

TLEMCEM
N° d'Ordre



UNIVERSITÉ DE TLEMCEM – ABOU-BEKRBELKAÏD
FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM

THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de
Docteur 3^{ème} Cycle LMD en Biologie
Spécialité Immunologie Appliquée

par :

Lamia YSMAIL-DAHLOUK

Soutenue publiquement le 01 Juillet 2017

Intitulé :

Effet de la vitamine D₃ sur la modulation des balances immunologiques au début du diabète de type 1

————— ***Sous la direction du Professeur Mourad ARIBI*** —————

Jury

Pr. BELARBI Meriem	Université de Tlemcen, Algérie	Présidente
Pr. ARIBI Mourad	Université de Tlemcen, Algérie	Dir. de Thèse
Pr. SMAHI Mohammed Chems Eddine	Université de Tlemcen, Algérie	Examinateur
Pr. LEFRANC Gérard	Université de Montpellier, France	Examinateur
Dr. MCA KLOUCHE Lynda	Université de Sidi-Bel-Abbès, Algérie	Examinatrice

01 Juillet 2017

TLEMCEM
N° d'Ordre



UNIVERSITÉ DE TLEMCEM – ABOU-BEKRBELKAÏD
FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM

THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de
Docteur 3^{ème} Cycle LMD en Biologie
Spécialité Immunologie Appliquée

par :

Lamia YSMAIL-DAHLOUK

Soutenue publiquement le 01 Juillet 2017

Intitulé :

Effet de la vitamine D₃ sur la modulation des balances immunologiques au début du diabète de type 1

————— ***Sous la direction du Professeur Mourad ARIBI*** —————

Jury

Pr. BELARBI Meriem	Université de Tlemcen, Algérie	Présidente
Pr. ARIBI Mourad	Université de Tlemcen, Algérie	Dir. de Thèse
Pr. SMAHI Mohammed Chems Eddine	Université de Tlemcen, Algérie	Examineur
Pr. LEFRANC Gérard	Université de Montpellier, France	Examineur
Dr. MCA KLOUCHE Lynda	Université de Sidi-Bel-Abbès, Algérie	Examinatrice

01 Juillet 2017

RÉSUMÉ

Introduction: Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie autoimmune associée à un déséquilibre de la balance inflammation/réparation. Par ailleurs, la forme bioactive de la vitamine D₃, la 1,25(OH)₂D₃, a des effets immunomodulateurs sur les cellules immunitaires, innées et adaptatives, et sur la production de leurs cytokines respectives. Les objectifs de ce projet de thèse ont été d'évaluer l'effet *ex vivo* de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des cytokines proinflammatoires Th1/Th17 et anti-inflammatoires Th2/Treg, la production du monoxyde d'azote et l'activité de l'arginase, d'une part, et sur les niveaux d'activation STAT4 (STAT4-p, Tyr693) et STAT6 (STAT6-p, Tyr641), au sein du monocyte, d'autre part, au début du DT1.

Matériels et méthodes : Les essais ont été réalisés sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*), et des monocytes isolés à partir du sang de patients volontaires atteints du DT1 récent, et de sujets contrôles.

Résultats: Les taux de la production de l'IFN- γ , de l'IL-17 et du NO ont été significativement élevés au niveau des PBMCs des patients par rapport aux contrôles. Pareillement, les concentrations relatives de STAT4-p ont été significativement élevées au niveau des monocytes de patients comparés aux contrôles. A l'inverse, les taux de la production de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'expression de STAT6-p ont été significativement diminués au niveau des cellules de patients par rapport aux contrôles. Par ailleurs, le traitement par la 1,25(OH)₂D₃ a induit, d'une part, une augmentation significative des taux de la production de l'IL-4 et de l'IL-10, ainsi que de l'activité de l'arginase et des niveaux de phosphorylation de STAT6, et, d'autre part, une diminution des taux de la production de l'IFN- γ , de l'IL-17 et du NO, ainsi que des niveaux de phosphorylation de STAT4. Enfin, la 1,25(OH)₂D₃ a induit une augmentation de la balance Treg *versus* Th17, et une diminution des balances Th1 *versus* Th2, production du NO *versus* activité de l'arginase et STAT4-p *versus* STAT6-p.

Conclusions: Les travaux de cette thèse suggèrent que la forme bioactive de la vitamine D₃ peut contrer l'activation des voies inflammatoires au début du DT1. Aussi, ses propriétés immunomodulatrices pourraient varier en fonction du profil cytokinique. D'un point de vue thérapeutique, la vitamine D₃ peut éventuellement être proposée comme un adjuvant immunologique et anti-inflammatoire potentiels chez les sujets à risque de développer un DT1.

Mots-clés: 1,25(OH)₂D₃, cytokines proinflammatoires et anti-inflammatoires, PBMCs, monocytes, STAT4-p et STAT6-p, diabète de type 1

Abstract

Background: Type 1 diabetes (T1D) is associated with an imbalance between inflammation and repair. Recently, the biologically active form of vitamin D₃, i.e. 1,25(OH)₂D₃, has been reported to have potent immunomodulatory effects on both innate and adaptive immune cells, as well as on the production of their specific cytokines.

Methods: We examined the effect of 1,25(OH)₂D₃ on the production of proinflammatory Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg related cytokines, as well as on the phosphorylation of monocyte-expressed STAT4 and STAT6 at the recent-onset human T1D.

Results: The levels of IFN- γ , IL-17 and nitric oxide (NO) production were significantly increased in PBMCs from patients compared to controls. Similarly, STAT4 tyrosine phosphorylation (p-STAT4, Tyr693) levels were significantly increased in monocytes from patients when compared to controls. Conversely, the levels of IL-4, IL-10 and p-STAT6 (Tyr641) were significantly decreased in type 1 diabetic patients than in controls. Treatment with 1,25(OH)₂D₃ resulted in significant up-regulation of IL-4, IL-10, arginase activity, and pSTAT6 and down-regulation of IFN- γ , IL-17 and NO production levels, as well as p-STAT4. Additionally, 1,25(OH)₂D₃ significantly enhanced Treg-to-Th17 ratio, and induced a significant decrease in Th1-to-Th2, NO production-to-arginase activity and p-STAT4-to-p-STAT6 ratios.

Conclusions: Our study suggests that the biologically active form of vitamin D₃ can reverse the activation of inflammatory pathways at the onset of T1D. Additionally, its immunomodulation properties may vary depending on the overall patterns of cytokines. From a therapeutic point of view, vitamin D₃ may potentially be suggested as an immunological adjuvant and a potential anti-inflammatory agent in individuals at risk of T1D.

Keywords: 1,25(OH)₂D₃, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, PBMCs, monocytes, p-STAT4 and p-STAT6, type 1 diabetes

ملخص

المقدمة: داء السكري من النوع الأول هو أحد أمراض المناعة الذاتية، وهو مرتبط بعدم التوازن بين الإلتهاب و الإصلاح. من جهة أخرى، لفيتامين د₃ (1,25(OH)₂D₃) قدرة على تعديل فيزيولوجية الخلايا المناعية الفطرية والتكيفية، و كذلك على نوعية السيتوكينات التي تنتج. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير الفيتامين 1,25(OH)₂D₃ على إنتاج السيتوكينات الموالية للإلتهابات TH1/Th17 والمضادة للإلتهابات TH2/Treg، على إنتاج أكسيد النيتريك ونشاط الأرجيناز من جهة، وعلى مستويات تفعيل STAT4 (STAT4-p, Tyr693) و STAT6 (STAT6-p, Tyr641) على مستوى الخلايا الأحادية النواة من جهة أخرى، في بداية الداء السكري من النوع الأول.

الوسائل و الطرق: أجريت التجارب على الخلايا الأحادية للدم المحيطي وخلايا أحادية النواة بعد أن تم عزلها من الدم المحيطي لمرضى مصابين بالداء السكري من النوع الأول و لمتبرعين معافين.

النتائج: إرتفاع معدل إنتاج كل من الإنترفيرون غاما (IFN- γ) و انترلوكين-17 (IL-17) و أكسيد النيتريك في الخلايا الأحادية للدم المحيطي للمرضى الذين يعانون من داء السكري من النوع الأول مقارنة مع الشواهد. و كذلك التركيز النسبي لSTAT4 المتفسرة على مستوى خلايا وحيدة النواة للمرضى مقارنة مع الشواهد. بينما معدل إنتاج الانترلوكينات IL-4 و IL-10 و كذلك التركيز النسبي لSTAT6 المتفسرة كانت منخفضة عند المرضى مقارنة مع الشواهد. العلاج بالفيتامين 1,25(OH)₂D₃ أدى إلى إرتفاع في إنتاج IL-4، IL-10، STAT6، و في نشاط الأرجيناز و إلى انخفاض في معدلات إنتاج IL-17، IFN- γ ، و أكسيد النيتريك، بالإضافة الى STAT4 المتفسرة. وعلاوة على ذلك، فإن 1,25(OH)₂D₃ أدت إلى إرتفاع في نسبة Treg/Th17 وإلى إنخفاض في نسبة كل من Th1/Th2، إنتاج أكسيد النيتريك/نشاط الأرجيناز و STAT4-متفسرة/STAT6-متفسرة.

الإستنتاجات: بينا لأول مرة في هذه الدراسة أنه بإمكان الفيتامين 1,25(OH)₂D₃ أن يمنع تفعيل الإستجابات الإلتهابية في بداية الداء السكري من النوع الأول. من جهة نظر علاجية، يمكن إقتراح الفيتامين د₃ كمساعد مناعي و كعامل مضاد للإلتهابات لدى الأشخاص الذين لديهم خطر الإصابة بداء السكري من النوع الأول.

الكلمات المفتاحية: فيتامين د₃، الخلايا الأحادية للدم المحيطي، خلايا وحيدة النواة، السيتوكينات الموالية للإلتهابات و المضادة للإلتهابات، STAT4 و STAT6، داء السكري من النوع الأول

Avant-propos

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI. Je tiens à le remercier vivement d'avoir dirigé tous mes travaux et de m'avoir accompagné et m'aidé inlassablement tout au long de leur réalisation, avec disponibilité sans faille et une infinie bienveillance malgré les responsabilités et sollicitations qui l'incombent.

Monsieur le Professeur Mourad ARIBI, Vous m'avez transmis votre passion pour l'Immunologie, Vous m'avez accueillie au sein de Votre Equipe et Laboratoire de Recherche, où j'ai pu admirer Votre ardeur et Votre efficacité au travail, ainsi que Votre curiosité et Votre rigueur scientifique. Vous avez su construire une Equipe de Recherche dynamique dont il est toujours agréable d'en faire partie. Veuillez trouver ici le témoignage de toute mon admiration, de mon profond respect et de ma très sincère gratitude.

Je voudrais remercier énormément les membres du Jury qui ont accepté de juger les travaux de cette thèse de Doctorat, en l'occurrence Madame la Professeure Meriem BELARBI (Université de Tlemcen, Algérie), Monsieur le Professeur Gérard LEFRANC (Université de Montpellier, France), Monsieur le Professeur Mohammed Chems-Eddine SMAHI (Université de Tlemcen), et Madame la Docteure MCA Lynda KLOUCHE (Université de Sidi Bel-Abbès, Algérie). Merci pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse, et pour le temps que vous y avez consacré.

J'aimerais remercier aussi Monsieur le Professeur Gérard LEFRANC de nous avoir procuré la forme bioactive de la vitamine D. Qu'il soit persuadé de ma sincère et profonde gratitude.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire du Pr. Mourad ARIBI et plus particulièrement: Sara DAHOU, Zoheir DAHMANI, Sana BOUALI-TABET, Warda MEZIANE, Zineb HADJIDJ, Mustapha HADDOUCHE, Ibtissem BENGHALEM, Zeyneb MEKKAOUI, Mouna NOUAR, ainsi que toute la promotion MASTER 2 immunologie 2016/2017. Merci pour la très bonne ambiance de travail au laboratoire, vous m'avez énormément apporté, et chacun d'entre vous a laissé une trace en moi et j'espère que j'ai pu faire pareil pour vous.

Dédicaces

*Je dédie cette Thèse à toutes les personnes qui me sont chères, et tout particulièrement
Mes Parents et mes Sœurs Rym, Hind et Yasmine,
Sans eux rien de tout cela n'aurait été possible*

*Mes grand-mères
À la mémoire de mon Oncle Hacine,
avec le triste regret de ne pouvoir partager ce moment en sa compagnie*

*Je tiens aussi à présenter mes dédicaces à
Wafa NOUARI, Sara BELKHADEM, Sara DAHOU,
Fatima BENCHENAFI, Maroua MILLANI
& Toutes les personnes qui m'ont aidé...*

Il Faut Toujours Croire En Ses Rêves...

Lamia YSMAIL-DAHLOUK

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	viii
Liste des figures	xii
Liste des tableaux	xiv
Liste des abréviations	xv
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	4
1. 1. Diabète de type 1	4
1.1.1. Généralités	4
1.1.1.1 Définition générale et classification	4
1.1.1.2. Epidémiologie	4
1.1.2. Immunopathologie du diabète de type 1	5
1.1.2.1. Facteurs immunologiques	6
1.1.2.1.1 Absence de tolérance centrale et/ou rupture de tolérance périphérique	6
1.1.2.1.2. Anomalies immunologiques et auto-immunité cellulaire	7
1.1.2.1.2.1. Les lymphocytes T	7
1.1.2.1.2.2. Les lymphocytes B	8
1.1.2.1.2.3. Implication des autres cellules du système immunitaire	10
1.1.2.1.2.4. Implication des cytokines, molécules d'adhésion, molécules de costimulation et de signalisation cellulaires	12
1.1.2.2. Facteurs génétiques	13
1.1.2.3. Facteurs environnementaux	15
1.2. Populations lymphocytaires T helper	16
1.2.1. Développement des lymphocytes Tαβ	16
1.2.2. Activation, différenciation et polarisation des lymphocytes T helper	19
1.2.2.1. Lymphocytes Th1; différenciations et fonctions	19
1.2.2.2. Lymphocytes Th2; différenciations et fonctions	21

1.2.2.3. Contre-régulation réciproque des réponses Th1/Th2	23
1.2.2.4. Lymphocytes Th17; différenciations et fonctions	24
1.2.2.5. Lymphocytes T régulateurs; différenciations et fonctions	26
1.2.3. Déséquilibre des balances immunologiques au cours du diabète du type 1	29
1.2.3.1. Déséquilibre de la balance Th1/Th2	29
1.2.3.2. Déséquilibre de la balance Th17/Treg	29
1.3. Monocytes/macrophages	30
1.3.1. Origine et différenciation	30
1.3.2. Hétérogénéité et fonctions des monocytes	31
1.3.3. Hétérogénéité et fonctions des macrophages	32
1.3.4. Monoxyde d'azote	34
1.3.5. La balance iNOS/ arginase	36
1.4. Vitamine D	38
1.4.1. Structure, origine et synthèse de la vitamine D	38
1.4.2. Métabolisme de la vitamine D	39
1.4.3. Régulation du métabolisme de la vitamine D	41
1.4.4. Mode d'action de la vitamine D	41
1.4.5. Fonctions biologiques de la vitamine D	42
1.4.5.1. Fonctions classiques de la vitamine D	42
1.4.5.2. Fonctions non classiques de la vitamine D	42
1.4.6. Vitamine D et système immunitaire	43
1.4.6.1. Rôle de la vitamine D dans l'immunité innée	43
1.4.6.2. Rôle de la vitamine D dans l'immunité adaptative	45
1.4.7. Vitamine D et diabète de type 1	46
1.5. Problématique et objectifs	49
1.5.1. Problématique	49
1.5.2. Objectifs	49
1.5.3. But	49
Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1	50

2.1. Matériels et méthodes	52
2.1.1. Conception de l'étude	52
2.1.2. Echantillons cellulaires	53
2.1.3. Mise en culture des PBMCs	54
2.1.4. Dosage immuno-enzymatique des cytokines	54
2.1.5. Dosage du monoxyde d'azote	55
2.1.6. Dosage de l'activité de l'arginase	55
2.1.7. Préparation des monocytes	55
2.1.8. Dosages des STAT4 et STAT6 phosphorylés	56
2.1.9. Analyse statistique des données	57
2.2. Résultats	58
2.2.1. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur la production des cytokines Th1 et Th2	58
2.2.2. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur la production des cytokines Th17 et Treg	59
2.2.3. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur la production du monoxyde d'azote et sur l'activité de l'arginase	60
2.2.4. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur les ratios Th1/Th2, Treg/Th17 et NO/activité de l'arginase	62
2.2.5. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur l'expression des STAT4-p et STAT6-p au niveau des monocytes en réponse au LPS/IFN-γ et LPS/IL-4 respectivement	64
2.2.6. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur le ratio STAT4-p/STAT6-p	66
2.2.7. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur la production des cytokines proinflammatoires combinées (PICs) Th1/Th17 et anti-inflammatoires combinées (AICs) Th2/Treg, et sur le ratio PICs/AICs	67
2.3. Discussion	69
2.3.1. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ la production des cytokines Th1 et Th2	70
2.3.2. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur la production des cytokines Th17 et Treg	71
2.3.3. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur la production du monoxyde d'azote et l'activité d'arginase	71
2.3.4. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur l'expression des STAT4 et STAT6 phosphorylés	72
2.3.5. Effet de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sur la production des cytokines proinflammatoires combinées (PICs) Th1/Th17 et anti-inflammatoires combinées (AICs) Th2/Treg	74

Chapitre 3 : Conclusions et perspectives

75

Chapitre 4 : Bibliographie

78

Annexe

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.	Etiologie du diabète de type 1.	05
Figure 1.2.	Organisation des gènes HLA sur le chromosome 6 et susceptibilité au diabète de type 1.	14
Figure 1.3.	Schéma d'organisation générale d'un lobule thymique.	17
Figure 1.4.	Schéma simplifié du développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le thymus.	18
Figure 1.5.	Différentiation et polarisation des profils lymphocytaires T helper.	20
Figure 1.6.	La contre-régulation réciproque des réponses Th1/Th2.	23
Figure 1.7.	Différenciation et maintien de la lignée Th17.	25
Figure 1.8.	Développement et fonctions des lymphocytes T régulateurs.	27
Figure 1.9.	Origine, différenciation et hétérogénéité des monocytes-macrophages	31
Figure 1.10.	La voie métabolique conduisant à la formation du monoxyde d'azote	34
Figure 1.11.	Structure moléculaire de la NO Synthase	35
Figure 1.12.	Le catabolisme de la L-arginine au niveau des macrophages M1 et M2	37
Figure 1.13.	Différences structurales entre vitamine D ₃ et D ₂ et leurs métabolites	38
Figure 1.14.	Métabolisme de la vitamine D.	40
Figure 1.15.	Les effets immunomodulateurs de la 1,25(OH) ₂ D ₃ .	45
Figure 2.1.	Organigramme de l'étude.	52
Figure 2.2.	Effet de la 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ sur la production de l'IFN- γ et de l'IL-4 par les PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	59
Figure 2.3.	Effet de la 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ sur la production de l'IL-10 et de l'IL-17 par les PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	60
Figure 2.4.	Effet de la 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ sur la production du monoxyde d'azote et sur l'activité de l'arginase au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	61

Figure 2.5.	Effet de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur le ratios Th1/Th2 au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	62
Figure 2.6.	Effet de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur le ratios Treg/Th17 au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	63
Figure 2.7.	Effet de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur le ratios NO/activité d'arginase au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	64
Figure 2.8.	Effet de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur la phosphorylation des STAT4 et STAT6 au sein des monocytes des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	65
Figure 2.9.	Effet de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur le ratios STAT4-p/STAT6-p au niveau des monocytes des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	66
Figure 2.10.	Effet de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur la production des PICs et des AICs par les PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	67
Figure 2.11.	Effet de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur le ratio PICs/AICs au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1.	Caractéristiques des macrophages M1 et M2	33
Tableau 1.2.	Les principales sources alimentaires de la vitamine D	39
Tableau 1.3.	Expression du récepteur de la vitamine D (VDR) et de la 1 α -hydroxylase aux niveaux des organes, des tissus et des cellules	43
Tableau 2.1.	Les principales caractéristiques des sujets volontaires atteints du diabète de type 1	53

