (15%). Ce groupe de sujets natifs d'Afrique Sub-saharienne résidait en France. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'avait été menée pour vérifier ces résultats.

Notre étude a été réalisée chez des sujets diabétiques originaires d'Afrique sub-Saharienne, résidents sur le continent, et suivis au Centre Hospitalier de Yaoundé. Elle ne montre pas de différence de séroprévalence de HHV8 dans les phénotypes de diabète. De fait, notre étude ne fait pas ressortir de séroprévalence HHV8 spécifique aux patients KPD admis pour une décompensation hyperglycémique.

Ces deux études réalisées par le même groupe d'auteurs, évaluées au sein du même laboratoire avec les mêmes méthodologies peuvent se différencier en terme de recrutement Europe versus Afrique pour un même profil de sujets étudiés. Plusieurs hypothèses pourraient contribuer à expliquer cette différence, notamment, notre recrutement, plus modeste que celui de Sobngwi et coll., la fluctuation d'échantillonnage, les recrutements effectués à des saisons différentes. Ainsi, incidence du diabète et décompensations liées au diabète, étaient quasiment superposables à celle des précipitations. Nous avons précédemment retrouvé une incidence saisonnière du diabète et des décompensations diabétiques à Yaoundé (Cameroun). Pendant 9 ans entre l'année 2000 à 2008 à Yaoundé nous avons observé que la variation de l'incidence du diabète et ses décompensations était quasiment superposable à celle des précipitations, et cette incidence semblait plus importante pendant la saison des pluies (Article 2 présenté en annexe et en révision dans le Journal *BMC Public Health*). Il a également été montré que les pathologies ayant une incidence saisonnière pourraient être associées à des infections virales(85). D'autres infections virales à l'instar du virus de l'Herpes Humain de type 6 (HHV6) associé à un diabète fulminant au Japon(111, 112), pourraient être considérées.

La séroprévalence de HHV8 chez nos sujets DT2 est comparable à celle retrouvée par Caselli et coll. en 2013 chez des sujets DT2 d'origine Sarde (55,6 vs 57,0%). A ce jour, aucune autre étude exceptée celle de notre équipe n'a évalué la fréquence de HHV8 chez le sujet KPD originaires d'Afrique Sub-saharienne. Nous rapportons pour la première fois la fréquence de

HHV8 parmi les sujets KPD selon qu'ils présentent ou non une décompensation cétosique lors de l'inclusion. Elle est respectivement de 35,3% chez les sujets KPD1 (n=34), et 46,7% chez les KPD2 (n=15) au regard de la population globale étudiée (n=173).

L'analyse de l'ADN viral montre une présence du virus HHV8 chez environ 9% de notre population d'étude. Sa fréquence est de 11,8% chez les sujets KPD1, 9% chez les DT2 et absente chez les KPD2. Nos résultats divergent des observations de Ingianni et coll. en 2007 et Sobngwi et coll. en 2008 rapportant une fréquence de 23,7% chez les sujets DT2 Sardes (37) et une présence de l'ADN viral chez près de la moitié des sujets KPD en phase aiguë d'origine d'Afrique Sub-saharienne (25), que l'on pourrait comparer à nos sujets KPD1. La taille de l'échantillon reste faible dans l'étude de Sobngwi et coll. (6/13 patients détectées positifs).

Chez les sujets pour lesquels l'ADN viral a été détecté, la charge virale est similaire à celle retrouvée chez des sujets co-infectés par les virus du VIH et du HHV8 et ne présentant pas de sarcome de Kaposi. Notre fréquence d'observation de l'ADN viral est comparable à celle retrouvée chez des sujets homosexuels infectés par le VIH et HHV8 (9,0 vs 10,3%). Ces deux observations font ressortir que l'expression et le niveau de l'ADN viral au sein de notre population non infectée par le VIH sont similaires à ceux de populations à haut risque et co-infectées. Pour autant, quelle part a HHV8 dans la physiopathologie du diabète du sujet d'Afrique Sub-Saharienne en phase de décompensation ou non, d'autant que ce virus possède une faible capacité à se répliquer. L'intérêt porté au virus HHV8 est lié au fait que ce virus est asymptomatique et possède des phases de latence et de réplication. Cette caractéristique pourrait expliquer que les différentes phases dans l'inter-relation virus système immunitaire de l'hôte pourraient se superposer à la phase de décompensation et à celle de rémission du KPD. D'autant plus que nous n'avons pas détecté d'ADN viral en « phase non cétosique » du KPD.