LISTE DES ABREVIATIONS

1,25(OH) ₂ D ₃ :	1,25-dihydroxy-vitamine D ₃ ou calcitriol
25(OH)D ₃ :	25OH vitamine D ₃ ou calcidiol
1 α-OHase :	1 alpha-hydroxylase
25-OHase :	25-hydroxylase

A

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AHR :	Récepteur d'hydrocarbures aromatiques (<i>aryl hydrocarbon receptor</i>)
AICs :	Cytokines anti-inflammatoires combinées
AP1 :	Protéine activatrice 1 (<i>Activator protein 1</i>)
ARNm :	Acide ribonucléique messenger

B

BB :	Bio-Breeding
------	--------------

C

CCL :	<i>CC-chemokine ligand</i>
CCR :	Récepteur à C-C chimiokine
CD :	<i>Clusters of differentiation</i>
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
c-Maf :	<i>Cellular muscular aponeurotic fibrosarcoma</i>
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
cTEC :	Cellule épithéliale du cortex thymique
CTL :	Lymphocyte T cytotoxique (<i>Cytotoxic T cell</i>)
CTLA-4 :	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4</i>
CVB4 :	Virus Coxsackie B4
CYP27B1:	Cytochrome P450 27B1

D

DBP :	Protéine liant la vitamine D (<i>vitamin D binding protein</i>)
DC :	Cellule dendritique

DID :	Diabète insulino-dépendant
DT1 :	Diabète de type 1
DT2 :	Diabète de type 2

E

EDTA :	Ethylène diamine tétraacétique (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
ELISA :	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS :	NO Synthase endothéliale
ETP :	<i>Early thymic progenitor</i>

F

FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FcεRI :	Récepteur de haute affinité pour IgE
FcεRII (CD23) :	Récepteur de faible affinité pour l'IgE
FGF23 :	Facteur de croissance du fibroblaste 23 (<i>Fibroblast growth factor 23</i>)
FID :	Fédération Internationale du Diabète
FMN :	Flavine MonoNucléotide
FOXP3 :	<i>Forkhead box transcription factor p3</i>

G

GAD :	Décarboxylase de l'acide glutamique (<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>)
GATA 3 :	<i>GATA-binding protein 3</i>
G-CSF :	<i>Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor</i>
Gfi-1 :	<i>Growth factor independent-1</i>
GM-CSF :	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>

H

H :	Hydrogène
HLA :	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HRP :	Peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxidase</i>)

I

IAA :	Auto-anticorps Anti-Insuline (<i>insulin autoantibodies</i>)
ICA :	Auto-anticorps anti-cellulaires des îlots (<i>islet cell antibody</i>)
IDDM :	<i>Insulin-dependent diabetes mellitus</i>
IFN :	Interféron

Ig :	Immunoglobuline
IGF1 :	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
I _k B α :	Inhibiteur NF-kappa-B alpha (<i>nuclear factor of kappa light-chain polypeptide gene in B cells inhibitor</i>)
IL :	Interleukine
iNOS :	NO synthase inductible (<i>inductible nitric oxide synthase</i>)
iTreg :	Cellules T régulatrices induites

J

Jak :	Janus kinase
-------	--------------

K

KLRG1 :	<i>Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
K _m :	Constante de michaelis
KW :	Kruskal Wallis

L

LPS :	Lipopolysaccharides
LOD :	Limite de détection

M

M1 :	Macrophage classiquement activé/proinflammatoire
M2 :	Macrophage alternativement activé/réparateur
MLD-STZ :	<i>Multiple low dose streptozotocine</i>
mTEC :	Cellule épithéliale de la médulla thymique

N

NADP :	Nicotinamide-adenine- dinucleotide phosphate
NF- κ B :	Facteur nucléaire kappa B (<i>nuclear factor-kappa B</i>)
NK :	<i>Natural killer</i>
NKG2D :	<i>Natural-killer group 2 member D</i>
nNOS :	NO Synthase neuronale
NO :	Monoxyde d'azote (<i>Nitric Oxide</i>)
NOD :	<i>Non obese diabetic</i>
NOS :	NO Synthase
NPT2b :	<i>Type II sodium-dependent phosphate transporter</i>

NR1F1 : *Nuclear receptor subfamily 1*
nTreg : Cellule T régulatrice naturelle

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PAMP : Motif moléculaire associé au pathogène (*Pathogen Associated Molecular Pattern*)
PBMCs : Cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*)
PBS : *Phosphate buffered saline*
PD-1 : *Programmed cell Death1*
PHA : *Phytohaemagglutinine*
PICs : Cytokines proinflammatoires combinées
PLN : Nœuds lymphatiques du pancréas (*pancreatic lymph nodes*)
PTH : Parathormone (*Parathyroid hormone*)

R

RAE-1 : *Retinoic acid early transcript 1*
RAG : *Recombination -Activating Genes*
RANKL : *Receptor activator of nuclear facteur κ B ligand*
ROR : *Retinoid-related orphan receptor*
Runx : *Runt-related transcription factor*
RXR : Récepteur X de rétinoïdes (*retinoid X receptor*)

S

SAB : Sérum albumine bovine
STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*
SVF : Sérum de veau fœtal

T

T-bet : *T-box-expressed-in-T-cells*
TBET : *Trypan blue exclusion test*
TCA : Acide trichloracétique (*trichloracetic acid*)
TCR : Récepteur de la Cellule T (*T Cell receptor*)

TGF- β :	Facteur de croissance transformant β (<i>Trasforming Growth Factor-β</i>)
Th1 :	Lymphocyte T helper de type 1
Th17 :	Lymphocyte T helper de type 17
Th2 :	Lymphocyte T helper de type 2
Th3 :	Lymphocyte T helper de type 3
TLR :	Récepteur de type Toll (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TMB :	Tétramethylbenzidine
TNF :	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Treg :	Cellule T régulatrice
Tr1 :	<i>Type 1 regulatory T cells</i>
TRPV5 :	<i>Transient Receptor Potential channel Vanilloid subtype 5</i>
TRPV6 :	<i>Transient Receptor Potential cation channel, family V, member 6</i>
Tyk2 :	Tyrosine kinase 2

U

UVB :	Ultra-Violet B
-------	----------------

V

VCAM-1 :	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VDR :	Récepteur de la vitamine D (<i>Vitamin D Receptor</i>)
VDRE :	Élément de réponse de la vitamine D (<i>Vitamin D response element</i>)
VNTR :	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>

Z

Zn :	Zinc
------	------

Introduction

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune spécifique d'organe caractérisée par une carence absolue en insuline. Il est la conséquence d'une destruction progressive et sélective des cellules β pancréatiques. Depuis plusieurs décennies, l'incidence de cette maladie a augmenté dans le monde (Dabelea, 2009). Le DT1 est donc considéré comme un problème majeur de santé publique.

Il a été rapporté que la destruction des cellules β pancréatiques est induite initialement par une infiltration des îlots de Langerhans par des cellules immunitaires innées, y compris les monocytes/macrophages (Yoon et Jun, 2005), conduisant à une activation des lymphocytes T autoréactifs, et une production excessive des cytokines proinflammatoires au niveau des nœuds lymphatiques du pancréas (PLN, *pancreatic lymph nodes*) (Aribi, 2011).

Impliqué dans la signalisation intracellulaire mettant en jeu la protéine Janus Kinase (JAK), les transducteurs de signal et activateurs de transcription (STAT) peuvent être activés en réponse à des messagers de nature cytokinique, pro- ou anti-inflammatoire. Ainsi, STAT4 est nécessaire pour le développement des cellules inflammatoires faisant partie du profil Th1/M1, après stimulation par des cytokines proinflammatoires comme l'interféron-gamma (IFN- γ). Il est impliqué dans l'inhibition du développement des cellules T régulatrices. À l'inverse, STAT6 est sollicité par des cytokines anti-inflammatoires, entre autres l'interleukine-4 (IL-4), et joue un rôle important dans l'inhibition de l'induction de l'IFN- γ dépendante du STAT1 (Hiroi et *al.*, 2013).

De nombreux travaux ont mis l'accent sur l'implication de l'axe Th1-Th17 dans la pathogénie du DT1 (Honkanen et *al.*, 2010 ; Yoon et Jun, 2005). Cependant, il a été montré que la régulation des balances Th1/Th2 et Th17/Treg en faveur des cellules Th2 et des Treg, respectivement, joue un rôle important dans la protection, voire même la prévention de cette maladie (Dromey et *al.*, 2011 ; Ludvigsson et *al.*, 2008).

L'une des stratégies préventives les plus efficaces des maladies auto-immunes, impliquant le DT1, est la modulation immunitaire. Dans ce contexte, une attention particulière a été récemment donnée à la vitamine D₃.

La vitamine D, est une hormone synthétisée initialement au niveau de l'épiderme sous l'effet de certains rayons ultra-violet B (UVB). Elle peut également être obtenue directement à partir de l'alimentation. La vitamine D se présente sous deux types : la vitamine D₂ d'origine

Introduction

végétale, et la vitamine D₃ d'origine animale, appelée également cholécalciferol. La conversion du 7 déhydrocholestérol en pré-vitamine D₃, puis en vitamine D₃ native conduit à la formation de la 25-hydroxyvitamine D₃ (25(OH)D₃), la forme de stockage de la vitamine D₃ (Holick, 2007). En revanche, la deuxième hydroxylation, au niveau rénale, est catalysée par l'enzyme 1 α -hydroxylase (VD3 1A hydroxylase) (cytochrome p450 27B1 ou CYP27B1) aboutissant à la formation de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ [1,25(OH)₂D₃] ou calcitriol, la forme biologique active de la vitamine D₃ (Schoindre et *al.*, 2012). Le calcitriol exerce ensuite ses effets biologiques par une régulation transcriptionnelle directe des gènes cibles (Rachez et *al.*, 2000). En se liant au récepteur nucléaire de la vitamine D (*vitamin D receptor*, VDR), qui formera un complexe avec le récepteur nucléaire de la famille des récepteurs X des rétinoïdes (RXR, *retinoid X receptor*) VDR-9-cis-RXR, régulant ainsi la transcription des gènes cibles après sa fixation aux éléments de réponse à la vitamine D (*Vitamin D response element*, VDRE) (Zhang et *al.*, 2012).

A coté de son rôle classique dans la régulation du métabolisme phosphocalcique, plusieurs études ont rapporté les effets de la vitamine D₃ sur la croissance et la différenciation de plusieurs types cellulaires, avec des effets immunomodulateurs remarquables (Nouari et *al.*, 2016 ; Deluca et Cantorna, 2001). En effet, les cellules immunitaires, incluant les lymphocytes T, les lymphocytes B, et les cellules présentatrices d'antigène (les macrophages et les cellules dendritiques), non seulement expriment le VDR, mais aussi la 1 α -hydroxylase (Aranow, 2011). Aussi, il a été rapporté qu'un déficit en vitamine D₃ augmente le risque de développement d'un nombre important de maladies auto-immunes, notamment le DT1 (Hyppönen et *al.*, 2001 ; Stene et *al.*, 2000).

Dans cette optique, ce projet de thèse de Doctorat a pour objectifs d'évaluer l'effet *ex vivo* de la 1,25(OH)₂D₃, au début du DT1, sur la production des cytokines proinflammatoires Th1/Th17 et anti-inflammatoires Th2/Treg, la production du monoxyde d'azote et l'activité de l'arginase, d'une part, et sur les niveaux d'activation STAT4 (STAT4-p, Tyr693) et STAT6 (STAT6-p, Tyr641), au sein du monocyte, d'autre part.

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.1. Diabète de type 1	4
1.2. Populations lymphocytaires T helper	16
1.3. Monocytes/macrophages	30
1.4. Vitamine D	38
1.5. Problématique et objectifs	49

Chapitre 1

Revue de la littérature

1. 1. Diabète de type 1

1.1.1. Généralités

1.1.1.1 Définition générale et classification

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2014) définit le diabète comme une maladie chronique qui survient quand l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline, et/ou quand cette dernière n'est pas produite convenablement par le pancréas. De ce fait, le diabète se caractérise par une hyperglycémie chronique. En 1997, l'ADA (*American diabetes association*), a proposé une classification des diabètes, en distinguant quatre types: le diabète de type 1 (anciennement appelé diabète insulino-dépendant ou DID), le diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant), le diabète gestationnel, et les autres diabètes spécifiques (Guillausseau, 1997).

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune à part entière. Par définition, une pathologie auto-immune est caractérisée par une activité aberrante du système immunitaire à l'égard des composantes du soi. Ainsi, le DT1 se caractérise par un défaut de production d'insuline suite à une destruction sélective et progressive auto-immune des cellules β insulino-sécrétrices, localisées aux niveaux des îlots de Langerhans pancréatiques (Janeway, 2005). Comme toutes les maladies auto-immunes, le DT1 survient sur un terrain génétique de susceptibilité. Cette maladie apparaît généralement chez le sujet jeune et se développe plus rarement chez l'adulte (Maahs et *al.*, 2010).

1.1.1.2. Epidémiologie

La Fédération Internationale du Diabète (FID, 2015) a estimé, à l'échelle mondiale, qu'en 2015, 415 millions d'individus, vivaient avec le diabète, et qu'en 2040 ce nombre passera à 642 millions selon la même source. Le DT1 représente 5 à 10 % des diabètes dans le monde. Depuis ces dernières années, une incidence croissante du DT1 à travers le monde a été rapportée par plusieurs données épidémiologiques (Kim et *al.*, 2016 ; Spaans et *al.*, 2015).

L'incidence du DT1 a été estimée à plus de 3,2 % par an dans le monde. Selon la FID (2015) le nombre d'enfants dans le monde atteints du DT1 était de 542,000 en 2015.

Chapitre 1. Revue de la littérature

En Algérie, le diabète est devenu un problème de santé publique de plus en plus répondeu. Selon la FID (2013), la prévalence nationale du diabète en Algérie en 2013 a été estimée à 6,63 %. Selon les registres nationaux du DT1, l'incidence du DT1 en 2010 chez les jeunes de moins de 15 ans était de 17,44 /100000 enfants à Constantine. En 2011, elle était de 26/100000 et de 22,8/100000 enfants à Oran et à Alger, respectivement (Comité d'experts en diabétologie, 2015). Au niveau de la région de Tlemcen, une prévalence du DT1 était estimée à 3.7 % (Zaoui et al., 2007).

1.1.2. Immunopathologie du diabète de type 1

Le DT1 est une pathologie multifactorielle. En effet, trois principaux facteurs sont impliqués dans l'apparition de la maladie: un facteur immunologique, à une absence de la tolérance naturelle du système immunitaire vis-à-vis des cellules β , qui est responsable du déclenchement d'une réponse auto-immune dirigée contre elle, des facteurs génétiques, et des facteurs environnementaux (Geenen et al., 2005) (Figure 1.1).

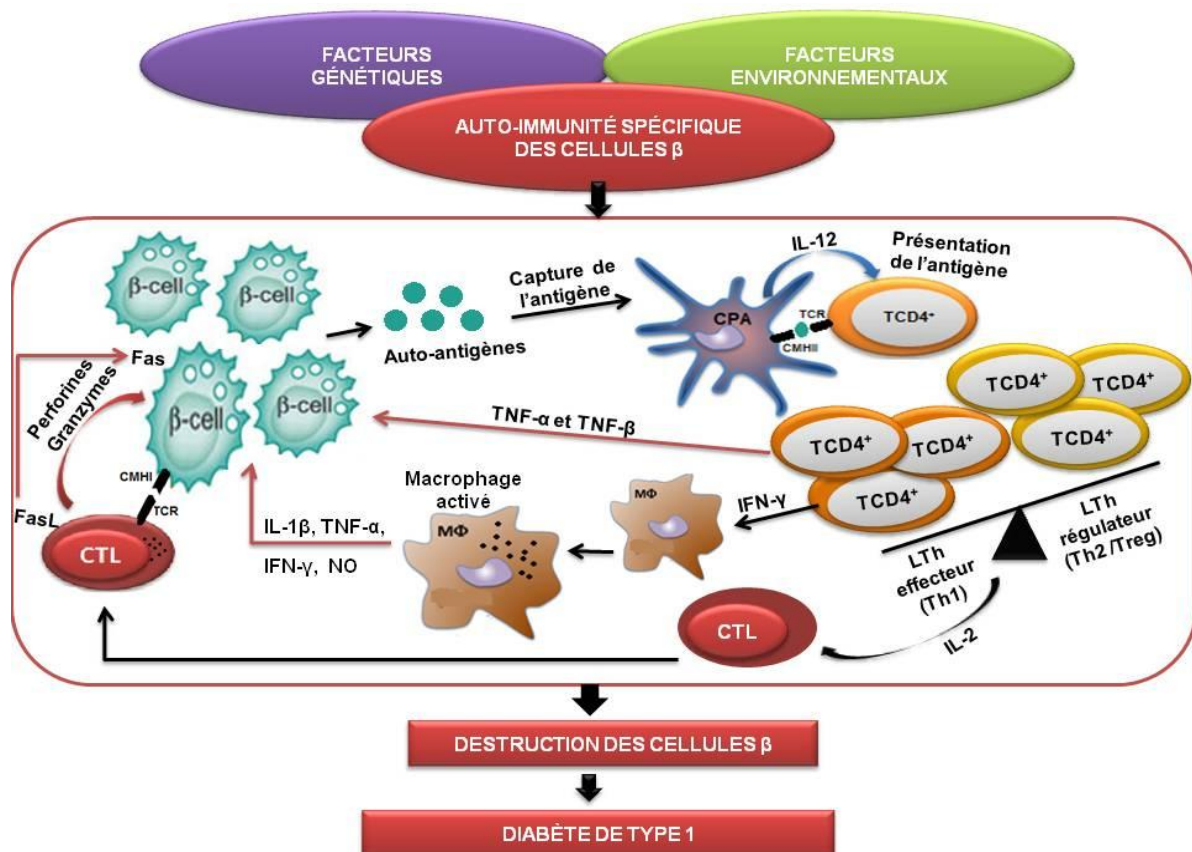


Figure 1.1. Etiologie du diabète de type 1 (Yoon et Jun, 2005). CPA: cellule présentatrice d'antigène, CTL: lymphocyte T cytotoxique, IL: interleukine, LTh : lymphocyte T helper. NO: monoxyde d'azote, TNF: facteur de nécrose tumorale, CMH: complexe majeur d'histocompatibilité, TCR: récepteur de la cellule T.

1.1.2.1. Facteurs immunologiques

Différentes études réalisées principalement sur des tissus pancréatiques et des échantillons de sérum, mais également sur des cellules mononucléées du sang périphérique obtenus à partir des patients atteints du DT1, ou de modèle animal, ont contribué à la compréhension du processus pathologique du DT1 (Bingley, 2010 ; Willcox et *al.*, 2009).

Quasiment tous les travaux sur la pathogenèse du DT1 ont conclu que ce dernier résulte d'une destruction des cellules β par un processus auto-immun. Cette constatation était faite suite à l'observation de la présence d'une infiltration des îlots pancréatiques par des cellules inflammatoires (In't Veld, 2011; Willcox et *al.*, 2009; Botazzo et *al.*, 1974). En effet, l'insulite, considérée comme la caractéristique anatomique de la maladie, correspond à un infiltrat des îlots de Langerhans par des cellules mononucléées au sein du pancréas (Dubois-Laforgue, 2007). Cet infiltrat cellulaire est principalement composé de cellules T CD8⁺, de macrophages, de lymphocytes T CD4⁺, de lymphocytes B, de cellules dendritiques et des plasmocytes (Seay et *al.*, 2016 ; Willcox et *al.*, 2009).