En Afrique sub-saharienne, la prévalence du HHV8 reste très élevée, 30 à 60% de la population générale sont infectés sans aucune manifestation clinique dans la plupart des cas. Le pourcentage de sujets infectés dans notre étude (50,9%) s'intègre parfaitement dans ces données. Il a été montré que la pathogénicité de HHV8 est liée à l'expression génotypique du virus et que son épidémiologie sur le continent Africain varie en fonction de la saison. Njiki et coll., dans une étude menée au Cameroun, montrent que 79% de leurs patients infectés par le VIH au moment de l'inclusion présentaient une séropositivité aux anticorps anti-HHV8. Celle-ci tombait à 57% douze mois plus tard (113). Ce qui laisse transparaître que plusieurs facteurs pourraient contribuer à expliquer la fluctuation virale.

La réflexion autour de l'association entre le virus HHV8 et le KPD mériterait d'être étendue à un plus grand nombre de sujets. De fait, l'ouverture à d'autres centres hospitaliers d'Afrique pourrait s'avérer opportune et la mise en place d'études longitudinales permettrait peut-être d'éclairer certaines ébauches d'hypothèses présentées. Parallèlement, l'ouverture à d'autres virus herpétiques dont HHV6 serait intéressante et pourrait contribuer à expliquer la susceptibilité au KPD en fonction de la région géographique.

Association entre HHV8, ADN viral et caractéristiques cliniques et métaboliques de la population.

Nous n'avons pas retrouvé de différences entre les caractéristiques cliniques (l'IMC, le rapport tour de taille sur tour de hanche, la pression artérielle, l'HbA1c, la glycémie à jeun, les paramètres du profil lipidique), et métaboliques (la concentration de peptide-C et d'insuline à jeun les indices, HOMA- β et HOMA-IR), chez les sujets en présence et en absence des anticorps anti-HHV8, confirmant des résultats présentés par Sobngwi et coll. en 2008 au sein d'une population de diabétiques d'origine Subsaharienne vivant en France. Toutefois, parmi ces sujets, Sobngwi et coll. en 2008, montraient que les sujets DT2 HHV8 positifs, au moment de l'inclusion, étaient beaucoup plus insulino-réquerants que les DT2 HHV8 négatifs. Cette même équipe ne mentionnait non plus de différence, en termes de complications diabétiques, entre les sujets DT2 HHV8 positifs et négatifs(25). Ingianni et coll. en 2007 rapportaient des observations similaires au plan métabolique avec toutefois une association retrouvée avec quelques complications liées au diabète(36).

Concernant la présence d'ADN viral, celle-ci se traduit chez les sujets concernés par des caractéristiques métaboliques spécifiques. Ainsi, la concentration de peptide-C, le HOMA- β et l'indice de masse corporelle sont significativement plus bas. A contrario, les concentrations de cholestérol total et de LDL-cholestérol sont plus élevées reflétant un profil athérogène plus marqué. Cependant, lorsque l'ADN viral n'est pas détecté, l'incidence au plan métabolique s'estompe, seuls les triglycérides sont élevés dans le groupe infecté. Ces données reflètent l'observation menée *in vitro* par Angius et coll., en 2015 et qui a montré que le virus HHV8 pouvait altérer le métabolisme lipidique (114). D'autre part, les sujets positifs aux anticorps anti-HHV8, et négatifs à l'ADN viral présentent un meilleur profil sécrétoire en insuline. La présence d'ADN viral signe-t-elle la réplication virale au moment de l'inclusion ? Si tel est le cas, cela laisserait à penser que la réplication est associée à une sécrétion en insuline altérée. Au final, la présence d'anticorps anti-HHV8 en absence d'ADN viral en période de latence pourrait être associée à une meilleure sécrétion en insuline.

A ce jour, nous n'avons pas recherché les protéines virales exprimées pendant la phase lytique et la phase de latence du virus HHV8. *In vitro*, l'infection de cellules endothéliales (HUVEC) par le virus HHV8 peut moduler la sensibilité à l'insuline en fonction de la phase virale(115). En effet, cette sensibilité améliorée lorsque le virus est en phase de réplication lytique, continue à s'améliorer lorsque le virus est en phase de latence(115).

Dans notre étude, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que l'infection virale peut générer à elle seule les troubles métaboliques observés, ou que ceux-ci sont le fait du diabète en soi, indépendamment de l'infection virale.

Partie V.3: Profil inflammatoire associé aux phénotypes de diabète et au statut viral.

Au plan de la population générale du groupe de patients sélectionnés parmi les sujets détectés positifs pour les anticorps anti-HHV8 (n=34) versus les sujets négatifs (n=38), indépendamment de leurs phénotypes de diabète, nous ne retrouvons pas de différence significative parmi les six cytokines et chemokines testées (TNF- α , MCP-1, MIP1- α , IL-8, MIP1- β , VEGF). Les mêmes résultats sont obtenus chez les sujets détectés positifs pour l'ADN viral (n=15) versus les sujets négatifs (n=57). Aucun des sujets HHV8 positif ne présentait de concentration supérieure à la moyenne plus ou moins deux déviations standard à celle des sujets HHV8 négatifs considérés comme ayant une inflammation de bas grade retrouvée dans le diabète(7). En sommes, HHV8 n'a pas d'impact sur le profil de cytokines testées mais ceci reste incomplet car nous n'avons pas recherché ce profil dans les PBMC, connus comme une des cibles majeures du virus. En revanche les patients en décompensation cétosique avaient un profil inflammatoire plus proinflammatoire que les patients hors cétose.

Au sein de la population des patients en décompensation cétosique, la présence de l'ADN viral ou des anticorps anti-HHV8 est associé à une augmentation du profil inflammatoire. Cette augmentation du profil inflammatoire peut être attribuée à l'importance du déséquilibre glycémique lié au déficit de l'insulinosécrétion. Le phénomène de glucotoxicité potentiel et l'insuline basse est associé à un profil plus pro-inflammatoire en relation avec les données de la littérature (116, 117). La question qui reste posée est celle de savoir si HHV8 pourrait être un facteur aggravant du syndrome inflammatoire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de rechercher la potentielle association entre l'infection par le virus HHV8 et le KPD, puis d'évaluer l'impact de l'infection à HHV8 sur le profil inflammatoire des phénotypes du diabète de type 2.

L'étude s'appuie sur une population de patients admis pour une décompensation hyperglycémique au Centre National d'Obésité de l'Hôpital Central de Yaoundé. Au terme de ce travail il en ressort que :

1. Le KPD est fréquent chez les patients hospitalisés pour « crise d'hyperglycémie » (1/3 des patients ont un KPD). Il est comparable aux patients DT2, vis-à-vis notamment de ceux qui ne sont pas en cétose. Les patients KPD en phase cétoxisque sécrètent moins d'insuline que ceux en phase non cétoxisque.

Toutefois, nous n'avons pas de mesures dynamiques d'insulinosécrétion. Il serait utile de mener des études longitudinales.

2. La prévalence du virus HHV8 est importante au sein des patients hospitalisés pour « crise d'hyperglycémie ». Notre étude ne fait pas ressortir de séroprévalence HHV8 spécifique aux patients KPD.

La réflexion autour de l'association entre le virus HHV8 et le KPD mériterait d'être étendue à un plus grand nombre de sujets. De fait, l'ouverture à d'autres centres hospitaliers d'Afrique pourrait s'avérer opportune et la mise en place d'études longitudinales. Parallèlement, l'ouverture à d'autres virus herpétiques dont HHV6 serait intéressante et pourrait contribuer à expliquer la susceptibilité au KPD en fonction de la région géographique.

Au plan clinique et métabolique, la présence de l'ADN viral HHV8 est associée à un déficit de sécrétion en insuline, un profil athérogénique et un indice de masse corporelle plus bas. En revanche, en absence de l'ADN viral, la positivité aux anticorps anti-HHV8 est associée à une meilleure sécrétion en insuline.

Toutefois, nous ne savons pas si la présence d'ADN viral signe la réplication virale au moment de l'inclusion. Nous nous proposons de :

- Rechercher les protéines virales exprimées pendant la phase de réplication et de latence du virus HHV8 à différentes phases du KPD (phase aiguë cétoxisque vs phase de rémission),

- Effectuer des études *in vitro* dans lesquelles des cellules humaines β pancréatiques seront cultivées en présence et en absence des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) infectées par HHV8:
 - Nous mesurerons la sécrétion d'insuline en réponse au glucose,
 - Nous mesurerons l'expression des gènes cruciaux de la sécrétion en insuline (glucokinase,)
3. Les cytokines et chemokines étudiées ne sont pas des facteurs discriminant possiblement associés à l'infection par le virus HHV8. L'ensemble des résultats obtenus selon le groupe de patients présence et absence des anticorps anti-HHV8 et ou de l'ADN viral ne permet pas de ressortir de différences significatives des concentrations en cytokines. En revanche les patients en décompensation cétosique avaient un profil inflammatoire plus proinflammatoire que les patients hors cétose. Au sein de la population des patients en décompensation cétosique, la présence de l'ADN viral ou des anticorps anti-HHV8 est associé à une augmentation du profil inflammatoire. En sommes, HHV8 n'a pas d'impact sur le profil de cytokines testées. Nous nous proposons de rechercher le profil inflammatoire dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC), connus comme une des cibles majeures du virus.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas 6th edition IDF. 2013.
2. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997;20:1183-97.
3. Sobngwi E, Gautier JF. Adult-onset idiopathic Type I or ketosis-prone Type II diabetes: evidence to revisit diabetes classification. Diabetologia 2002;45(2):283-5.
4. Butcher MJ, Hallinger D, Garcia E. Association of proinflammatory cytokines and islet resident leucocytes with islet dysfunction in type 2 diabetes. Diabetologia 2014.;57:491-501.
5. Kiely A, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P. Pro-inflammatory cytokines increase glucose, alanine and triacylglycerol utilization but inhibit insulin secretion in a clonal pancreaticb-cell line. Journal of Endocrinology 2007;195:113–123.
6. Souza KL, Gurgul-Convey E, Elsner M, Lenzen S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. J Endocrinol. 2008;197:139-50.
7. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. Curr Diab Rep. 2013;13(3):435-44.
8. Asanghanwa M, Gorus FK, Weets I, al. e. Clinical and biological characteristics of diabetic patients under age 40 in Cameroon: relation to autoantibody status and comparison with Belgian patients. Diabetes Res Clin Pract 2014;103:97-105.
9. Osei K, Schuster DP, Amoah AG, Owusu SK. Diabetes in Africa. Pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus in sub-Saharan Africa: implications for transitional populations. J Cardiovasc Risk 2003;10:85-96.
10. Chauffert M, Cissé A, Chevenne D, al. HLA-DQ beta 1 typing and non-Asp 57 alleles in the aborigine population of Senegal. Diabetes Care 1995;18:677-80.
11. Umpierrez GE, Woo W, Hagopian WA, Isaacs SD, Palmer JP, Gaur LK, et al. Immunogenetic analysis suggests different pathogenesis for obese and lean African-Americans with diabetic ketoacidosis. Diabetes Care 1999;22:1517-23.
12. Balti EV, Ngo-Nemb MC, Lontchi-Yimagou E, Atogho-Tiedeu B, Effoe VS, Akwo EA, et al. Association of HLA class II markers with autoantibody-negative ketosis-prone atypical diabetes compared to type 2 diabetes in a population of sub-Saharan African patients. Diabetes Res Clin Pract. 2015;107(1):31-6.
13. Umpierrez GE, Casals MM, Gebhart SP, Mixon PS, Clark WS, Phillips LS. Diabetic ketoacidosis in obese African-Americans. Diabetes 1995;44(7):790-5.