D'après des études « autopsiques », différents aspects d'insulites ont été décrits: infiltrat péri-insulaire par des macrophages, infiltrat lymphocytaire péri-insulaire (péri-insulite) ou infiltrat pénétrant les îlots (insulite invasive). Tous ces infiltrats coexistent au sein d'un même pancréas (Hanninen et *al.*, 1992). Des différences ont été remarquées entre le DT1 chez le modèle humain et le modèle animal. Par exemple, chez les souris NOD (*non-obèse diabetic*), le pancréas est infiltré autant par des lymphocytes T CD4⁺ que par des lymphocytes T CD8⁺ (Kida et *al.*, 1998). Cependant, chez l'homme, l'infiltrat cellulaire pancréatique est principalement composé de lymphocytes T CD8⁺ (Itoh et *al.*, 1993).

L'absence d'une mise en place d'une tolérance centrale adéquate, une rupture de tolérance périphérique, ainsi que des anomalies immunologiques sont les principales causes du déclenchement de la maladie diabétique de type 1 (Willcox et *al.*, 2009).

1.1.2.1.1 Absence de tolérance centrale et/ou rupture de la tolérance périphérique

L'origine de la réponse auto-immune vis-à-vis de la cellule β demeure un mystère. Il a été constaté que le développement d'une réponse auto-immune spécifique de la cellule β provient d'un dysfonctionnement thymique et absence d'une tolérance centrale vis-à-vis de

Chapitre 1. Revue de la littérature

la population cellulaire β pancréatique pendant le développement des lymphocytes T au niveau du thymus (Geenen et *al.*, 2000; Liston et *al.*, 2003). Selon l'équipe de Like (1982), une thymectomie néonatale peut prévenir le développement du DT1, et qu'une greffe du thymus peut générer une insulite chez la souris NOD receveuse (Georgiou et Mandel, 1995). Aussi, Liston et *al.*, (2004), ont observé chez les souris NOD que le gène Bim, un médiateur de l'apoptose, n'est pas adéquatement induit par les thymocytes (Liston et *al.*, 2004). Ainsi, les thymocytes des souris NOD peuvent échapper au contrôle pendant les étapes de sélection mises en place dans le thymus, ce qui favorise l'export des lymphocytes T autoréactifs vers la périphérie. Ces dernières doivent être éliminés par des mécanismes extra-thymiques. En effet, en périphérie, ces lymphocytes T vont reconnaître des antigènes présentés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) grâce à leurs molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), mais aussi avec l'intervention des molécules de costimulation. Ces derniers jouent un rôle régulateur crucial dans la tolérance périphérique (Collins et *al.*, 2005). la molécule CTLA-4, exprimée par le lymphocyte T activé entre en compétition avec le CD28 pour la molécule B7. Chez les souris NOD, une altération dans la signalisation *via* le PD-1 (*programmed cell death 1*) a été constatée (Yadav et *al.*, 2009).

Malgré la tolérance par les molécules de costimulation, les lymphocytes T autoréactifs peuvent parfois s'activer en périphérie. C'est à ce niveau qu'une sous-population lymphocytaire T, appelée T régulateurs (Treg), joue un rôle capital dans l'inactivation des lymphocytes T autoréactifs à la périphérie; phénomène impliqué dans la tolérance périphérique. De nombreux arguments ont montré que la pathogénèse du DT1 est associée à un déficit fonctionnel et quantitatif des cellules Treg (Visperas et Vignali, 2016 ; Tan et *al.*, 2014 ; Sgouroudis et *al.*, 2011).

1.1.2.1.2. Anomalies immunologiques et auto-immunité cellulaire

1.1.2.1.2.1. Les lymphocytes T

La réponse immunitaire mise en place lors du développement du DT1 est médiée principalement par les cellules mononucléées. Parmi ces cellules, les lymphocytes T jouent un rôle prépondérant dans l'auto-immunité diabétique aussi bien chez l'homme que l'animal (Lehuen et *al.*, 2010). Aussi, une résistance au développement du DT1 a été constatée, chez les Rats *Bio Breeding* (BB) et les souris NOD, suite à une thymectomie néonatale (Groen et *al.*, 2003). De plus, Il a été montré que l'injection des lymphocytes T isolés à partir de la rate des souris diabétiques à des souris non atteintes induit un DT1 chez 100 % des souris

Chapitre 1. Revue de la littérature

receveuses (Wicker et *al.*, 1986). D'un autre côté, l'injection d'anticorps monoclonaux anti-CD3, anti-CD4 ou anti-CD8 à des souris NOD, peut prévenir le développement de la maladie (Dubois-Laforge, 2007). Ce sont essentiellement les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ qui sont les agents effecteurs de la destruction des cellules β (DiLorenzo et *al.*, 2007) (Figure 1.1).

Plusieurs mécanismes de destruction des cellules β pancréatiques par les lymphocytes T ont été décrits. D'une part, les lymphocytes T helper (Th) autoréactifs jouent un rôle primordial durant tout le processus de destruction des cellules β en sécrétant des cytokines ayant des propriétés toxiques provoquant des dommages aux cellules β pancréatiques (Amrani et *al.*, 2000), mais aussi en recrutant des lymphocytes T cytotoxiques (CTL, *Cytotoxic T cell*) (McGregor et *al.*, 2004). Les lymphocytes Th de type 1 (Th1) produisent de l'IL-2 et de l'IFN- γ , ce qui induit l'activation des cellules immunitaires infiltrées, principalement les CTLs autoréactifs et les macrophages, provoquant la destruction des cellules β suite à la sécrétion des cytokines proinflammatoires, des molécules cytotoxiques telles que les perforines et les granzymes, des radicaux libres, et par des interactions Fas-FasL (Aribi, 2011).

D'autre part, les cellules T CD8⁺ jouent un rôle néfaste lors de l'initiation de la destruction des cellules β (Wang et *al.*, 1996). En effet, selon l'équipe de Graser (2000), le développement du DT1 peut s'initier en présence des cellules T CD8⁺ et en absence totale des lymphocytes T CD4⁺ chez les souris NOD. L'action cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ s'exerce par différentes voies provoquant l'apoptose de la cellule cible, principalement *via* la sécrétion des perforines et des granzymes, la production du TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*), ou en exprimant le ligand FasL qui interagira avec le récepteur Fas exprimé par la cellule cible (Dubois-Laforge, 2007) (Figure 1.1).

Les cellules Th et les CTLs peuvent également agir en synergie en sécrétant des cytokines, telle que l'IFN- γ , qui stimulent la production des chimiokines par les cellules β , ce qui favorise le recrutement des cellules mononucléées et inflammatoires, et l'expression des récepteurs Fas par les cellules β , initiant par conséquent le processus apoptotique (Eizirik et *al.*, 2009).

1.1.2.1.2.2. Les lymphocytes B

Le rôle des lymphocytes B dans l'initiation et le développement du DT1 est très discuté. Selon Pescovitz et *al.* (2009), les fonctions des cellules β sont préservées chez les patients

Chapitre 1. Revue de la littérature

diagnostiqués suite à une injection d'anti-CD20. De plus, il a été montré que le rôle des lymphocytes B dans la pathogénèse du DT1 ne dépend pas de la production d'auto-anticorps. Il a été constaté, d'un côté, qu'il n'était pas possible d'induire le DT1 chez une souris déficiente en lymphocytes B qu'avec un transfert d'auto-anticorps provenant d'une souris NOD diabétique (Serreze et *al.*, 1998). D'un autre côté, l'absence de l'expression des molécules du CMH II à la surface des lymphocytes B peut prévenir le DT1 (Noorchashm et *al.*, 1999), mais aussi, il s'est avéré qu'une souris NOD transgénique, chez laquelle les lymphocytes B sont incapables à produire des anticorps, peut développer une insulite (Wong et *al.*, 2004). Ces arguments sont en faveur de l'implication des lymphocytes B dans la pathogénèse du DT1 possible *via* l'activation des lymphocytes T, et en produisant des cytokines associées à l'inflammation et non pas par la production des anticorps (O'Neill et *al.*, 2009). Le DT1 se manifeste généralement quelques mois, voir quelques années, après le début de la destruction des îlots pancréatiques. Au cours de la période préclinique, des anticorps, marqueurs de la réponse immunitaire humorale, dirigés contre les antigènes des cellules β pancréatiques sont détectés, et sont considérés comme les meilleurs marqueurs prédictifs de la pathologie diabétique de type 1 (Côte-Real et *al.*, 2009). Les auto-anticorps jusqu'à présent mis en évidence comme des marqueurs potentiels sont: les auto-anticorps anti-cellulaires des îlots, les auto-anticorps anti-insuline, les auto-anticorps anti-décarboxylase de l'acide glutamique, les auto-anticorps anti-tyrosine phosphatase, et les auto-anticorps anti-transporteur 8 du Zinc.

Auto-anticorps anti-cellulaires des îlots

Les auto-anticorps anti-cellulaires des îlots (ICA, *islet cell antibody*), sont les premiers auto-anticorps spécifiques du DT1 (Bottazzo et *al.*, 1974). Ils peuvent apparaître 10 ans avant que les signes cliniques du DT1 apparaissent (Riley et *al.*, 1990). Une forte concentration en ICAs est associée à un risque diabétogène élevé (Mire-Sluis et *al.*, 2000). Ces auto-anticorps sont présents chez 80 % des patients nouvellement diagnostiqués pour un DT1 (Gilliam et *al.*, 2004).

Auto-anticorps anti-insuline

Des fortes concentrations des auto-anticorps anti-Insuline (IAAs, *insulin autoantibodies*) sont détectées essentiellement dans la phase pré-diabétique, ainsi que lors d'un DT1 nouvellement diagnostiqué (Palmer et *al.*, 1983). A distinguer par rapport à ceux dirigés contre l'insuline exogène (IAs, *insulin antibodies*) qui apparaissent suite à l'insulinothérapie.

Chapitre 1. Revue de la littérature

La raison pour laquelle il est parfois difficile de savoir la concentration réelle des IAAs chez les patients DT1 traités (Gilliam et *al.*, 2004).

Auto-anticorps anti-décarboxylase de l'acide glutamique

Le GAD67 et GAD65 sont exprimés par les cellules nerveuses et par les îlots pancréatiques, respectivement (Dubois-Laforgue, 2007). Des auto-anticorps dirigés contre la GAD65 (Anti-GAD) ont été décrits chez 70 % à 80 % des patients pré-diabétiques et des patients nouvellement diagnostiqués pour un DT1 (Kulmala et *al.*, 1998). Cependant, ces auto-anticorps ne sont pas vraiment spécifiques du DT1, et peuvent être détectés chez des patients atteints d'un diabète de type 2 (DT2) (Hagopian et *al.*, 1993), mais également dans d'autres maladies auto-immunes (Davenport et *al.*, 1998).

Auto-anticorps anti-tyrosine phosphatase

La tyrosine phosphatase IA-2 est une protéine transmembranaire de 37-40 kDa, exprimée au niveau du système nerveux central et au niveau des cellules β des îlots pancréatiques. Il a été suggéré que 70 % des patients présentant un DT1 de découverte récente présentent des auto-anticorps anti-IA-2 (Dubois-Laforgue, 2007).

Auto-anticorps anti-transporteur 8 du Zinc (ZnT8)

Un nouveau marqueur du DT1 a été mis en évidence; le transporteur de zinc spécifique des cellules β humaines (ZnT8). Ce dernier est exprimé par les îlots pancréatiques. En effet, des auto-anticorps anti-ZnT8 étaient détectés chez des patients diabétiques type 1 nouvellement diagnostiqués (Yang et *al.*, 2010).

La présence de ces auto-anticorps est une caractéristique clé qui permet de distinguer le DT1 d'un DT2. En effet, il s'est avéré que plus de 90 % des patients nouvellement diagnostiqués d'un DT1 ont un ou plusieurs de ces auto-anticorps (Bingley, 2010).

1.1.2.1.2.3. Implication des autres cellules du système immunitaire

Des cellules de l'immunité innée participent essentiellement à l'initiation du processus auto-immun (Aribi, 2011). En effet, différents travaux ont mis l'accent sur l'implication des cellules de l'immunité innée dans le DT1, telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Lehuen et *al.*, 2010).

Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont pour fonction principale le maintien de la tolérance du soi. Elles sont considérées comme les meilleures cellules présentatrices de l'antigène. Sous certaines conditions, elles pourront déclencher une réponse auto-immune suite à une altération de la présentation de l'antigène (Lehuen et *al.*, 2010). Leurs rôles dans la pathogénèse du DT1 est souvent lié à leur capacité à capturer les auto-antigènes libérés par les cellules β suite à leur mort pour les présenter aux lymphocytes T naïfs au niveau des ganglions lymphatiques (Turley et *al.*, 2003) (Figure 1.1). Aussi, il a été constaté chez la souris NOD que les cellules dendritiques secrètent excessivement de l'IL-12, expriment fortement les molécules de costimulation, et ont une grande capacité à activer les lymphocytes T (Poligone et *al.*, 2002 ; Steptoe et *al.*, 2002).

Macrophages

Les macrophages, l'une des cellules de l'immunité innée, sont essentiellement impliqués dans les mécanismes de l'inflammation (Lawrence et *al.*, 2005). Plusieurs données sont en faveur de l'implication des macrophages dans le DT1 (Yang, 2008 ; Calderon et *al.*, 2006). À côté des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺, ils sont impliqués dans la destruction proprement dite des cellules β pancréatiques (Turley et *al.*, 2003), et jouent un rôle clé dans le développement d'une réponse immune à médiation cellulaire, notamment dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Yoon et Jun, 2001). Leurs fonctions dans la pathogénèse du DT1 peuvent être également dues à leurs activités cytotoxiques à l'égard des cellules β pancréatiques en secrétant des cytokines, principalement le TNF et l'IL-1 β (Arnush et *al.*, 1998 ; Dahlen et *al.*, 1998) (Figure 1.1). Par ailleurs, des travaux suggèrent que la production des molécules CCL2 (CC-*chemokine* ligand 2) et CCL1 par les cellules β pancréatiques et les lymphocytes T CD4⁺, respectivement, induit le recrutement des macrophages vers les îlots pancréatiques (Martin et *al.*, 2008 ; Cantor et Haskins, 2007). Par conséquent, les macrophages sont considérés comme l'une des principales cellules qui infiltrent les îlots pancréatiques (Arnush et *al.*, 1998 ; Dahlén et *al.*, 1998). Fait intéressant, en réponse à l'IFN- γ , les macrophages secrètent de grandes quantités de TNF et d'IL-1 β , après être activés. Ce dernier provoque l'apoptose des cellules β qui expriment le récepteur de l'IL-1 β (Lehuen et *al.*, 2010).

Cellules natural killer (NK)

Les cellules NK sont impliquées dans les réponses antivirales et dans la lyse des cellules tumorales et des cellules infectées. Ces cellules jouent un rôle important dans le développement du DT1 d'une façon directe ou indirecte (Lehuen et *al.*, 2010). Des travaux récents ont révélé la détection des cellules NK au niveau du pancréas des patients atteints du T1D (Brauner et *al.*, 2010). Aussi, il a été montré que les cellules NK isolées à partir du pancréas et des ganglions lymphatiques du pancréas (PLN, *pancreatic lymph nodes*) des souris NOD, sont excessivement activées, prolifèrent rapidement, et produisent de l'IFN- γ en grande quantité (Gur et *al.*, 2010). Elles expriment aussi fortement le CD25, le CD69, le PD1 et le récepteur des cellules tueuses G1 lectine-like (KLRG1, *Kiler cell lectin-like receptor subfamily G member 1*) (Brauner et *al.*, 2010).

1.1.2.1.2.4. Implication des cytokines, molécules d'adhésion, molécules de costimulation et de signalisation cellulaire

L'étape déterminante de la pathogénie du DT1 est la migration des cellules mononucléées vers les îlots pancréatiques. Au cours de cet événement, les molécules d'adhésion (sélectines et intégrines), jouent un rôle important dans l'extravasation des cellules vers les sites inflammatoires. D'après Yang et *al.* (1996), un traitement des souris NOD par des anticorps dirigés contre ces molécules prévient le développement de l'insulite, et par conséquent le DT1.

Une autre étape critique dans le processus pathogénique du DT1 est la reconnaissance des auto-antigènes pancréatiques par le récepteur des cellules T (TCR, *T cell receptor*) (Bach, 2002a). Les lymphocytes Th sont activés suite à l'interaction du TCR avec le complexe peptide pancréatique-CMH II exprimé par les DC au niveau des PLNs. D'un autre côté, les CTLs sont activées suite aux interactions de leurs TCR avec les auto-antigènes pancréatiques, présentés par les molécules du CMH I au niveau des cellules pancréatiques (Aribi, 2011).

Le mécanisme destructeur mis en place lors du DT1 semble être initié principalement par une production excessive des cytokines proinflammatoires (Chatzigeorgiou et *al.*, 2010). Ces cytokines interviennent essentiellement dans l'expression des molécules d'adhésion, le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires (Dubois-Laforgue, 2007). En effet, les

Chapitre 1. Revue de la littérature

lymphocytes T CD8⁺ et les macrophages infiltrés sont activés par certaines cytokines notamment l'IL-2, le TNF- β et l'IFN- γ produites par les lymphocytes Th1 activés (Aribi, 2011). Les cellules inflammatoires impliquées dans l'insulite produisent l'IL-1 β , l'IFN- γ , le TNF- α et le TNF- β qui peuvent endommager les cellules β (Campbell et *al.*, 1998). Ces cytokines semblent être également impliquées dans l'augmentation de la production des radicaux libres par les cellules inflammatoires (Kolb et Kolb-Bachofen, 1992).

Les molécules toxiques, telles que le peroxyde d'hydrogène, le monoxyde d'azote, les granzymes et les perforines ; les interactions Fas-FasL (CD95-CD95L) (Mukherjee et DiLorenzo, 2010), et les cytokines proinflammatoires essentiellement l'IL-1 β (Aribi et *al.*, 2007), le TNF- α (Lee et *al.*, 2005), l'IL-6 (Kristiansen et Mandrup-Poulsen, 2005), le TNF- β , l'IFN- γ , l'IL-18 (Szeszko et *al.*, 2006), l'IL-12 (Giulietti et *al.*, 2004) ,et l'IL-8 (Erbagci et *al.*, 2001), sont fortement impliquées dans le processus destructeur des cellules β pancréatiques.

Par ailleurs, les molécules d'adhésion et de costimulation sont impliquées dans la prolifération des lymphocytes T autoréactifs au niveau des PLNs. Le CD28-B7, CD40-CD40L (CD154) et NKG2D (*natural-killer group 2 member D*) -RAE-1 (*retinoic acid early transcript 1*) sont les trois principales voies de costimulation chez la souris NOD (Bour-Jordan et *al.*, 2004). Il a été montré que suite au traitement avec les anticorps anti-B7.2, l'apparition du DT1 peut être inhibée (Lenschow et *al.*, 1995). Aussi, l'activation des lymphocytes T au niveau des PLNs, chez la souris NOD, peut être inhibée suite au blocage de la voie CD40-CD40L avec un traitement d'anticorps neutralisant anti-CD40L (Green et *al.*, 2000). En outre, Ogasawara et ses collaborateurs (2004) ont montré qu'un traitement des souris NOD avec des anticorps anti-NKG2D peut prévenir le DT1, car la molécule NKG2D est exprimée par les lymphocytes T CD8⁺ activés ayant infiltré les tissus pancréatiques.

1.1.2.2. Facteurs génétiques

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence différentes zones du génome impliquées dans la susceptibilité du DT1. En effet, dix-huit loci génétiques dénommés antérieurement loci IDDM (*insulin-dependent diabetes mellitus*) (IDDM1 à IDDM18) ont été identifiés dans la susceptibilité du DT1 (Redondo et Eisenbarth, 2002 ; Todd, 1995).

Chapitre 1. Revue de la littérature

La région HLA (*Human Leucocyte Antigen*) est considérée comme la région génétique de plus forte susceptibilité au DT1 (Aribi et *al.*, 2004) (Figure 1.2). En effet, elle contribue à 50 % au risque génétique du DT1 (Wen et *al.*, 2000). Les molécules HLA principalement incriminées dans la pathogenèse de la maladie sont HLA-DR (DRA-DRB1 (*0301) (=DR3) et DRA-DRB1 (*0401) (=DR4) et HLA-DQ (DQA1 (*0501)-DQB1 (*0201) (=DQ2), DQA1 (*0301)-DQB1(*0302) (=DQ8) (Honeyman et *al.*, 1997).

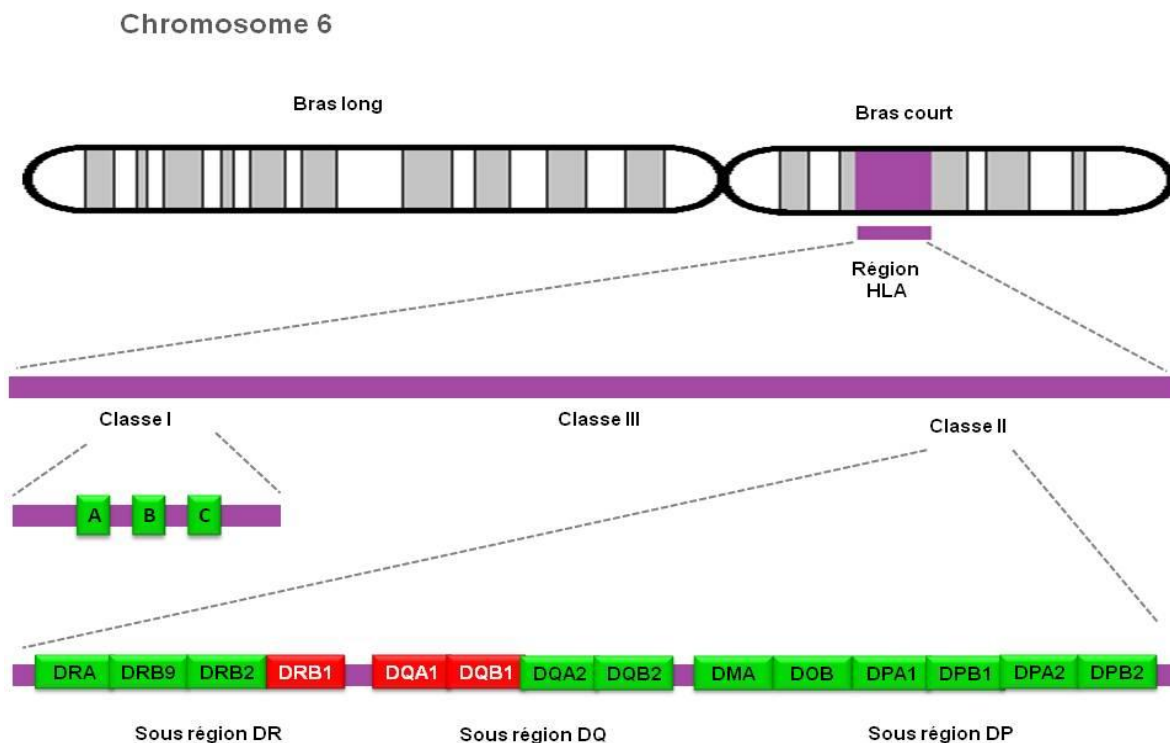


Figure 1.2. Organisation des gènes HLA sur le chromosome 6 et susceptibilité au diabète de type 1 (Mehers et Gillespie, 2008). HLA : *Human Leucocyte Antigen*.

« Éléments variables du gène de l'insuline » (VNTR, *variable number of tandem repeat*) est identifié comme un gène de susceptibilité au DT1. Il correspond au IDDM2 (Bennett et *al.*, 1996), et contribue pour 10 % à la susceptibilité génétique au DT1 (Dubois-Laforgue, 2007). Ce gène est situé sur le chromosome 11p15, en 5' du gène de l'insuline en amont des gènes IGF2 (*Insulin-like growth factor-2*) et INS (*Insulin*) et contrôlerait leurs expression (Pérez De Nanclares et *al.*, 2003). On distingue les allèles VNTR de classe I, souvent associés à une susceptibilité au DT1, intermédiaire de classe II et long de classe III. Ces derniers confèrent plutôt une protection vis-à-vis du DT1 (Geenen et *al.*, 2005). En effet, une corrélation positive

Chapitre 1. Revue de la littérature

entre des niveaux élevés des transcrits de *INS* dans le thymus du fœtus humain et la présence d'allèles VNTR de classe III a été montrées (Pugliese et Miceli, 2002).

D'autres gènes de prédisposition ont été également identifiés, comme le gène codant pour le récepteur de IGF1 (Beyerlein et *al.*, 2014), et celui qui code pour la molécule CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) (Arafa et *al.*, 2015), correspondant aux IDDM3 et IDDM12, respectivement.

1.1.2.3. Facteurs environnementaux

L'augmentation fulgurante de l'incidence du DT1 et les caractéristiques épidémiologiques de cette maladie ne peuvent être expliquées par des facteurs génétiques exclusivement, aussi des facteurs environnementaux jouent également un rôle important dans son processus de développement.

Depuis longtemps, les agents infectieux ont été incriminés dans le déclenchement ou le déroulement de la réponse auto-immune conduisant au DT, en particulier les virus (Dubois-Laforgue, 2007). Ainsi, il a été démontré que le virus Coxsackie B4 (CVB4) joue un rôle essentiel dans l'infection des cellules β pancréatiques, il induit la libération des auto-antigènes spécifiques conduisant à l'activation des cellules T autoréactives (Geenen et *al.*, 2005). D'autres virus ont été répertoriés dans la liste des facteurs, à savoir le Cytomégalovirus, le virus de la rubéole et le virus d'Epstein Barr (Jaeckel et *al.*, 2002). Cependant, un effet protecteur vis-à-vis du développement de la maladie par des agents infectieux a été suggéré (Bach, 2002b). A titre d'exemple, il a été observé que l'infection par *Salmonella thyphimurium* prévient l'apparition du DT1 chez la souris NOD (Raine et *al.*, 2006).

Aussi, un impact de l'alimentation dans l'apparition du DT1 a été bien élucidé. Un lien entre l'introduction précoce de lait de vache à l'alimentation des enfants et le risque de développer le DT1 a été suggéré suite à plusieurs travaux. Il a été montré que des enfants nourris au lait de vache sont plus susceptibles à développer un DT1, notamment chez les enfants porteurs des haplotypes HLA DR3/DR4 de susceptibilité au DT1, que ceux nourris au lait maternel (Virtanen et *al.*, 2000). Des protéines allergènes structurellement similaires à des protéines produites par les cellules d'îlots de Langerhans sont retrouvées dans le lait des bovins, favorisant le risque de réactivité croisée (Cavallo et *al.*, 1996). Cela serait dû à une homologie entre un peptide de la sérum albumine bovine (SAB), baptisé ABBOS, et une

protéine insulaire de 69 KDa (Norris et Pietropaolo, 1999). Néanmoins, d'autres études réalisées chez les nouveaux-nés à risque n'ont pas montré d'association entre les modalités d'allaitement et l'apparition du DT1 (Couper et *al.*, 1999). Fait intéressant, les nitrates présents dans l'eau de consommation (Muntoni et *al.*, 2006), et le gluten (Fuchtenbusch et *al.*, 2004), sont également soupçonnés de favoriser le développement du DT1.

1.2. Populations lymphocytaires T helper

Le système immunitaire a pour fonctions de tolérer les auto-antigènes, de reconnaître les antigènes étrangers et les éliminer. Ce système complexe est formé d'organes lymphoïdes, de cellules et de molécules. Les cellules immunitaires sont principalement constituées de lymphocytes, notamment les lymphocytes T et des lymphocytes B. Ces deux types cellulaires constituent la charpente de l'immunité spécifique.

Les lymphocytes T conventionnels ($T_{\alpha\beta}$) sont formés de lymphocytes T $CD4^+$ et de lymphocytes T $CD8^+$. Ces derniers sont principalement impliqués dans l'élimination des antigènes intracellulaires. Les lymphocytes T $CD4^+$, une population hétérogène de cellules T auxiliaires (T helper, Th) sont considérés comme les acteurs clés dans l'orchestration d'une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre un pathogène, en exerçant différentes fonctions allant de l'activation des cellules du système immunitaire inné, des lymphocytes T cytotoxiques, des lymphocytes B, et jusqu'à la régulation de la réponse immunitaire adaptative (O'Garra, 1998). Après leur activation, les lymphocytes Th se différencient en sous-populations lymphocytaires, chacune exerce des fonctions spécifiques, en sécrétant des cytokines spécifiques distinctes.

1.2.1. Développement des lymphocytes $T_{\alpha\beta}$

Les précurseurs des lymphocytes T, appelés *Early Thymic Progenitor* (ETP), dérivant d'une cellule souche hématopoïétique lymphoïde commune, quittent la moelle osseuse afin d'atteindre le thymus (Figure 1.3), un organe lymphoïde primaire où ces cellules trouveront le microenvironnement adéquat pour acquérir leurs maturations et devenir des lymphocytes T fonctionnelles (Luckheeram et *al.*, 2012).

Une fois dans le thymus, les cellules ETP sont appelées thymocytes double négatifs $CD4^- CD8^-$ (DN), correspondent aux thymocytes les plus immatures, et vont migrer depuis la

jonction cortico-médullaire vers la région sous-capsulaire du cortex thymique (Lind et al., 2001) (Figure 1.3).

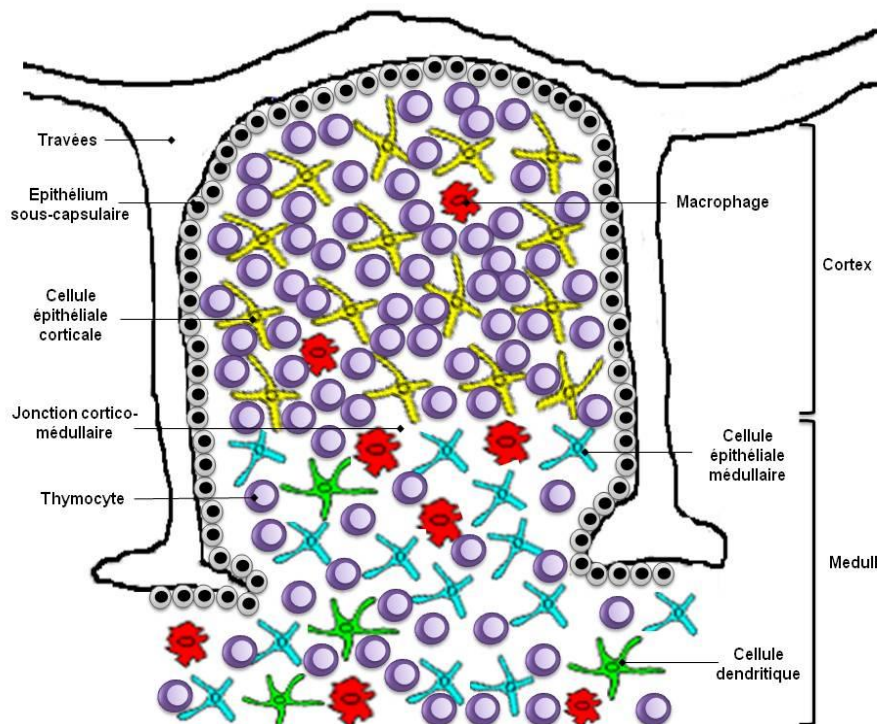


Figure 1.3. Schéma d'organisation générale d'un lobule thymique (Berrih-Aknin et Bruno Eymard, 1999). Le thymus est constitué de plusieurs lobules dont chacun comporte deux zones bien déterminées : le **cortex** (périphérique) qui contient des thymocytes immatures (en violet) en forte densité, des cellules épithéliales corticales (en jaune) et des macrophages (en rouge) ; et la **medulla** (centrale) qui comporte des thymocytes plus matures, des cellules dendritiques (en vert), des cellules épithéliales médullaires (en bleu) et des macrophages.

Au niveau du cortex, selon l'expression des marqueurs de surface CD44 et CD25, les thymocytes DN vont subir quatre principales étapes de maturation passant du stade DN1 jusqu'au stade DN4 (Berrih-Aknin et Bruno Eymard, 1999) (Figure 1.4). Le réarrangement des gènes codant la chaîne β du TCR se fait lorsque le thymocyte est entre le stade DN2 et DN3 sous le contrôle des protéines RAG1 (*Recombination-Activating Genes 1*) et RAG2 (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1993).

Au stade DN3, le complexe pré-TCR- $\alpha\beta$ est formé suite à l'appareillage de la chaîne β , conformément réarrangée, avec une chaîne de substitution pT α (pré-T-cell- α) qui assure sa stabilisation (Saint-Ruf et al., 1994). Le réarrangement du locus de la chaîne α se fait dans le stade DN4, et les thymocytes commencent enfin à exprimer le CD8 et le CD4 pour former des thymocytes double positifs CD4⁺CD8⁺ (DP). Ces derniers représentent 80 à 90 % des thymocytes présents dans le thymus (Sebzda et al., 1999).

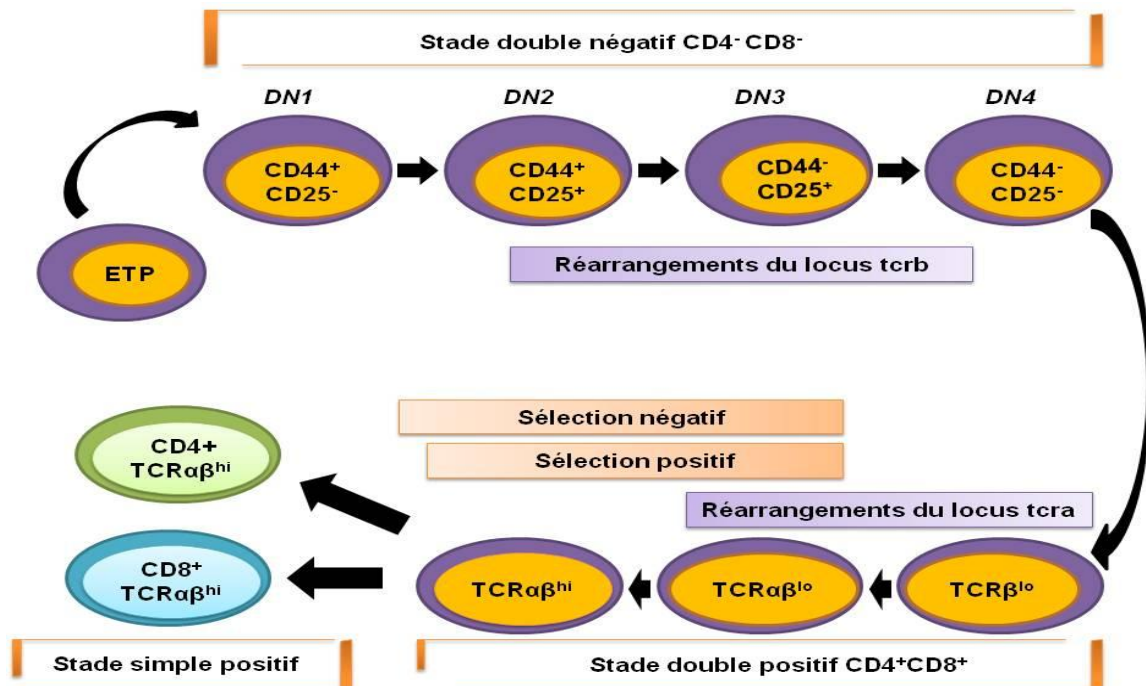


Figure 1.4. Schéma simplifié du développement des lymphocytes T αβ dans le thymus (Sebzda et al., 1999). DN: Double Négatif, ETP: Early Thymic Progenitor, TCR : Récepteur de la cellule T.

Après la formation complète du TCR, constitué de chaînes αβ, les lymphocytes T générés doivent être aptes à reconnaître les antigènes pathogènes et les éliminer, sans s'activer à l'égard des composantes naturelles du soi. Pour cela, les bons thymocytes doivent être sélectionnés par des mécanismes de sélection au niveau du thymus, ce processus est appelé la tolérance centrale (Klein et al., 2009). En effet, au cours de ce processus, les thymocytes DP vont entrer en contact avec des cellules présentatrices d'antigène thymiques (Klein et al., 2009). Ainsi au niveau du cortex, les thymocytes DP vont subir une première sélection; une sélection positive (Benoist et Mathis, 1989), où seuls ceux capables de reconnaître des peptides présentés sur les molécules du CMH par les cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC), (Figure 1.3), sont positivement sélectionnés (Nakagawa et al., 1998). Ces derniers se dirigent ensuite vers la médulla thymique pour y subir une deuxième sélection; une sélection négative (Witt et al., 2005). A ce niveau, les cellules dendritiques ainsi que les cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC), (Figure 1.3), vont leur présenter, sur leurs molécules du CMH, des antigènes dérivés du soi qu'ils peuvent reconnaître par la suite à la périphérie. Afin de limiter l'export des lymphocytes T autoréactifs, les thymocytes qui ont une trop forte affinité pour les complexes CMH-peptides du soi sont éliminés, et les autres deviennent des lymphocytes T matures simples

positifs CD4⁺ ou CD8⁺, et sortent enfin du thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (Klein et *al.*, 2009).

Toutefois, même avec le strict contrôle suite à la sélection thymique, des lymphocytes T autoréactifs se retrouvent parfois à la périphérie. Ces derniers doivent être éliminés par des mécanismes de tolérance en périphérie (Walker et Abbas, 2002), principalement suite à l'intervention des lymphocytes Treg (tolérance périphérique).

1.2.2. Activation, différenciation et polarisation des lymphocytes T helper

Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, l'interaction lymphocyte Th-cellule dendritique joue un rôle clé dans le déroulement et l'articulation de la réponse immunitaire adaptative. En effet, l'engagement du TCR, exprimé par le lymphocyte Th, avec le complexe CMH/peptide spécifique, au niveau de la cellule dendritique, conduit à l'activation du lymphocyte Th suite au recrutement de nombreuses molécules de surfaces et de signalisation. La zone de contact entre ces deux cellules est appelée: synapse immunologique; un terme utilisé pour la première fois en 1984 par Norcross (Norcross, 1984).

L'activation des lymphocytes Th est suivie par leur prolifération et différenciation en cellules Th effectrices parmi lesquelles différents lignages sont bien décrits; les lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1), les lymphocytes T auxiliaires 2 (Th2), les lymphocytes T auxiliaires 17 (Th17) (Luckheeram et *al.*, 2012). Chaque lignage a des fonctions spécifiques, et la différenciation vers un clone spécifique dépend principalement du microenvironnement cytokinique présent lors de l'initiation de la réponse immune (Romagnani, 1992) (Figure 1.5).

1.2.2.1. Lymphocytes Th1: différenciation et fonctions

Le développement des clones Th1 est contrôlé par une cytokine clé produite par les cellules dendritiques et les macrophages suite à une stimulation par des produits viraux, des bactéries intracellulaires, ainsi que par des protozoaires; il s'agit de l'IL-12 (Trinchieri, 1993) (figure 1.5).

L'IL-12 est une molécule composée de deux sous-unités reliées par un pont disulfure; la p40, dont la synthèse est inductible par les cellules lymphoïdes, et la p35, exprimée de façon constitutive par plusieurs types de cellules (Trinchieri et *al.*, 2003). La différenciation des Th1 dépend également d'une autre cytokine ; l'IFN- γ (Zhu et Paul, 2008).