14. Banerji MA, Chaiken RL, Lebovitz HE. Long-term normoglycemic remission in black newly diagnosed NIDDM subjects. *Diabetes* 1996;45(3):337-41.
15. Nagasaka S, Ishikawa S, Itabashi N, Rokkaku K, Saito T. Ketoacidosis-onset type 2 diabetes in Japanese. Association with the widespread distribution of soft drinks and vending machines. *Diabetes Care* 1998;21(8):1376-8.
16. Tan KC, Mackay IR, Zimmet PZ, Hawkins BR, Lam KS. Metabolic and immunologic features of Chinese patients with atypical diabetes mellitus [In Process Citation]. *Diabetes Care* 2000;23(3):335-8.
17. Tan H, Zhou Y, Yu Y. Characteristics of diabetic ketoacidosis in Chinese adults and adolescents -- a teaching hospital-based analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;97(2):306-12.
18. Pitteloud N, Philippe J. Characteristics of Caucasian type 2 diabetic patients during ketoacidosis and at follow-up. *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130(16):576-82.
19. Sobngwi E, Mauvais-Jarvis F, Vexiau P, Mbanya JC, Gautier JF. Diabetes in africans. Part 2; Ketosis prone atypical diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 2002;28(1):5-12.
20. Choukem SP, Sobngwi E, Fetita LS, Boudou P, KERVILER ED, BOIRIE Y, et al. Multitissue Insulin Resistance Despite Near Normoglycemic Remission in Africans With Ketosis Prone Diabetes. *Diabetes Care* 2008;31:2332–2337.
21. Choukem SP, Sobngwi E, Boudou P, Fetita LS, Porcher R, Ibrahim F, et al. β - and α -cell dysfunctions in africans with ketosis-prone atypical diabetes during near-normoglycemic remission. *Diabetes Care.* 2013;36(1):118-23.
22. Nguewa JL, Lontchi-Yimagou E, Riveline JP, Choukem SP, Balde N, Mbanya JC, et al. Infections virales et diabète en Afrique. *Médecine des Maladies Métabolique.* 2015.;9(2):151-157.
23. Loechelt BJ, Boulware D, Green M, Baden LR, Gottlieb P, Krause-Steinrauf H, et al. Epstein-Barr and other herpesvirus infections in patients with early onset type 1 diabetes treated with daclizumab and mycophenolate mofetil. *Clin Infect Dis.* 2013;56(2):248-54.
24. Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology.* 2003 Dec;38(6):1384-92.
25. Sobngwi E, Choukem SP, Agbalika F, Blondeau B, Fetita LS, Lebbe C, et al. Ketosis-Prone Type 2 Diabetes Mellitus and Human Herpesvirus 8 Infection in Sub-Saharan Africans. *JAMA* 2008;299(23):2770-2776.
26. Mauvais-Jarvis F, Smith SB, Le May C, Leal SM, Gautier JF, Molokhia M, et al. PAX4 gene variations predispose to ketosis prone diabetes. *Hum Mol Genet* 2004;13:3151–9.