Chapitre 1. Revue de la littérature

La réponse initiale à l'IL-12 induit l'activation du facteur STAT4 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 4*), entraînant une faible expression de l'IFN- γ . L'interaction de cette dernière avec son récepteur, exprimé par la même cellule productrice ou voisine, active un autre facteur de transcription STAT1, qui induit l'expression du T-bet (*T box expressed in T cells*), considéré comme le facteur majeur de transcription des lymphocytes Th1 (Thierfelder et al., 1996). L'expression du T-bet, amplifie, d'une part, la transcription du gène de l'IFN- γ , conduisant à la synthèse de quantités importantes d'IFN- γ , et favorise, d'autre part, l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 par le lymphocyte T, désormais polarisé en lymphocyte Th1, potentialisant ainsi l'effet de l'IL-12 (Amsen et al., 2009; Annunziato et Romagnani, 2009 ; Szabo et al., 1997).

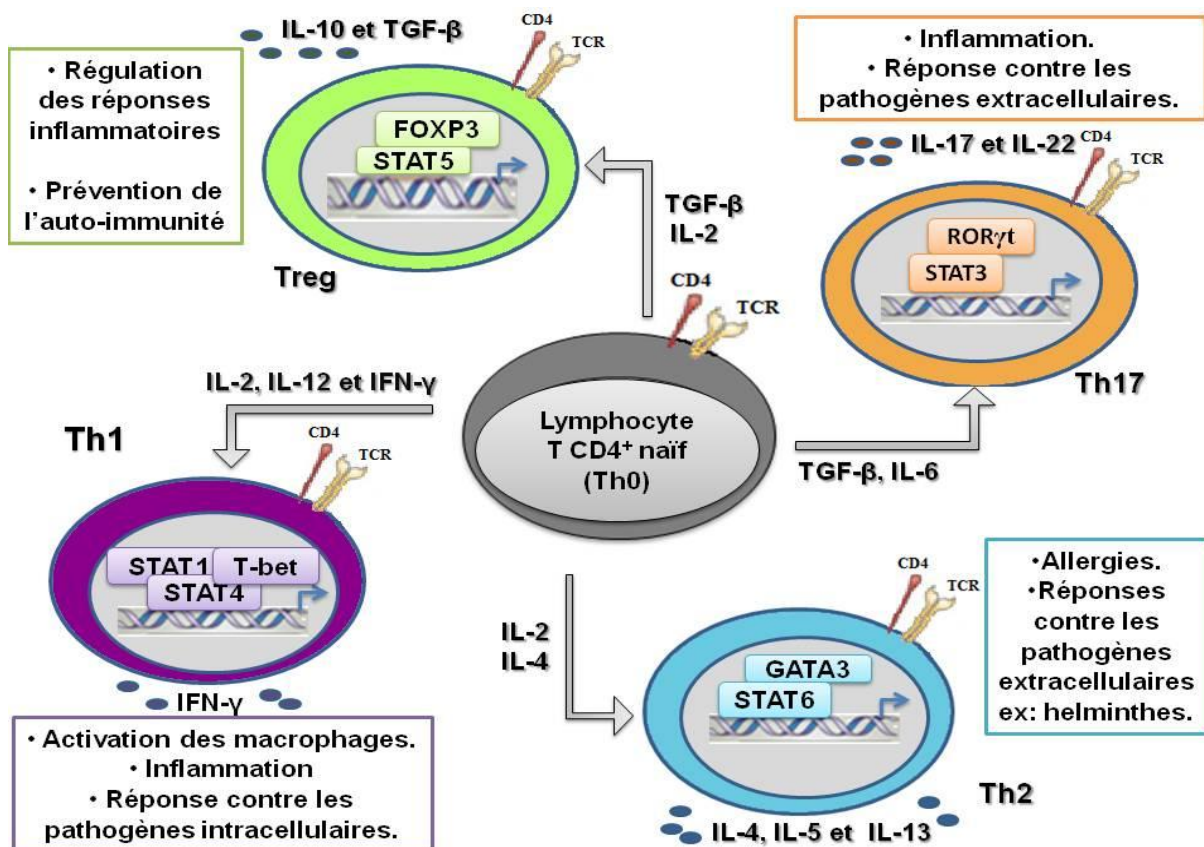


Figure 1.5. Différentiation et polarisation des profils lymphocytaires T helper (DuPage et Bluestone, 2016 ; Swain et al., 2012). Suite à la reconnaissance d'un antigène spécifique présenté par une cellule présentatrice d'antigène, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent être polarisés en sous-ensembles de cellules T helper effectrices distinctes capable d'orchestrer les réponses immunitaires. La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ est contrôlée principalement par des facteurs de transcription, dont l'expression est déterminée essentiellement par des cytokines. Chaque sous-ensemble de lymphocyte T helper se caractérise par un profil cytokinique et par des fonctions bien distinctes. Cellule Treg: cellule T régulatrice, FOXP3: forkhead box transcription factor p3, GATA3: GATA-binding protein 3, IFN- γ : interféron-gamma, IL: interleukin, ROR: Retinoid-related orphan receptor, STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription, TCR: T cell receptor, TGF- β : Transforming Growth Factor- β , Th: T helper.

Chapitre 1. Revue de la littérature

L'IL-18 favorise également la différenciation Th1 induite par l'IL-12. Cependant, cette cytokine est incapable de diriger à elle seule leur développement. En effet, il a été rapporté antérieurement (Robinson et *al.*, 1997), que l'IL-18 agit après l'induction de la polarisation Th1 par l'IL-12 en favorisant la synthèse d'IFN- γ par les cellules Th1.

D'autres facteurs semblent également favoriser la différenciation des clones Th1, tels que Runx1 (*Runt-related transcription factor 1*) et Runx3 (Kohu et *al.*, 2009; Komine et *al.*, 2003), l'Eomesodermin (Eomes), qui est, à côté du T-bet, un membre de la famille T-box (Luckheeram et *al.*, 2012). Les principaux marqueurs de surfaces exprimés par les lymphocytes Th1 sont la chaîne β du récepteur de l'IL-12 (Szabo et *al.*, 1997), et celle de l'IFN- γ (Bach et *al.*, 1995), le récepteur de l'IL-18 (Xu et *al.*, 1998), ainsi que les récepteurs des chimiokines CXCR3 et CCR5 (Bonnechi et *al.*, 1998 ; Loetscher et *al.*, 1998).

Les cellules Th1 orientent les réponses immunes à médiation cellulaire, ordonnant la destruction des pathogènes intracellulaires et stimulent une commutation de classe vers la production d'immunoglobuline G1 (IgG1), d'IgG2 et d'IgG3 (Annunziato et Romagnani, 2009 ; Mosmann et Coffman, 1989). Les cytokines secrétées par les lymphocytes Th1, principalement l'IFN- γ et IL-2, sont impliquées dans l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques (Gattinoni et *al.*, 2005 ; Sad et *al.*, 1995). L'IFN- γ , une cytokine proinflammatoire, peut également activer les macrophages et augmenter leur activité antimicrobienne (Mosmann et Coffman, 1989b ; Murray et *al.*, 1985). Ce qui implique que les réponses Th1 sont souvent associées à des phénomènes inflammatoires, notamment la réaction d'hypersensibilité. Aussi, les lymphocytes Th1 sont fortement impliqués dans la génération des pathologies auto-immunes et dans d'autres désordres inflammatoires qui sont souvent médiés par les réponses immunes à médiation cellulaire (Martin et Moscat, 2012).

1.2.2.2. Lymphocytes Th2 : différenciation et fonctions

La différenciation des clones Th2 dépend principalement de l'IL-4 (Swain et *al.*, 1990). En effet, un défaut majeur de la génération des réponses Th2 en réponse à de nombreux stimuli a été constaté au niveau des souris invalidées pour le gène de l'IL-4 (Kuhn et *al.*, 1991).

En réponse à l'IL-4, la protéine STAT6 est activée, ce qui induit l'expression du GATA3 (*GATA-binding protein 3*), considéré comme le facteur de transcription spécifique des

Chapitre 1. Revue de la littérature

lymphocytes Th2, et favorise l'expression du gène de l'IL-4 (Ansel et *al.*, 2006 ; Zhu et *al.*, 2001). Plus particulièrement le GATA3 est indispensable pour la différenciation des clones Th2 en favorisant la production des cytokines de type Th2, comme l'IL-5, l'IL-13 et principalement l'IL-4 (Amsen et *al.*, 2009). STAT6 est impliquée dans la surexpression du gène de l'IL-4 en augmentant l'expression du facteur de transcription c-Maf (*cellular muscular aponeurotic fibrosarcoma*) (Ansel et *al.*, 2006 ; Kim et *al.*, 1999). Ce dernier est un membre de la famille de la protéine activatrice 1 (AP1, *Activator protein 1*), et son expression est restreinte aux cellules Th2. D'après Ho et *al.* (1998), une surexpression du c-Maf chez la souris induit une augmentation de la réponse immune Th2. Son déficit provoque une diminution de la production d'IL-4 (Kim et *al.*, 1999).

Le *growth factor independent-1* (Gfi-1), un répresseur de transcription qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose, est impliqué dans la différenciation de plusieurs cellules hématopoïétiques (Suzuki et *al.*, 2016), et est également impliqué dans le processus de différenciation des cellules Th2 induit par IL-4/STAT6 (Zhu et *al.*, 2002). Selon Shinnakasu et *al.* (2008), le facteur Gfi-1 joue un rôle dans la stabilisation de l'expression du GATA3. Par ailleurs, la production de l'IL-4 par les lymphocytes Th est également induite suite à l'activation du STAT5 en réponse à l'IL-2 (Cote-Sierra et *al.*, 2004). Par conséquent, l'IL-2, à côté de l'IL-4, joue aussi un rôle primordial dans la différenciation des lymphocytes Th2.

Les cellules Th2 expriment à leurs surface les récepteurs aux chimiokines CCR3 et CCR4 (Mai et *al.*, 2010), et CCR8 (D'Ambrosio et *al.*, 1998). Elles secrètent principalement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-13, et jouent un rôle primordial dans l'induction des réponses immunitaires à médiation humorale, dirigeant ainsi l'élimination des pathogènes extracellulaires tels que les parasites (Sokol et *al.*, 2009; Del Prete, 1992). Les lymphocytes Th2 stimulent la commutation isotypique des lymphocytes B pour la production d'IgE. Par conséquent, ils sont souvent associés au développement des allergies (Stavnezer, 1996). Les cellules Th2 favorisent également la production d'IgG de type 4 (Annunziato et Romagnani, 2009).

L'IL-4, la principale cytokine produite par les clones Th2, induit l'expression du récepteur de haute affinité pour l'IgE (FcεRII) par les mastocytes et les basophiles, ainsi que le récepteur de faible affinité pour IgE (FcεRI) par les macrophages et les lymphocytes B, et par conséquent la libération de l'histamine et de la sérotonine (Steinke et Borish, 2001). Cette cytokine induit également une diminution des médiateurs inflammatoires comme l'IL-6, le

Chapitre 1. Revue de la littérature

facteur de croissance des granulocytes et macrophages (GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*) (Doucet et al., 1998).

L'IL-5, quant à elle, joue un rôle clé dans l'activation et le recrutement des éosinophiles. En effet, ces derniers expriment fortement le récepteur de l'IL-5 (Rothenberg et Hogan, 2006). L'IL-9 est impliqué dans l'activation des lymphocytes B, des mastocytes et des éosinophiles, et est associé souvent aux allergies respiratoires, vu son implication dans la libération des facteurs chimiottractant et la sécrétion excessive du mucus (Little et al., 2001).

1.2.2.3. Contre-régulation réciproque des réponses Th1/Th2

Une contre-régulation réciproque entre les réponses Th1 et Th2 existe. Tant que le profil Th2 est activé, le profil Th1 est inhibé, et vice versa; un véritable cercle vicieux !. En effet, le développement de la lignée Th1 est inhibé suite à l'inhibition de la production d'IL-12 essentiellement par l'IL-4 produit par les clones Th2 (Koch et al., 1996); alors que le développement des cellules Th2 est inhibé par l'IFN- γ sécrété par les cellules Th1 (Fitch et al., 1993) (Figure 1.6).

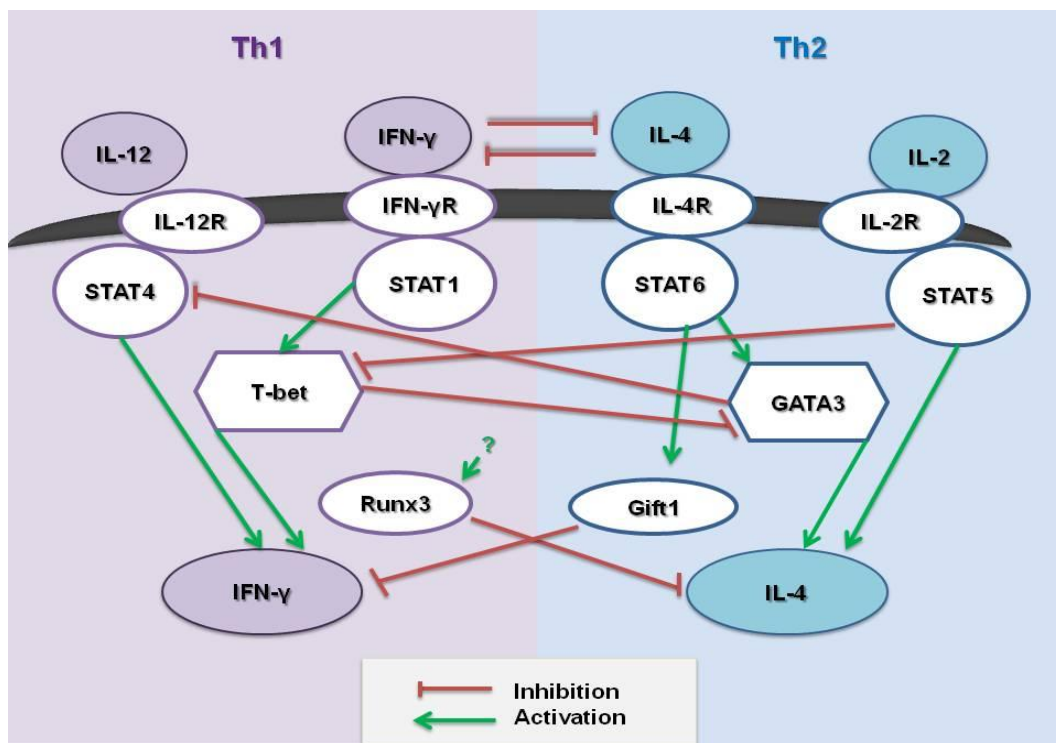


Figure 1.6. La contre-régulation réciproque des réponses Th1/Th2 (Zhu et Paul, 2008).
GATA3: GATA-binding protein 3, Gfi1: Growth factor independent-1, IFN- γ : interferon-gamma, IL: interleukin, IL-R: interleukin receptor. Runx3: Runt-related transcription factor 3, STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription, T-bet: T-box-expressed in T-cells.

De plus, les facteurs de transcription spécifiques impliqués dans la différenciation des clones Th1/Th2 jouent un rôle important dans cette régulation réciproque. En effet, les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des clones Th1 inhibe la différenciation Th2 comme Runx3 qui réprime la transcription de l'IL-4 (Kohu et *al.*, 2009 ; Zhu et Paul, 2008), et T-bet qui diminue l'expression du GATA-3 (Hwang et *al.*, 2005). Ce dernier, impliqué dans la différenciation de la lignée Th2, inhibe à son tour l'activation du STAT4 et l'expression du récepteur β de l'IL-12 (Usui et *al.*, 2003). L'expression du T-bet et la production de l'IFN- γ sont inhibés par STAT5 (Zhu et Paul, 2008) et Gfi-1 (Suzuki et *al.*, 2016), respectivement (Figure 1.6).

1.2.2.4. Lymphocytes Th17 : différenciation et fonctions

La différenciation du lymphocyte Th naïf (Th0) en Th17 est induite principalement par le facteur TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) et l'IL-6 (Weaver et *al.*, 2007), suite à l'activation des facteurs de transcription ROR γ t (*Retinoid-related orphan receptor gamma t*) et STAT3. Ce qui induit la production d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22 ; des cytokines de type Th17 (Jetten, 2009) (Figure 1.7).

A côté du ROR γ t et STAT3, différents autres facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des clones Th17, tels que le ROR α , appelé également ; NR1F1 (*nuclear receptor subfamily 1*) ou RORA (Jetten et *al.*, 2009), qui est un facteur de transcription appartenant à la famille ROR. En synergie avec ROR γ t, ROR α peut améliorer la différenciation des Th17 (Chi et *al.*, 2016). En inhibant le STAT1, qui régule négativement le développement des clones Th17, le récepteur « d'hydrocarbures » aromatiques (AHR, *aryl hydrocarbon receptor*), un autre facteur de transcription, joue un rôle dans le développement des clones Th17 (Kimura et *al.*, 2008; Veldhoen et *al.*, 2008).

Au cours de la différenciation des lignées Th1 et Th2, l'IFN- γ et l'IL-4 assurent la différenciation, ainsi que l'amplification de ces lignées, respectivement. Cependant, l'IL-17 produit par les clones Th17 différenciés ne peut pas assurer l'amplification de la lignée Th17. L'amplification et le maintien de cette lignée dépendent de l'IL-21 et de l'IL-23, respectivement (Veldhoen et *al.*, 2006 ; Langrish et *al.*, 2005). En présence de l'IL-6, le TGF- β induit la production de l'IL-21 et l'expression du l'IL-23R (Zhou et *al.*, 2007; Veldhoen et *al.*, 2006). La sécrétion de l'IL-17 et de l'IL-21 est par la suite améliorée par l'IL-21 qui agit

en boucle autocrine (Nurieva et al., 2007) (Figure 1.7). La polarisation des LT naïfs en Th17 est inhibée principalement par l'IL-27 et l'IFN- γ (McGeachy et Cua, 2007).