27. Mauvais-Jarvis F, Boudou P, Sobngwi E, Gautier JF. The polymorphism Gly574Ser in the transcription factor HNF-1 α is not a marker of adult-onset ketosis-prone atypical diabetes in Afro-Caribbean patients. *Diabetologia* 2003.
28. Maldonado M, Hampe CS, Gaur LK, D'Amico S, Iyer D, Hammerle LP, et al. Ketosis-Prone Diabetes: Dissection of a Heterogeneous Syndrome Using an Immunogenetic and beta-Cell Functional Classification, Prospective Analysis, and Clinical Outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5090-5098.
29. Sobngwi E, Vexiau P, Levy V, Lepage V, Mauvais-Jarvis F, Leblanc H, et al. Metabolic and immunogenetic prediction of long-term insulin remission in African patients with atypical diabetes. *Diabet Med* 2002;19(10):832-5.
30. Banerji MA, Chaiken RL, Huey H, Tuomi T, Norin AJ, Mackay IR, et al. GAD antibody negative NIDDM in adult black subjects with diabetic ketoacidosis and increased frequency of human leukocyte antigen DR3 and DR4. *Flatbush diabetes. Diabetes* 1994;43(6):741-5.
31. Nalini R, Ozer K, Maldonado M, Patel SG, Hampe CS, Guthikonda A, et al. Presence or absence of a known DKA precipitant defines distinct syndromes of “A- β +” Ketosis-Prone Diabetes (KPD) based on long-term beta cell function, HLA class II alleles, and gender predilection. *Metabolism*. **2010**;59(10):1448–1455.
32. Sobngwi E, Gautier JF, Kevorkian JP, Villette JM, Riveline JP, Zhang S, et al. High prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency without gene mutation suggests a novel genetic mechanism predisposing to ketosis prone diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4446–51.
33. Patel SG, Hsu JW, Jahoor F, al. e. Pathogenesis of A- β + ketosis-prone diabetes. *Diabetes* 2013;62:912-22.
34. Crispo A, Tamburini M, De Marco MR, al. e. HHV-8 prevalence, immunosuppression and Kaposi's sarcoma in South Italy. *Int J Mol Med* 2001;7(5):(535-538).
35. Weissmann A, Linn S, Weltfriend S, Friedman-Birnbaum R. Epidemiological study of classic Kaposi's sarcoma: a retrospective review of 125 cases from Northern Israel. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000;14(2):91-95.
36. Ingianni A, Carta F, Reina A, Manai M, Desogus A, Pompei R. Prevalence of Herpesvirus 8 Infection in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *American Journal of Infectious Diseases* 2007;3(3):123-127.

37. Caselli E, Rizzo R, Ingianni A, Contini P, Pompei R, Di Luca D. "High prevalence of HHV8 infection and specific killer cell immunoglobulin-like receptors allotypes in Sardinian patients with type 2 diabetes mellitus." *J Med Virol* 2013;30.
38. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21(9):1414-31.
39. Mbanya JC, Cruickshank JK, Forrester T, Balkau B, Ngogang JY, Riste L, et al. Standardized comparison of glucose intolerance in west African-origin populations of rural and urban Cameroon, Jamaica, and Caribbean migrants to Britain. *Diabetes Care* 1999;22(3):434-40.
40. Sobngwi E, Mauvais-Jarvis F, Vexiau P, Mbanya JC, Gautier JF. Diabetes in Africans. Part 1: epidemiology and clinical specificities. *Diabetes Metab* 2001;27(6):628-34.
41. Gautier JF, Sobngwi E, Vexiau P. [How to treat and manage the black diabetic patient]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 2001;165-78.
42. Joffe BI, Panz VR, Wing JR, Raal FJ, Seftel HC. Pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the black population of southern Africa. *Lancet* 1992;340(8817):460-2.
43. Joffe BI, Seftel HC. Diabetes mellitus in the black communities of southern Africa. *J Intern Med* 1994;235(2):137-42.
44. Gill G, Mbanya JC, Alberti KG. *Diabetes in Africa*. Cambridge: FSG Communications; 1997.
45. Sobngwi E, Mbanya JC, Unwin NC, Porcher R, Kengne AP, Fezeu L, et al. Exposure over the life course to an urban environment and its relation with obesity, diabetes, and hypertension in rural and urban Cameroon. *Int J Epidemiol* 2003;in press.
46. Babalola RO. *Cities in a globalizing world : global report on human settlements* 2001. London ; Sterling, VA: Earthscan Publications; 2001.
47. Sobngwi E, Mbanya JC, Unwin NC, Kengne AP, Fezeu L, Minkoulou EM, et al. Physical activity and its relationship with obesity, hypertension and diabetes in urban and rural Cameroon. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26(7):1009-16.
48. Sobngwi E, Gautier JF, Mbanya JC. Exercise and the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* 2003;348(1):77-79.
49. Singh J, Prentice AM, Diaz E, Coward WA, Ashford J, Sawyer M, et al. Energy expenditure of Gambian women during peak agricultural activity measured by the doubly-labelled water method. *Br J Nutr* 1989;62(2):315-29.