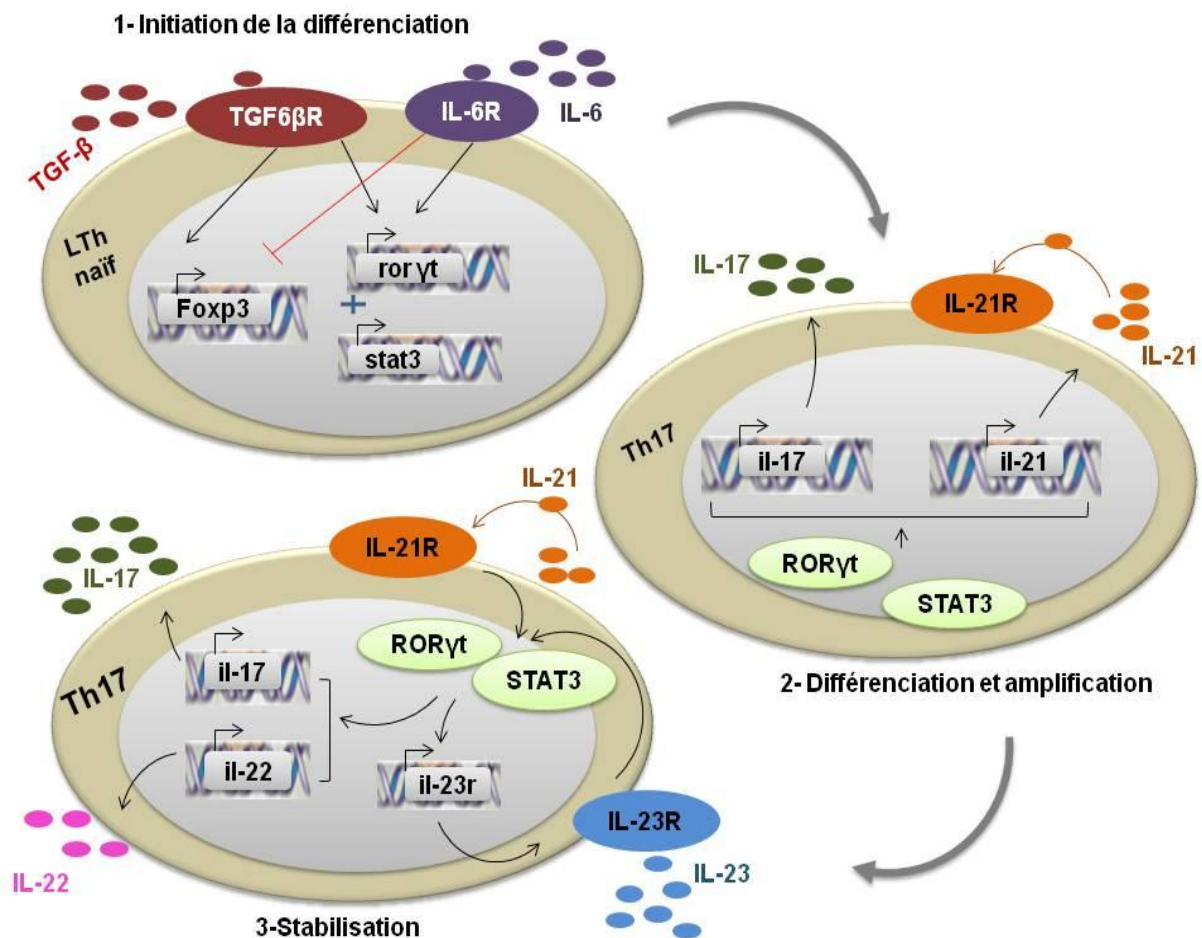


Figure 1.7. Différenciation et maintien de la lignée Th17 (Jetten, 2009). *Foxp3*: Forkhead box transcription factor p3, *IL*: Interleukin, *IL-R*: interleukin Receptor, *LTh*: T helper Lymphocyte, *ROR*: Retinoid-related orphan receptor, *STAT*: Signal Transducers and Activators of Transcription. *TGF- β* : Transforming Growth Factor- β .

En 2005, la description d'une lignée comme une nouvelle population lymphocytaire T CD4 a bouleversé la dualité Th1/Th2. Harrington et al. (2005), semblent être les premiers à utiliser le terme Th17 plutôt que « Cellules T CD4 productrices de l'IL-17 ». Cette sous-population, sécrétrice d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22, est décrite comme une population interagissant avec l'immunité innée et adaptative, cellulaire et humorale (Harrington et al., 2005), et est impliquée généralement dans les réponses immunitaires anti-infectieuses, principalement dans les réponses antifongiques (Annunziato et al., 2007).

Chapitre 1. Revue de la littérature

En effet, les lymphocytes Th17 jouent un rôle dans la destruction des pathogènes qui sont résistants aux réponses immunes prodiguées par les lymphocytes Th1 et Th2 et qui nécessitent une forte réponse inflammatoire.

Partageant le même récepteur (IL17RA), l'IL-17A et l'IL-17F ont des fonctions semblables (Gaffen, 2009), Ils sont largement impliqués dans les réponses inflammatoires à cause de la présence de leurs récepteurs dans différents tissus, tels que l'intestin et la peau (Luckheeram et al., 2012), stimulent l'expression des chimiokines CXCL1 et CXCL8, ainsi que plusieurs cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, le GM-CSF et le facteur de croissance des granulocytes (G-CSF, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*), en agissant sur différentes cellules comme les cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastes et les macrophages (Awane et al., 1999 ; Jovanovic et al., 1998). Hormis son rôle essentiel dans l'amplification du Th17, l'IL-21 induit la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et active les lymphocytes T ainsi que les cellules NK (Leonard et Spolski, 2005). L'IL-22 joue un rôle dans les réponses immunes contre les bactéries au niveau des muqueuses en induisant la production des peptides antimicrobiens (Aujla et al., 2008).

1.2.2.5. Lymphocytes T régulateurs : différenciations et fonctions

Selon leur mode de génération, les lymphocytes Treg sont divisés en lymphocytes Treg naturels (nTreg), générés naturellement dans le thymus, et les lymphocytes Treg induits (iTreg), convertis en Treg lors de l'activation dans la périphérie (Wing et Sakaguchi, 2010) (Figure 1.8).

Les cellules **nTreg**, représentent environ 10 % de la population totale des lymphocytes T CD4⁺ (Broere et al., 2011), proviennent des lymphocytes T CD4 naïfs qui auraient échappés à la sélection négative au niveau du thymus (Fontenot et al., 2005). Ces cellules expriment de façon constitutive le facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box transcription factor p3*) qui est considéré comme un facteur de transcription clé dans la différenciation des Treg, ainsi que le CD25, la sous-unité α du récepteur de haute affinité à l'IL-2 (Fehervari et Sakaguchi, 2006), et expriment faiblement le CD127 (Seddiki et al., 2006). Cette sous-population exprime également le OX40 (CD134), la L-selectin (CD62L) et la CTLA-4 (CD152) (Jonuleit et Schmitt, 2003).

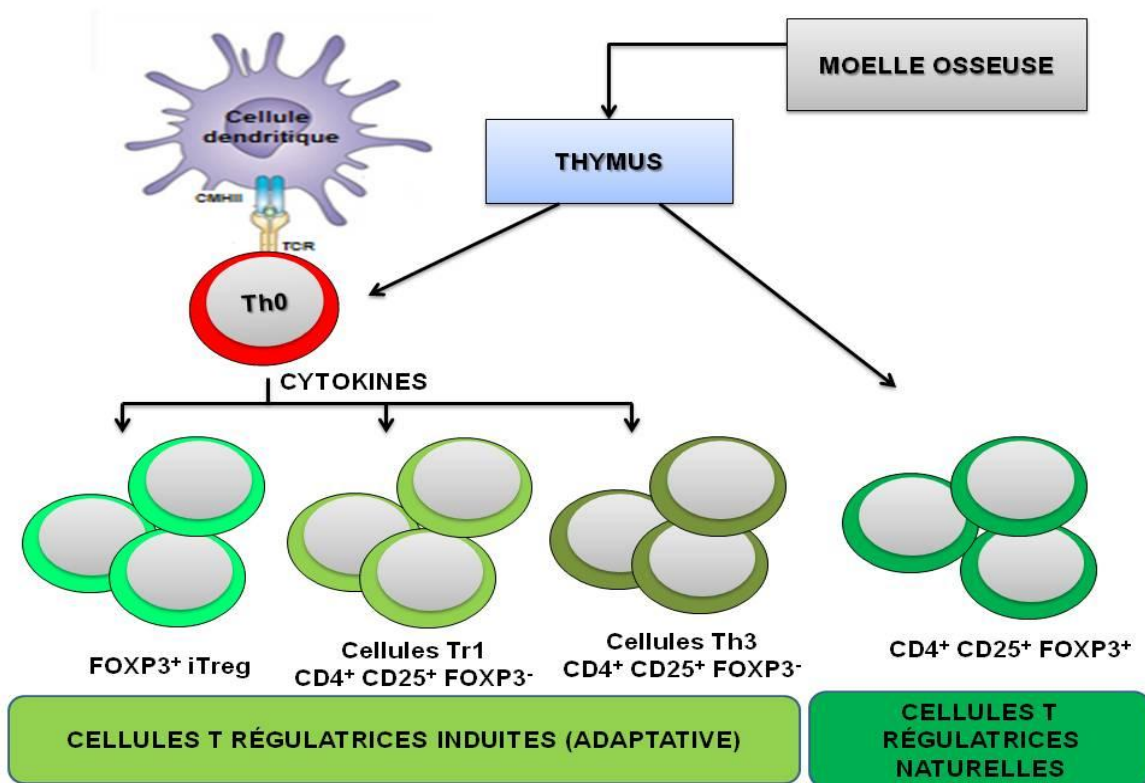


Figure 1.8. Développement des lymphocytes T régulateurs (Gitelman et Bluestone, 2016 ; Lourenço et La Cava, 2011). Les cellules nTreg sont produites au niveau du thymus, les iTreg par contre se développent à partir des LTh naïfs en périphérie. Trois sous types de Treg induits ont été décrits ; les iTreg FOXP3⁺, les cellules Tr1 et les cellules Th3. CD: Cluster de différenciation, CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, Foxp3 : Forkhead box transcription factor p3. iTreg : Lymphocyte T régulateur induit, LTh : lymphocytes T helper, nTreg : lymphocyte T régulateur naturel, TCR : Récepteur de la cellule T.

Les cellules iTreg ont quasiment les mêmes caractéristiques que les nTreg sur le plan de l'expression de marqueurs (Luckheeram et *al.*, 2012). Trois sous types de iTreg ont été identifiées ; les cellules Tr1 (*Type 1 regulatory T cells*), productrices de l'IL-10, les cellules Th3 productrices du facteur TGF- β , et les cellules iTreg FOXP3⁺ (Lourenço et La Cava, 2011). Les iTreg se développent, en périphérie à partir des cellules T CD4⁺ naïves dans un milieu cytokinique approprié ; principalement en présence du TGF- β (Chen et *al.*, 2003), et d'IL-10 (Roncarolo et *al.*, 2001), et leurs expansion dépend essentiellement de l'IL-4 et de l'IL-10 (Weiner, et *al.*, 2001). En effet, le TGF- β induit non seulement la différenciation en Th17 en favorisant l'expression des facteurs de transcription ROR γ t mais aussi la polarisation en lymphocytes iTreg suite à l'induction de l'expression du Foxp3 (Chen et *al.*, 2003). Cette différenciation cellulaire des iTreg dépend de l'activation du STAT5 qui assure le maintien de l'expression du Foxp3 (Zorn, 2006).

Chapitre 1. Revue de la littérature

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des iTregs. En effet, le TGF- β favorise également l'activation du Smad 2 et Smad3 (Takimoto et *al.*, 2010).

Les lymphocytes Treg ont pour principales fonctions le maintien de la tolérance immunitaire périphérique, ainsi que l'atténuation des réponses immunes exagérées, et par conséquent, ils jouent un rôle essentiel dans la prévention des maladies auto-immunes (Sakaguchi et *al.*, 2006). Le mécanisme exact par lequel cette sous-population lymphocytaire exerce ses fonctions n'est pas complètement élucidé. Cependant, son profil de sécrétion cytokinique semble jouer un rôle crucial (Broere et *al.*, 2011).

Les lymphocytes Treg agissent sur leurs cellules cibles, un grand nombre de cellules immunitaires, directement par contact cellule-cellule (nTreg) *via* des molécules inhibitrices comme la CTLA-4 (Broere et *al.*, 2011), ou en produisant des cytokines anti-inflammatoires/régulatrices (iTreg), principalement l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- β (Gitelman et Bluestone, 2016) (figure 1.8). En effet, ce dernier peut provoquer l'inhibition des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ ainsi que ceux des cellules Th1 (Li et *al.*, 2007 ; Von Boehmer, 2005).

L'IL-10, quand à elle, est impliquée dans la diminution de la production de l'IL-2, l'IL-5 et du TNF- α (Ouyang et *al.*, 2011). Aussi, le TGF- β et l'IL-10 sont capables de limiter la production des IgE, atténuant ainsi les allergies (Jutel et Akdis, 2008). Par ailleurs, les lymphocytes Treg peuvent agir indirectement sur les lymphocytes T et réguler leur activation *via* la modulation de l'état d'activation des CPAs, et cela en inhibant l'expression des molécules de costimulation (Broere et *al.*, 2011). Aussi, les cellules Treg possèdent une activité cytotoxique en produisant des perforines/granzymes, provoquant ainsi la lyse de plusieurs cellules telles que les lymphocytes B et les monocytes (Zhao et *al.*, 2006; Grossman et *al.*, 2004).

En inhibant les réponses immunitaires à médiation cellulaire, et par conséquent des cellules cytotoxiques nécessaires à l'éradication des cellules tumorales (Nishikawa, 2010), les cellules Treg sont également impliquées dans le développement des infections chroniques et des cancers (Chatila, 2005). Il a été montré également que les lymphocytes Treg sont impliqués dans la prévention des maladies auto-immunes (Okubo et *al.*, 2016 ; Miyara et *al.*, 2014), des réponses inflammatoires, ainsi que dans les rejets des greffes (Schmidt et *al.*, 2012).

1.2.3. Déséquilibre des balances immunologiques au cours du diabète du type 1

Pour que l'organisme puisse répondre de manière adaptée aux différentes situations auxquelles il est confronté, il est capital de maintenir le meilleur équilibre possible des balances immunitaires, notamment les balances Th1/Th2 et Th17/Treg.

1.2.3.1. Déséquilibre de la balance Th1/Th2

Un déséquilibre de la balance Th1/Th2 dû à un dysfonctionnement immunitaire, provoqué par différents facteurs physiques et chimiques (Thorvaldson et *al.*, 2005), est souvent lié au déclenchement de plusieurs pathologies. Les maladies allergiques figurent parmi les problèmes majeurs actuels de santé publique. Elles sont souvent associées à un déséquilibre de la balance immunitaire Th1/Th2 en faveur de Th2. Lors des maladies auto-immunes, l'équilibre de cette balance est fréquemment rompu en faveur de Th1.

Fait intéressant, l'un des mécanismes impliqués dans la pathogenèse du DT1 est la perte d'équilibre de la balance Th1/Th2. Divers arguments plaident pour l'implication d'une réponse immunitaire exacerbée de type Th1 (Walker et Herrath, 2016 ; Yoon et Jun, 2005 ; Overbergh et *al.*, 2000). Alors, les cytokines de type Th2 semblent avoir un effet plutôt protecteur contre la destruction des cellules β (Ko et *al.*, 2001; Suarez-Pinzon et Rabinovitch, 2001). Healey et son équipe (1995), ont montré qu'un transfert de cellules Th chez la souris NOD induit une péri-insulite non destructrice lorsqu'elles sont de type Th2 et une insulite destructrice lorsqu'elles sont de type Th1. De ce fait, la modulation des réponses Th, en régulant particulièrement les cytokines Th1 tout en favorisant le développement de cellules Th2, est un point clé dans la modulation de la réponse auto-immune au cours du DT1.

1.2.3.2. Déséquilibre de la balance Th17/Treg

Un déséquilibre de la balance Th17/Treg, en faveur de Th17, a été observé au cours de plusieurs pathologies auto-immunes. Cependant, la découverte de l'IL-23, principale cytokine régulant positivement le profil Th17, est une molécule qui partage la p40 comme sous unité avec l'IL-12, ce qui a remis en question l'implication de l'IL-12, et par extrapolation Th1, dans certaines maladies. Il s'est avéré que l'action proinflammatoire qui leur avait été attribuée pouvait être celle des Th17. En effet, les cellules Th17 ont été récemment impliquées dans l'immunopathogénie de certaines formes d'auto-immunité que l'on croyait être Th1, telle que

Chapitre 1. Revue de la littérature

la sclérose en plaques et son modèle murin, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Cua et *al.*, 2003). Les cellules Th17 sont associées au développement d'autres pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (Miossec, 2009), le lupus érythémateux systémique (Eisenstein et Williams, 2009), et le DT1 chez l'homme, comme chez la souris NOD et le rat BB (Yangyang et *al.*, 2015 ; Honkanen et *al.*, 2010; Van den Brandt et *al.*, 2010).

Des faibles taux des cellules Treg, notamment les nTreg, ont été révélés chez la souris NOD et chez les patients atteints du DT1 (Aribi, 2011). La régulation de la balance Th17/Treg en faveur des cellules Treg joue un rôle important dans la protection/prévention de la maladie. En effet ; Il a été suggéré que le processus inflammatoire au niveau des cellules β pancréatiques induit par un infiltrat lymphocytaire peut être réduit en inhibant les cellules Th17, suivi de l'accumulation des lymphocytes Treg aux niveaux des îlots pancréatiques (Honkanen et *al.*, 2010). Il a été récemment suggéré que les cellules Treg pourraient prévenir le développement du DT1 (Okubo et *al.*, 2016).

1.3. Monocytes/macrophages

1.3.1. Origine et différenciation

Les monocytes/macrophages ont pour origine les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes qui se différencient en précurseurs myéloïdes, donnant par la suite les granulocytes et la lignée des monocytes. Une fois ces derniers formés, ils quitteront la moelle osseuse pour aller dans la circulation sanguine (Auffray et *al.*, 2009). Chez l'homme, les monocytes représentent environ 10 % des leucocytes du sang circulant (Auffray et *al.*, 2009). Après un à trois jours, ils traversent par diapédèse la barrière endothéliale et pénètrent les différents tissus de l'organisme où ils se différencient en macrophages (Auffray et *al.*, 2009 ; Wiktor-Jedrzejczak et Gordon, 1996), ou en cellules dendritiques.

Les monocytes/macrophages jouent un rôle clé dans la réponse immune innée et sont considérés comme les principaux acteurs de l'inflammation. En effectuant la phagocytose puis la présentation antigénique, les macrophages interviennent principalement à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, et représentent les cellules effectrices dans l'initiation de la réponse immune innée ; tandis que les monocytes sont considérés comme le réservoir cellulaire. En effet, ils sont les précurseurs des macrophages résidents, retrouvés dans les

différents tissus, et des cellules dendritiques myéloïdes (Gordon et Taylor, 2005) (Figure 1.9).

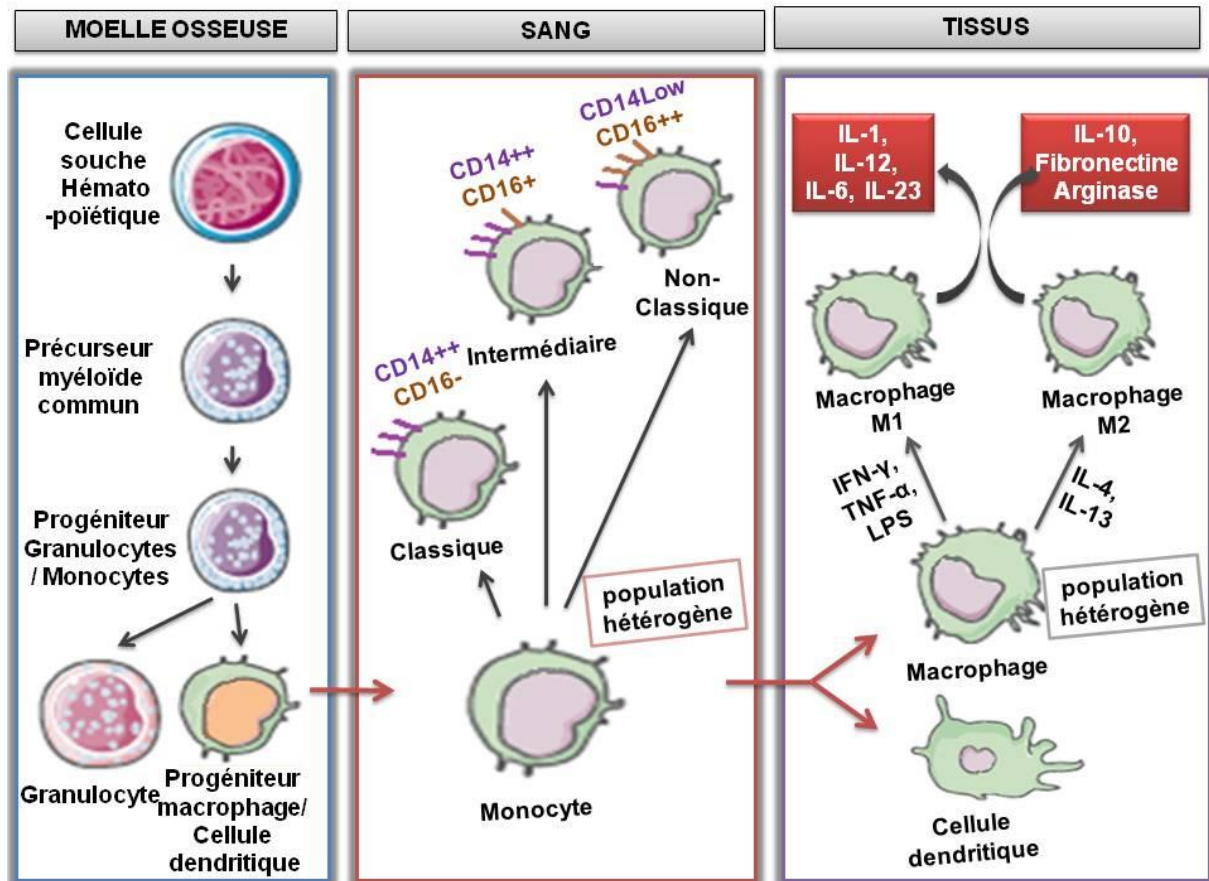


Figure 1.9 Origine, différenciation et hétérogénéité des monocytes-macrophages (Liaskou et al., 2012). Les monocytes dérivent de la moelle osseuse où ils se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques via plusieurs étapes de différenciation. Une fois formés, ces monocytes sont libérés dans la circulation sanguine où ils représentent une population hétérogène dont trois principaux sous-types ont été décrits. Ces monocytes du sang périphérique sont ensuite recrutés dans les tissus où ils se différencient en cellules dendritiques ou en macrophages tissulaires. Deux types de macrophages ont été décrits; les macrophages classiquement activés (M1), qui se développent en réponse au TNF- α , IFN- γ et au LPS, et ils produisent des cytokines pro-inflammatoires, et les macrophages alternativement activés (M2) qui peuvent se développer en réponse à l'IL-4 et l'IL-13 et sont sécrétrices de l'IL-10. IFN: Interferon. IL: Interleukine, LPS: lipopolysaccharides, TNF: Facteur de nécrose tumorale.