50. Heini AF, Minghelli G, Diaz E, Prentice AM, Schutz Y. Free-living energy expenditure assessed by two different methods in rural Gambian men. *Eur J Clin Nutr* 1996;50(5):284-9.
51. Benefice E, Cames C. Physical activity patterns of rural Senegalese adolescent girls during the dry and rainy seasons measured by movement registration and direct observation methods. *Eur J Clin Nutr* 1999;53(8):636-43.
52. Mennen LI, Mbanya JC, Cade J, Balkau B, Sharma S, Chungong S, et al. The habitual diet in rural and urban Cameroon. *Eur J Clin Nutr* 2000;54(2):150-4.
53. Mbanya JC, Mfopou JK, Sobngwi E, Mbanya DN, Ngogang JY. Metabolic and hormonal effects of five common African diets eaten as mixed meals: the Cameroon Study. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(4):580-585.
54. Aspray TJ, Mugusi F, Rashid S, Whiting D, Edwards R, Alberti KG, et al. Rural and urban differences in diabetes prevalence in Tanzania: the role of obesity, physical inactivity and urban living. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94(6):637-44.
55. Papoz L, Delcourt C, Ponton-Sanchez A, Lokrou A, Darrack R, Toure IA, et al. Clinical classification of diabetes in tropical west Africa. *Diabetes Res Clin Pract* 1998;39(3):219-27.
56. Boyle JP, Engelgau MM, Thompson TJ, Goldschmid MG, Beckles GL, Timberlake DS, et al. Estimating prevalence of type 1 and type 2 diabetes in a population of African Americans with diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* 1999;149(1):55-63.
57. Drabo PY, Kabore J, Lengani A, Ilboudo PD. [Diabetes mellitus at the National Hospital Center of Ouagadougou (Burkina Faso)]. *Bull Soc Pathol Exot* 1996;89(3):185-90.
58. Ducorps M, Ndong W, Jupkwo B, Belmejdoub G, Poirier JM, Mayaudon H, et al. Epidemiological aspects of diabetes in Cameroon: what is the role of tropical diabetes? *Diabetes Metab* 1997;23(1):61-7.
59. Elamin A, Omer MI, Zein K, Tuvemo T. Epidemiology of childhood type I diabetes in Sudan, 1987-1990. *Diabetes Care* 1992;15(11):1556-9.
60. Kadiki OA, Roaaid RB, Bhairi AM, Elamari IM. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Benghazi, Libya (1991-1995). *Diabetes Metab* 1998;24(5):424-7.
61. Tull ES, Roseman JM, Christian CL. Epidemiology of childhood IDDM in U.S. Virgin Islands from 1979 to 1988. Evidence of an epidemic in early 1980s and variation by degree of racial admixture. *Diabetes Care* 1991;14(7):558-64.
62. Elbagir MN, Eltom MA, Berne C. Classification of newly-onset IDDM and NIDDM in subjects aged 25-45 years in Sudan. *J Intern Med* 1998;244:443-50.

63. Gill GV, Huddle KR, Rolfe M. Mortality and outcome of insulin-dependent diabetes in Soweto, South Africa. *Diabet Med* 1995;12(6):546-50.
64. Nambuya AP, Otim MA, Whitehead H, Mulvany D, Kennedy R, Hadden DR. The presentation of newly-diagnosed diabetic patients in Uganda. *Qjm* 1996;89(9):705-11.
65. Harris MI. Noninsulin-dependent diabetes mellitus in black and white Americans. *Diabetes Metab Rev* 1990;6(2):71-90.
66. Cooper R, Rotimi C. Hypertension in blacks. *Am J Hypertens* 1997;10:804-812.
67. Gebre-Yohannes A, Rahlenbeck SI. Glycaemic control and its determinants in diabetic patients in Ethiopia. *Diabetes Res Clin Pract* 1997;35(2-3):129-34.
68. Kalk WJ, Joannou J, Ntsepo S, Mahomed I, Mahanlal P, Becker PJ. Ethnic differences in the clinical and laboratory associations with retinopathy in adult onset diabetes: studies in patients of African, European and Indian origins. *J Intern Med* 1997;241(1):31-7.
69. Eberhardt MS, Lackland DT, Wheeler FC, German RR, Teutsch SM. Is race related to glycemic control? An assessment of glycosylated hemoglobin in two South Carolina communities. *J Clin Epidemiol* 1994;47(10):1181-9.
70. Mbanya JC, Sobngwi E. Diabetes microvascular and macrovascular disease in Africa. *Journal of Cardiovascular Risk* 2003;10(2):97-102.
71. Drabo PY, Kabore J, Lengani A. [Complications of diabetes mellitus at the Hospital Center of Ouagadougou]. *Bull Soc Pathol Exot* 1996;89(3):191-5.
72. Mbanya JC, Sobngwi E, Mbanya DNS, Ngu KB. Left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction in a diabetic population of Cameroon. *Diabete Metab* 2001;27(6):in press.
73. Babalola RO, Ajayi AA. A cross-sectional study of echocardiographic indices, treadmill exercise capacity and microvascular complications in Nigerian patients with hypertension associated with diabetes mellitus. *Diabet Med* 1992;9(10):899-903.
74. Ramaiya KL, Denver E, Yudkin JS. Diabetes, impaired glucose tolerance and cardiovascular disease risk factors in the Asian Indian Bhatia community living in Tanzania and in the United Kingdom. *Diabet Med* 1995;12(10):904-10.
75. Choukem SP, Fabreguettes C, Akwo E, orcher R, Nguewa JL, Bouche C, et al. Influence of migration on characteristics of type 2 diabetes in sub-Saharan Africans. *Diabetes Metab.* 2014;40(1):56-60.
76. Alberti KGMM. Tropical pancreatic diabetes. In: Gill G, Mbanya JC, Alberti KG, editors. *Diabetes in Africa*. Cambridge: FSG Communications; 1997.

77. Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. Geneva: World Health Organisation; 1985.
78. McMillan DE, Geevarghese PJ. Dietary cyanide and tropical malnutrition diabetes. *Diabetes Care* 1979;2(2):202-8.
79. Mathangi DC, Deepa R, Mohan V, Govindarajan M, Namasivayam A. Long-term ingestion of cassava (tapioca) does not produce diabetes or pancreatitis in the rat model [In Process Citation]. *Int J Pancreatol* 2000;27(3):203-8.
80. Swai AB, McLarty DG, Mtinangi BL, Tataa S, Kitange HM, Mlingi N, et al. Diabetes is not caused by cassava toxicity. A study in a Tanzanian community. *Diabetes Care* 1992;15(10):1378-85.
81. Mauvais-Jarvis F, Sobngwi E, Porcher R, al e. Ketosis-prone type 2 diabetes in patients of sub-Saharan African origin: clinical pathophysiology and natural history of beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Diabetes* 2004;53(3):645-653.
82. Sobngwi E, Mauvais-Jarvis F, Vexiau P, Mbanya JC, Gautier JF. Diabetes in Africans part 2: ketosis prone atypical diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 2002;28(1):5-12.
83. Hyöty H, Taylor KW. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 2002 Oct;45(10):1353-61.
84. Crispo A, Tamburini M, De Marco MR, al. e. HHV-8 prevalence, immunosuppression and Kaposi's sarcoma in South Italy. *Int J Mol Med* 2001;7(5):535-538.
85. Gamble DR, Taylor KW. Seasonal incidence of diabetes mellitus. *BMJ* 1969;3:631.
86. Imai Y, Dobrian AD, Weaver JR, Butcher MJ, Cole BK, Galkina EV, et al. Interaction between cytokines and inflammatory cells in islet dysfunction, insulin resistance, and vascular disease. *Diabetes Obes Metab*. 2013 September;15(3):117–129.
87. Souza KLA, Gurgul-Convey E, Elsner M, Lenzen S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. *Journal of Endocrinology* 2008;197:139–150.
88. DeFuria J, Belkina AC, Jagannathan-Bogdan M, Snyder-Cappione J, Carr JD, Nersesova YR, et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *PNAS* 2013;110(13):5133–5138.
89. Pickup J. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):813-823.
90. Kolb H, Mandrup-Poulsen T. An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia*. 2005;48(6):1038-1050.

91. Menart-Houtermans B, Rütter R, Nowotny B, Rosenbauer J, Koliaki C, Kahl S, et al. Leukocyte profiles differ between type 1 and type 2 diabetes and are associated with metabolic phenotypes: results from the German Diabetes Study (GDS). *Diabetes Care*. 2014 Aug;37(8):2326-33.
92. Igoillo-Esteve M, Marselli L, Cunha DA, Ladrière L, Ortis F, Grieco FA, et al. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010;53:1395–1405.
93. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(8):1686-8.
94. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009 Jun;52(6).
95. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2002;110(6):851-60.
96. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Apr;5(4):219-26.
97. Brooks-Worrell BM, Iyer D, Coraza I, Hampe CS, Nalini R, Ozer K, et al. Islet-specific T-cell responses and proinflammatory monocytes define subtypes of autoantibody-negative ketosis-prone diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(12):4098-103.
98. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. "Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge." *Clinical Chemistry* 1972;18:499-502.
99. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. "Enzymatic determination of serum total cholesterol." *Clinical Chemistry* 1974; 20:470-475.
100. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. "Rapid method for the isolation of lipoprotein from human serum by precipitation with polyanions." *Journal of Lipid Research* 1970;11:583.
101. Buccolo G, David H. "Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes." *Clinical Chemistry* 1973;19:476-482.
102. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1997;20(7):1087-92.
103. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-418.