1.3.2. Hétérogénéité et fonctions des monocytes

Grace aux nouvelles technologies, les monocytes sont mieux caractérisés et de nouvelles sous-populations ont été mises en évidence. En se basant sur l'expression différentielle des marqueurs de surface CD14 et CD16, trois sous-populations de monocytes circulants humains ont été décrites (Mukherjee et al., 2015).

« **Monocytes classiques** » (CD14⁺⁺ CD16⁻) ; représentent 85 % des monocytes circulants, expriment fortement le récepteur CCR2 et faiblement le récepteur CX3CR1 (Yang et al., 2014 ; Gordon et Taylor, 2005). Aussi, ces cellules expriment de faibles niveaux de molécules de costimulation et des récepteur de type Toll (TLR, *Toll-Like Receptor*), ont une grande capacité phagocytaire et produisent de l'IL-10 et du TNF- α en réponse au Lipopolysaccharide (LPS) (Cros et al, 2010).

Le second sous-ensemble, appelé « **monocytes non-classiques** » (CD14⁺ CD16⁺⁺), représentent 10 % des monocytes circulants (Wong et al., 2012). Contrairement aux précédentes cellules (CD14⁺⁺ CD16⁻), ces monocytes expriment faiblement le récepteur CCR2, fortement le récepteur CXCR1 (Yang et al., 2014), et les molécules CD80 et CD86 (Mukherjee et al., 2015). En réponse au LPS, ces cellules produisent des cytokines en faibles quantités, comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8, et l'IL-6 (Wong et al., 2012).

Enfin, le troisième sous-type « **monocytes intermédiaires** » (CD14⁺⁺ CD16⁺), représentent 5 % des monocytes circulants. Ces cellules expriment les récepteurs CCR2 et CCR5. Ce dernier est le récepteur pour la protéine *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α), et au CCL5 (appelé également RANTES, *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*). Ces monocytes expriment fortement le CD80, le CD86 et HLA-DR et sont, par conséquent, dotés de fonctions inflammatoires et sont fortement impliqués dans la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T (Wong et al., 2012). Suite à une stimulation par le LPS, ces monocytes sécrètent de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-6 (Rossol et al., 2012).

1.3.3. Hétérogénéité et fonctions des macrophages

Les macrophages jouent un rôle clé dans le système immunitaire, à la fois en tant que cellules effectrices et antimicrobiennes, mais aussi comme des cellules immuno-régulatrices, qui induisent, suppriment et modulent les réponses immunitaires adaptatives (Rath et al., 2014). L'environnement cytokinique, produit par les lymphocytes T lors d'une réponse immune acquise, a pour conséquence la polarisation des macrophages en phénotypes M1 et M2, reflétant respectivement les phénotypes Th1 et Th2.

Les macrophages M1, dont leur activation est définie comme une activation classique, sont induits principalement par les cytokines de type Th1, essentiellement l'IFN- γ , et d'autres cytokines et facteurs de croissance comme le GM-CSF et le TNF- α , ainsi qu'en réponse à un stimulus microbien, tel que le LPS (Mosser et Edwards, 2008). Au niveau de ces

Chapitre 1. Revue de la littérature

macrophages, l'IFN- γ active principalement le STAT1, en agissant principalement *via* la voie Jak-STAT (*Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*). Pour une meilleure activation classique des macrophages, l'IFN- γ agit en synergie avec des ligands activateurs comme les ligands des TLRs.

Les macrophages M2, dont l'activation est définie comme une activation alternative, sont induits par les cytokines de type Th2 (Gordon et Taylor, 2005), et sont considérés comme des macrophages de réparation nécessaires au retour de l'homéostasie tissulaire, mais aussi comme des cellules anti-inflammatoires, des « extincteurs » de l'activation M1 (Mosser et Edwards, 2008). Cependant, en fonction des signaux inducteurs, trois différents profils d'activation de M2 ont été décrits ; les macrophages M2a qui sont induits par l'IL-4 ou l'IL-13, les M2b induits par les complexes immuns et par des ligands des TLRs, et les M2c polarisés par l'IL-10 (Mantovani et *al.*, 2004). Ces macrophages alternativement activés sont impliqués dans l'activation des lymphocytes Th2 et principalement dans les mécanismes d'immunorégulation (Mantovani et *al.*, 2004).

Les principaux caractéristiques des macrophages M1 et M2 sont décrits dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1. Caractéristiques des macrophages M1 et M2 (Isidro et Appleyard, 2016)

	Macrophage M1	Macrophage M2
Stimuli	IFN- γ , LPS, IFN- γ + LPS	IL-4, IL-13, IL-10
Phénotype	Proinflammatoire	Anti-inflammatoire
Produits/ Marqueurs	IFN- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, CXCL10, STAT1-p	IL-10, TGF- β , CCL17, CCL22, CD136, CD206, STAT3/6-p
Activité phagocytaire	Forte	Faible
Présentation antigénique	Forte	Faible
Métabolisme de l'arginine	iNOS (ou NOS2): Arginine \rightarrow NO	Arginase: Arginine \rightarrow Ornithine
Activité antibactérienne	Forte	Faible

1.3.4. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique (NO), est une molécule de signalisation générée à partir de la L-Arginine, acide aminé semi-essentiel, et d'oxygène moléculaire (O₂) par une enzyme appelée ; la NO Synthase (NOS) (Alderton et *al.*, 2001).

Au cours de la réaction enzymatique (figure 1.10), dans laquelle la L-arginine est utilisée comme substrat, l'enzyme utilise du NAD(P)H (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), la FMN (Flavine MonoNucléotide), la BH4 (tétrahydrobioptérine), et de l'O₂ comme cofacteurs.

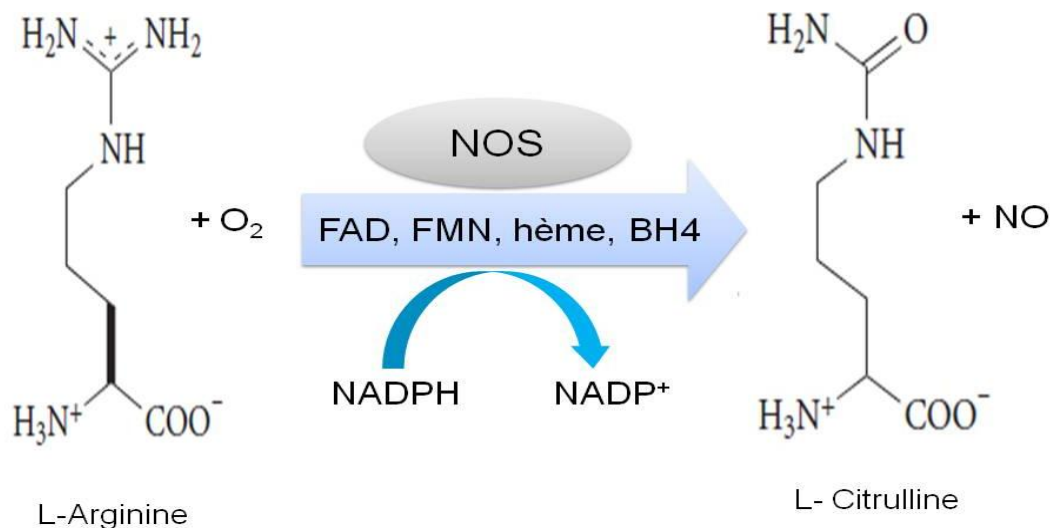


Figure 1.10. La voie métabolique conduisant à la formation du monoxyde d'azote (Calabrese et *al.*, 2007). En présence de l'oxygène, NADPH et les cofacteurs (FMN, FAD, BH4 et l'hème), la NO synthase oxyde la L-arginine en citrulline et NO. BH4: Tetrahydrobiopterin, FAD: Flavin adenine dinucleotide, FMN: Flavin mononucleotide, NADP: Nicotinamide-adenine- dinucleotide phosphate, NO: nitric oxide, NOS: nitric oxide synthase.

L'enzyme NO synthase (NOS, *nitric oxide synthase*) est une protéine homodimérique, chaque monomère constitué de deux domaines: **N-terminal**, d'activité oxygénase, est le site de liaison de BH4 et de l'hème, et le domaine **C-terminal** portant une activité réductase, site de liaison du FMN, FAD, et du NADPH (Alderton et *al.*, 2001). Les deux domaines sont reliés par un site central qui lie la calmoduline et stabilisés par un pont qui contient un atome de zinc (Crane et *al.*, 1999) (Figure 1. 11).

Trois isoformes de NOS existent:

La nNOS, la NO Synthase neuronale, ou NOS1, mise en évidence dans les neurones en 1990 par Bredt et Snyder (Bredt et Snyder, 1990), Le NO, appelé autrement EDRF

Chapitre 1. Revue de la littérature

(*Endothelium-derived relaxing factor*) (Toda et Okamura, 1990), produit par cette enzyme agit comme un neurotransmetteur et assure principalement la vasodilatation, et est un médiateur de la relaxation du muscle lisse bronchique (Duncan et Heales, 2005 ; Belvisi et *al.*, 1992).

L'**iNOS**, la NO Synthase inductible, ou NOS2, isolée pour la première fois dans les macrophages stimulés par le LPS et l'IFN- γ (Xie et *al.*, 1992). L'augmentation de son expression est favorisée principalement par des cytokines proinflammatoires, alors que d'autres cytokines, par exemple IL-4, IL-10, et le TGF- β , inhibent la transcription du gène iNOS (Modolell et *al.*, 1995). La voie NF- κ B et la voie JAK/STAT sont les principales voies qui mènent à l'induction de l'ARNm (acide ribonucléique messenger) de l'iNOS (Rao, 2000). En effet, l'IFN- γ par exemple, active la voie JAK/STAT qui mène à la synthèse du facteur de transcription *interferon response factor* (IRF-1) stimulant à son tour la transcription de l'iNOS. Cette enzyme peut aussi être induite dans plusieurs tissus, tels le tissu adipeux et le muscle (Rao, 2000 ; Kapur et *al.*, 1997).

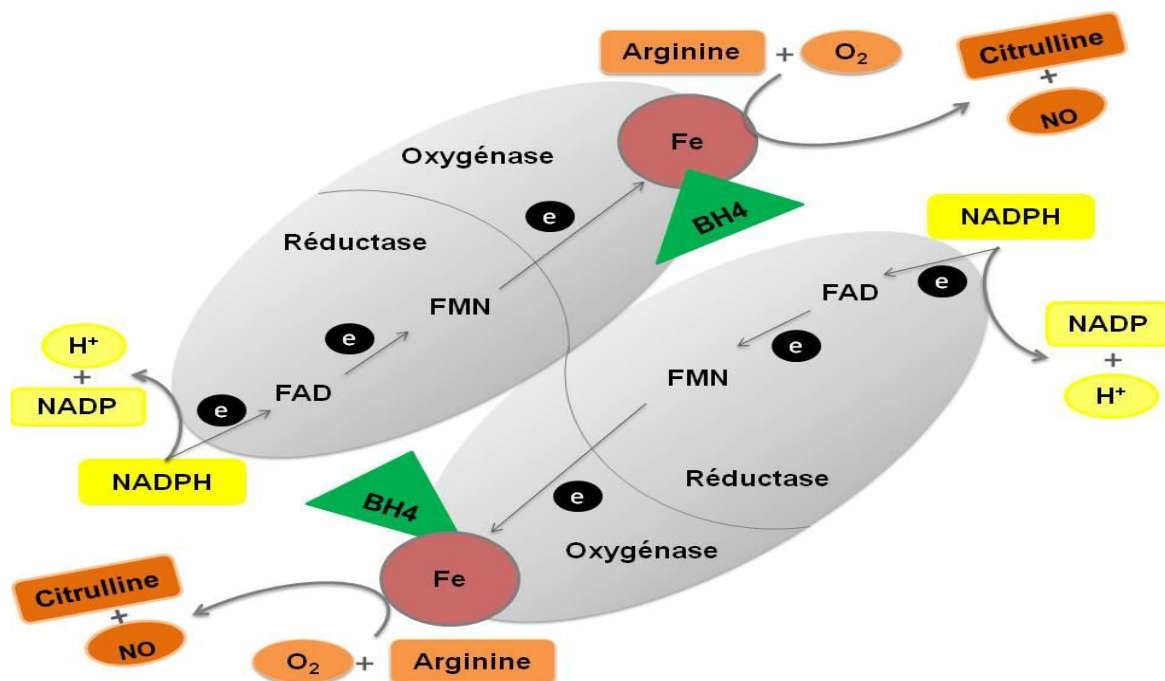


Figure 1.11. Structure moléculaire de la NO Synthase (Gielis et *al.*, 2011). BH4: tetrahydrobiopterin, FAD: flavin adenine dinucleotide, FMN: flavin mononucleotide, H: hydrogène, NADP: nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate, NO: Nitric oxide, NOS: Nitric oxide synthase.

Le NO est généré par l'iNOS en fortes concentrations au niveau des cellules inflammatoires, principalement les macrophages, en réponse à des cellules tumorales ou à des pathogènes,

Chapitre 1. Revue de la littérature

et agit comme une molécule cytotoxique sur les microorganismes, assurant une protection contre les infections, essentiellement parasitaires (Ascenzi et *al.*, 2003). Le NO peut toutefois aussi favoriser le développement de plusieurs maladies comme certaines formes d'inflammations. En effet, l'expression de l'iNOS était décrite dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes, comme au niveau des macrophages au cours de la sclérose multiple (DeGroot et *al.*, 1997), ainsi qu'au cours de la maladie de Crohn (Singer et *al.*, 1996).

La eNOS, la NO Synthase endothéliale, ou NOS3, identifiée au niveau des cellules endothéliales vasculaires (Kobzik et *al.*, 1994). Le NO produit par l'eNOS exerce ses fonctions au niveau du système vasculaire (Waldman et Murad, 1988), inhibe l'agrégation ainsi que l'adhésion des plaquettes et réduit l'adhérence des leucocytes à l'endothélium (Viaro et *al.*, 2000).

Du fait de leurs expression principalement à l'état de base de la cellule, la NOS1 et la NOS3 sont regroupées dans un seul groupe, sous le terme de NOS constitutives (cNOS), et produisent un faible taux de NO. Cependant, l'expression de l'iNOS est induite en réponse à des stimuli inflammatoires, générant une grande quantité de NO (Haviarová et *al.*, 2011).

Néanmoins, il a été montré que les trois isoformes de NOS peuvent être exprimés par les cellules des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire (Ricciardolo et *al.*, 2004). Donc, afin d'éviter toute confusion, il est préférable de classer les NOS en NOS1, NOS2 et NOS3.

1.3.5. La balance iNOS/ arginase

L'utilisation de la L-arginine est le résultat d'une compétition entre les NOS et un autre système enzymatique: les arginases. En effet, la L-arginine peut également être métabolisée par les arginases en urée et L-ornithine, précurseur des polyamines et de la proline qui favorisent la prolifération et la réparation tissulaire (Morris, 2002).

L'utilisation de la L-arginine comme substrat commun par l'une ou l'autre aura des effets différents voire opposés. L'expression de l'iNOS est contrôlée par la disponibilité de l'arginine (Lee et *al.*, 2003), qui peut être limitée par l'arginase, régulant ainsi la synthèse du NO. En effet, suite à l'induction de l'arginase au niveau du macrophage par l'IL-4 et l'IL-13, la production du NO diminue (El-Gayar et *al.*, 2003 ; Rutschman et *al.*, 2001). De même,

l'activité des NOS peut être inhibée par les polyamines produits par les arginases (Szabo et al., 1994).

Il est bien établi aujourd'hui que le métabolisme de la L-arginine joue un rôle capital dans la polarisation des macrophages M1/M2. En effet, les macrophages M1 expriment l'iNOS, tandis que les macrophages M2 sont caractérisés par l'expression de l'arginase (Isidro et Appleyard, 2016). Au niveau du macrophage, en réponse au stimuli microbien *via* le TLR et au cytokines de type Th1, l'expression de l'iNOS est induite, favorisant la polarisation du macrophage vers un profil M1 (Ochoa et al., 2001 ; Rutschman et al., 2001). Cependant, le profil M2 est favorisé suite à l'induction de l'expression de l'arginase par les cytokines de type Th2, (Rath et al., 2014 ; Mosser et Edwards, 2008 ; Ochoa et al., 2001) (Figure 1.12).