104. Sobngwi E, Kengne AP, Echouffo-Tcheugui JB, Choukem SP, Sobngwi-Tambekou J, Balti EV, et al. Fasting insulin sensitivity indices are not better than routine clinical variables at predicting insulin sensitivity among Black Africans: a clamp study in sub-Saharan Africans. *BMC Endocr Disord*. 2014;9(14):65.
105. Djrolo F, Amoussou- Guenou D, Wanvoegbe A, Glitho S. *Louvain Med* 2011;130(4):97-98.
106. Lokrou A, Abodo J, Ankotché A, Dem-Niacadé AM, Azoh J, Laubhouet MD, et al. Le diabète sucré atypique avec tendance à la cétose en Côte d'Ivoire. *Diabetes Metab* 2004;30:1S36.
107. Umpierrez GE, Smiley D, Kitabchi AE. Ketosis-Prone Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med* 2006;144:350-357.
108. Balasubramanyam A, Nalini R, Hampe CS., Maldonado M. Syndromes of Ketosis-Prone Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews* 2008;29(3):292–302.
109. Wang X, Tan H. Male predominance in ketosis-prone diabetes mellitus. *Biomed Rep*. 2015 Jul;3(4):439-442.
110. Cefalu WT. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001;226:13-26.
111. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies: Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 2000;342(5):301-307.
112. Imagawa A, Hanafusa T, Makino H, Miyagawa JI, Juto P. High titres of IgA antibodies to enterovirus in fulminant type-1 diabetes. *Diabetologia* 2005;48(2):290-293.
113. Njiki BJ, Ndom P, Mupang L, Agokeng DS. Séroprévalence du virus de l'herpès humain-8 chez des patients VIH positif à l'hôpital général de Yaoundé - Cameroun. *Pan African Medical Journal*. 2015;20:69.
114. Angius F, Uda S, Piras E, Spolitu S, Ingiani A, Batetta B, et al. Neutral lipid alterations in Human Herpesvirus 8-infected HUVEC cells and their possible involvement in neo-angiogenesis. *BMC Microbiology* 2015;15:74.
115. Ingiani A, Piras E, Laconi S, Angius F, Batetta B, Pompei R. Latent Herpesvirus 8 infection improves both insulin and glucose uptake in primary endothelial cells. *NEWMICROBIOLOGICA*, 2013;36,:257-265.

116. Juan L, Minglian H, Xingping S. The association of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in diabetic patients with hyperglycemic crisis. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2014;28:662–666.
117. Chaudhuri A, E. UG. Oxidative stress and inflammation in hyperglycemic crises and resolution with insulin: implications for the acute and chronic complications of hyperglycemia. *J Diabetes Complications*. 2012 Jul-Aug;26(4):257–258.

ANNEXES

ANNEXE 1: Liste des publications en rapport avec le sujet de thèse

Article 5: Association of HLA class II markers with autoantibody-negative ketosis-prone atypical diabetes compared to type 2 diabetes in a population of sub-Saharan African patients.

Balti EV, Ngo-Nemb MC, **Lontchi-Yimagou E**, Atogho-Tiedeu B, Effoe VS, Akwo EA, Dehayem MY, Mbanya JC, Gautier JF, Sobngwi E. Association of HLA class II markers with autoantibody-negative ketosis-prone atypical diabetes compared to type 2 diabetes in a population of sub-Saharan African patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015,107(1): 31-36.

Article 6: Seasonality in diabetes in Yaounde, Cameroon: a relation with precipitation and temperature.

Lontchi-Yimagou Eric, Maurice Tsalefac, Leonelle Monique Teuwa Tapinmene, Jean Jacques N. Noubiap, Eric Vounsia Balti, Mesmin Dehayem, Jean-Louis Nguewa, Eugene Sobngwi. Seasonality in diabetes in Yaounde, Cameroon: a relation with precipitation and temperature. *BMC Public Health*. Soumis, 2015.

Article 7: Fasting insulin sensitivity indices are not better than routine clinical variables at predicting insulin sensitivity among Black Africans: a clamp study in sub-Saharan Africans.

Sobngwi E, Kengne AP, Echouffo-Tcheugui JB, Choukem S, Sobngwi-Tambekou J, Balti EV, Pearce MS, Siaha V, Mamdjokam AS, Effoe V, **Lontchi-Yimagou E**, Donfack OT, Atogho-Tiedeu B, Boudou P, Gautier JF, Mbanya JC. Fasting insulin sensitivity indices are not better than routine clinical variables at predicting insulin sensitivity among Black Africans: a clamp study in sub-Saharan Africans. *BMC Endocr Disord.* 2014, 9;14:65.

ANNEXE 2: Autorisations administratives de recherche

2a. Autorisation du Comité National d’Ethique et de la Recherche du Cameroun

2b. Autorisation de l'Hôpital Central de Yaoundé