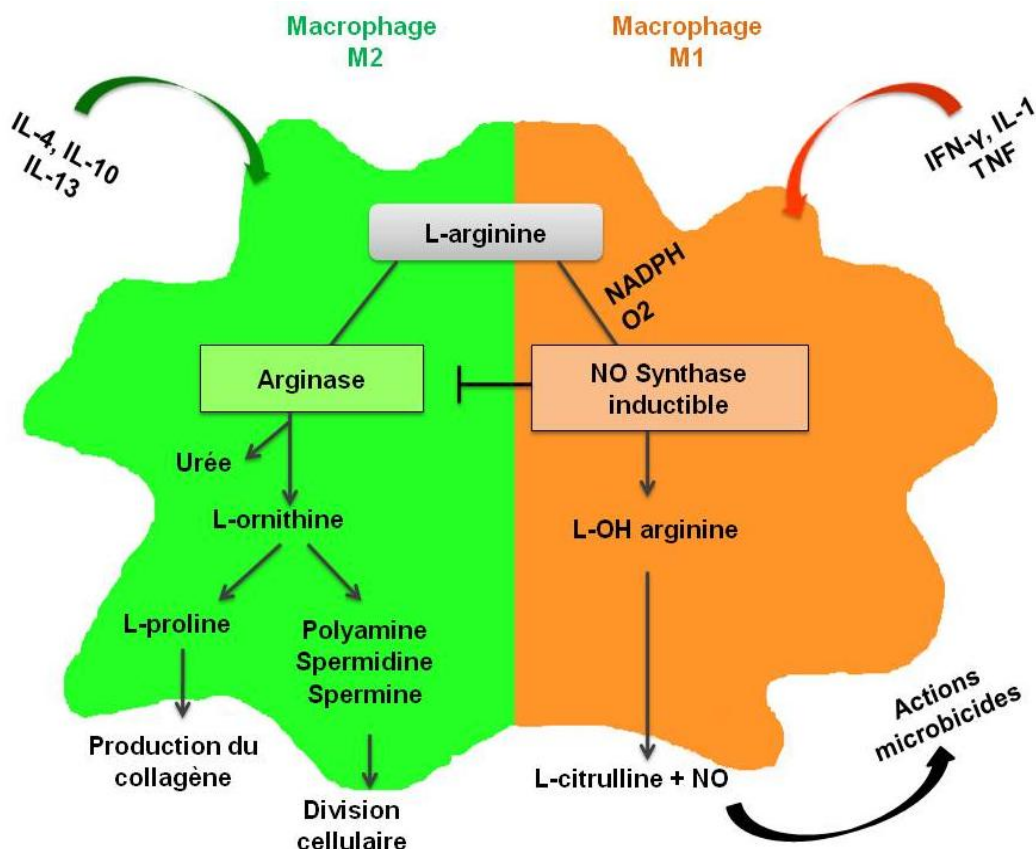
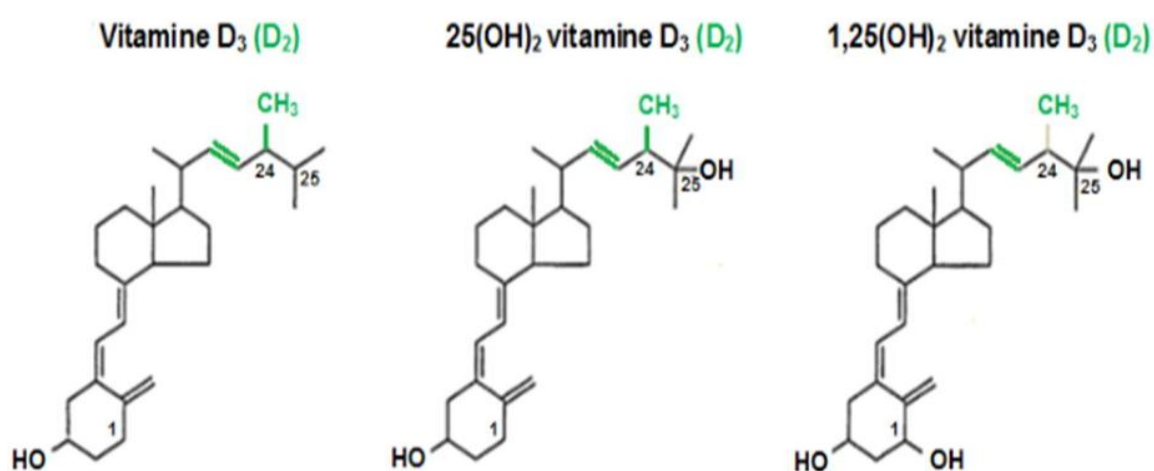


Figure 1.12. Le catabolisme de la L-arginine au niveau des macrophages M1 et M2 (Muraille et al., 2014 ; Gordon, 2003). L'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 stimulent la division cellulaire et la synthèse du collagène suite à la conversion de la L-arginine en L-ornithine par l'arginase. Cependant, l'IFN- γ augmente l'activité de la NOS inducible favorisant la production du NO et par conséquent inhibe l'expression de l'arginase. IFN: Interféron, IL: interleukine, M1: Macrophage classiquement activé/proinflammatoire, M2: Macrophage alternativement activé/réparateur, NADP: Nicotinamide-Adénine- Dinucléotide Phosphate, NO: Nitric oxide, TNF: Facteur de Nécrose Tumorale.

1.4. Vitamine D

1.4.1. Structure, origine et synthèse de la vitamine D

La vitamine D, identifiée pour la première fois en 1922 par McCollum et *al.* (1922), comme une substance préventive du rachitisme, est une hormone liposoluble avec une structure moléculaire de stéroïde. Elle existe sous diverses formes différant entre elles par le degré d'hydroxylation (Yamshchikov et *al.*, 2009) (Figure 1.13).



La vitamine D peut être soit d'origine exogène, soit d'origine endogène.

La vitamine D exogène est représentée par les sources alimentaires sous deux formes :

La vitamine D₂, ou ergocalciférol, d'origine végétale qui provient de l'irradiation par les rayons UVB d'un précurseur l'ergostérol. Elle est présente principalement dans les champignons.

La vitamine D₃, ou cholécalciférol, d'origine animale, qui est retrouvée essentiellement dans les poissons gras, les produits laitiers, et le jaune d'œuf (Holick, 2007).

Le tableau 1.2 représente les aliments qui sont considérés comme une source de la vitamine D.

Tableau 1.2. Les principales sources alimentaires de la vitamine D (1 µg = 40 UI) (Souberbielle, 2013).

Vitamine D	Aliments	Quantité
Vitamine D ₂	Les champignons	20-25 µg (800-1000 UI) pour 100 g
Vitamine D ₃	Huile de foie de morue	500 µg (20000 UI) pour 100 mL
	Saumon d'élevage	7-10 µg (280-400 UI) pour 100 g
	Sardines à l'huile	7,5 µg (300 UI) pour 100 g
	Huîtres	10 µg (400 UI) pour 100 g
	Truite	5 µg (200 UI) pour 100 g
	Sole	2 µg (80 UI) pour 100 g
	Jaune d'œuf	2-3 µg (80-120 UI) pour 100 g
	Foie de veau	0,5 µg (20 UI) pour 100 g
	Laitages ou céréales enrichis en vitamine D	1,25 µg (50 UI) pour 100 mL ou 100 g

La vitamine D endogène est contrairement aux autres vitamines, la principale source de vitamine D non alimentaire, dont la synthèse cutanée est considérée comme la source la plus essentielle. La vitamine D₃ est synthétisée par la couche profonde de l'épiderme à partir d'un précurseur, le 7-déshydrocholestérol, qui, sous l'action des rayons UVB de basse longueur d'onde comprise entre 290 et 315 nm, permet la synthèse de la pré-vitamine D qui s'isomérisent ensuite spontanément en vitamine D₃ (Cholécalciférol) (Holick, 2006 ; Lips, 2006). Cependant, une multitude de facteurs influent sur le processus de production endogène de la vitamine D, tels que la pigmentation de la peau, l'utilisation d'écran solaire (Webb, 2006 ; Holick, 1994), la saison, les protections vestimentaires (Wagner *et al.*, 2008), et l'âge. Il a été rapporté que la concentration cutanée en 7-déshydrocholestérol diminue avec l'âge, et qu'une personne âgée de 20 ans synthétise 4 fois plus de vitamine D à travers l'épiderme qu'une personne de 70 ans (Holick, 2006).

1.4.2. Métabolisme de la vitamine D

Afin que la vitamine D devienne pleinement active, elle doit subir deux transformations. Une fois au niveau sanguin, la vitamine D apportée par l'alimentation (vitamine D₂ ou D₃) après

Chapitre 1. Revue de la littérature

son absorption par l'intestin grêle ou produite par la peau (vitamine D₃), est transportée par une protéine porteuse appelée DBP (*vitamin D-binding protein*), une α 2-globuline synthétisée par le foie (Speeckaert, et *al.*, 2006), puis captée au niveau hépatique pour y subir une hydroxylation sur le carbone 25 par l'enzyme 25-hydroxylase, appelée également le CYP2R1 (Bouillon et *al.*, 2008), aboutissant à la formation de la 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D) ou calcidiol, ayant une demi-vie de l'ordre de deux à quatre semaines, et dont la concentration sérique représente le statut vitaminique D d'un individu (Souberbielle et *al.*, 2008). Sous l'action de la 1 α -hydroxylase (1 α -OHase), enzyme située dans la membrane interne des mitochondries et qui appartient à la famille des cytochromes P450, également appelée cytochrome P450 27B1 ou CYP27B1 (Schuster, 2011), la 25(OH)D est de nouveau hydroxylée en position 1, classiquement dans les cellules du tubule proximal rénal, formant ainsi le métabolite actif de la vitamine D, appelé calcitriol ou 1,25 dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D) avec une courte demi-vie d'environ quatre heures (Lips, 2006) (Figure 1. 14).

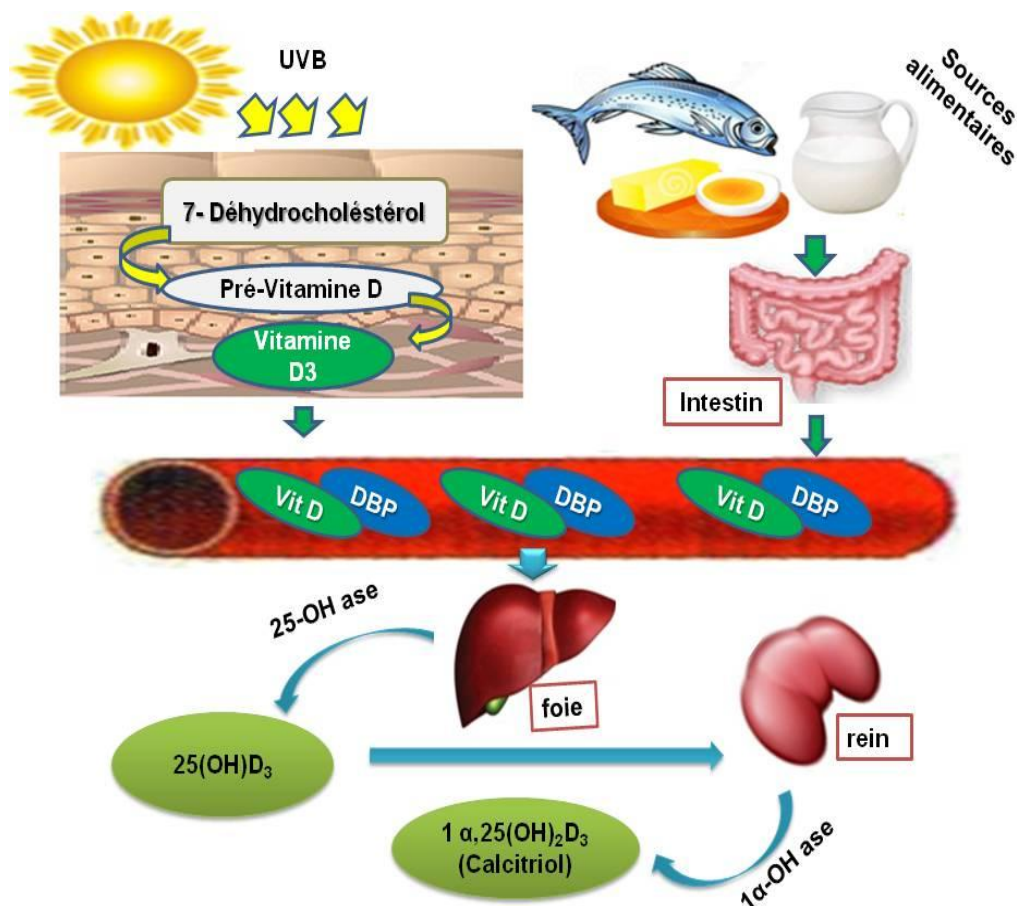


Figure 1.14. Métabolisme de la vitamine D (Deeb et *al.*, 2007). 1 α -OHase: 1 alpha hydroxylase, 25-OHase: 25-hydroxylase, DBP: Vitamin D binding protein, Vit D: Vitamine D, UVB: Ultra-Violet B.

1.4.3. Régulation du métabolisme de la vitamine D

Il existe des mécanismes protecteurs vis-à-vis d'une production excessive de la vitamine D. En effet, contrairement à l'hydroxylation hépatique, qui est très peu régulée, l'hydroxylation rénale est un processus strictement contrôlé par les hormones du métabolisme phosphocalcique. La stimulation de la 1 α -hydroxylase est essentiellement assurée par l'hormone parathyroïdienne ou parathormone (PTH, *Parathyroid hormone*) libérée par les glandes parathyroïdes lors d'une hypocalcémie, suite à une faible concentration sanguine en ions calciques (Ca_2^+) et phosphates (PO_4^{3-}) (Souberbielle et al., 2008 ; Holick, 2006). En revanche, le facteur de croissance du fibroblaste 23 (FGF23, *fibroblast growth factor 23*), induit une inhibition de la 1 α -hydroxylase et de l'expression de la PTH (Armbrecht et al., 2003).

Il existe aussi un rétrocontrôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur sa propre synthèse et son catabolisme. En effet, la 24-hydroxylase (CYP24A1) est une enzyme impliquée dans le catabolisme du $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Elle convertit la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, de même que la $25(\text{OH})_2\text{D}_3$, en composé inactif, qui sera excrété ensuite par la bile (Holick, 2007). Cette enzyme est stimulée par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en excès, et est capable d'inhiber la production de la PTH (Levy-Weil, 2010). Par conséquent, la concentration circulante en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dépend de l'importance de son catabolisme. Des taux sériques très élevés de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ étaient révélés chez des souris dépourvues du gène codant pour la CYP24A1 (Masuda et al., 2005). Selon l'équipe de Holick (2007), une hypercalcémie néonatale sévère était provoquée suite à des mutations inactivatrices du gène codant pour l'enzyme CYP24A1.

1.4.4. Mode d'action de la vitamine D

Le calcitriol, après être transporté *via* la circulation sanguine jusqu'aux tissus cibles où il se lie à un récepteur cytosolique appelé VDR (*vitamin D receptor*), qui représente l'un des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires des stéroïdes (Schoindre et al., 2012a). L'association au VDR assure ses fonctions biologiques par une régulation transcriptionnelle directe des gènes cibles. En effet, le complexe calcitriol-VDR se dirige vers le noyau de la cellule, où il se fixe à une autre protéine, le récepteur RXR, formant un complexe (RXR-VDR- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) qui se lie ensuite à des sites spécifiques sur l'ADN (acide désoxyribonucléique), appelés éléments de réponse à la vitamine D (VDRE, *vitamin D response element*), régulant ainsi la transcription des gènes cibles (Zhang et al., 2012).

1.4.5. Fonctions biologiques de la vitamine D

Le calcitriol exerce plusieurs fonctions biologiques; principalement, le maintien d'homéostasie phosphocalcique qui est considéré comme effet classique nécessaire pour une minéralisation osseuse adéquate. Il exerce aussi d'autres fonctions non classiques, notamment la modulation des réponses immunes.

1.4.5.1. Fonctions classiques de la vitamine D

Une coordination de différents tissus et organes, à savoir l'intestin (site d'absorption), l'os (site de stockage) et le rein (site de sécrétion), est essentielle pour avoir une normocalcémie et une normophosphatémie capables de maintenir certaines fonctions physiologiques (Lieben et al., 2011).

Au niveau intestinal, la vitamine D induit la synthèse de plusieurs protéines impliquées dans l'absorption du calcium telles que la protéine TRPV6 (*transient receptor potential cation channel, family V, member 6*), qui crée un canal calcique au niveau de la bordure en brosse apicale de l'entérocyte, permettant l'entrée du calcium dans la cellule (Hoenderop et al., 2005), et la calbindine qui transporte le calcium dans la cellule intestinale (Hoenderop et al., 2005). En parallèle, l'entrée des phosphates dans l'entérocyte est favorisée suite à l'induction de la production de la protéine NPT2b (*type II sodium-dependent phosphate transporter*), un co-transporteur sodium-phosphate, par la vitamine D (White et al., 1998).

Au niveau osseux, le calcitriol active la résorption osseuse en cas d'une baisse du taux du calcium et du phosphate dans le sang (Lieben et al., 2011). Au niveau des ostéoblastes, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorise la surexpression d'une molécule stimulatrice de la résorption osseuse par les ostéoclastes appelée RANKL (*receptor activator of nuclear factor κB Ligand*) (Jurutka et al., 2007). La fixation de ce dernier à son récepteur, exprimé par les pré-ostéoclastes, entrainera la transformation du pré-ostéoclaste en ostéoclaste, favorisant la libération du calcium et du phosphate (Khosla, 2001).

Au niveau rénal, à côté de son effet dans le rétrocontrôle négatif sur sa propre production et l'accélération de son catabolisme, le calcitriol augmente la réabsorption du calcium dans le tube contourné distal et du tubule connecteur en augmentant l'expression de la protéine TRPV5 (*Transient Receptor Potential channel Vanilloid subtype 5*), qui est indispensable à la réabsorption du calcium (Van de Graaf et al., 2006 ; Dusso et al., 2005).

1.4.5.2. Fonctions non classiques de la vitamine D

Parallèlement à son rôle bien établi dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique, la vitamine D a d'autres fonctions physiologiques. Elle est essentiellement impliquée dans le contrôle de la différenciation de nombreux types cellulaires (Van Etten et Mathieu, 2005), l'apoptose, l'angiogénèse et l'immunomodulation (Adams et Hewison, 2010 ; Holick et Garabedian, 2006). La vitamine D peut agir sur toute une série de tissus, non impliqués dans l'homéostasie du calcium, qui expriment le VDR. Aussi, une production extra-rénale de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ par la 1 α -hydroxylase, susceptible d'agir de manière autocrine et paracrine (Holick, 2007), était décrite au niveau de plusieurs types de cellules principalement les ostéoblastes, les cellules placentaires et les macrophages (Holick et Garabedian, 2006).

Le tableau 1.3 présente l'expression tissulaire du VDR et de la 1 α -hydroxylase.

Tableau 1.3. Expression du récepteur de la vitamine D (VDR) et de la 1 α -hydroxylase aux niveaux des organes, des tissus et des cellules (Lorenc et *al.*, 2012).

Expression du VDR		
Tissus adipeux	Gros intestin	Cerveau
Tissus osseux	Peau	Glande pituitaire
Tissus cartilagineux	Cellules β pancréatiques	Glande parathyroïde
Muscle cardiaque	Rein	Thymus
Intestin grêle	Foie fœtale	Glande thyroïde
Estomac	Poumon	Glande mammaire
Placenta	Rétine	Ostéoblastes
Utérus	Moelle osseuse	Lymphocytes T et B
Expression de la 1 α-hydroxylase		
Gros Intestin	Cellule dendritique	Cellule endothéliale
Cerveau	Glande mammaire	Glande parathyroïde
Placenta	Prostate	Kératinocytes
îlots pancréatiques	Macrophages	

1.4.6. Vitamine D et système immunitaire

Plusieurs données plaident en faveur de l'implication de la vitamine D dans la modulation des deux composantes qui revêtent les défenses immunitaires: l'immunité innée et l'immunité adaptative. Quasiment toutes les cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺, les neutrophiles, les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques) expriment le VDR. De ce fait, le calcitriol peut agir sur toutes ces cellules.

1.4.6.1. Rôle de la vitamine D dans l'immunité innée

Les principales cellules de l'immunité innée, en particulier les monocytes/macrophages, expriment non seulement le VDR, mais aussi l'enzyme d'hydroxylation nécessaire à l'activation de la vitamine D, la 1 α -hydroxylase, ce qui leur permet d'utiliser directement la vitamine D circulante, qui, ainsi activée, peut induire une réponse antimicrobienne par un mode d'action intracrine ou paracrine. A ce niveau la 1,25(OH)₂D₃ représente un lien essentiel entre l'activation du TLR, exprimé par le macrophage, et la réponse antibactérienne à une infection par l'induction des gènes codant pour des peptides antibactériens, comme les cathelicidines (Adorini et Penna, 2008), et les défensines (Mathieu, 2011) (Figure 1.15).

La vitamine D induit également la différenciation des macrophages, favorise leurs capacités de chimiotactisme et augmente leur capacité phagocytaire (Mathieu, 2011). Aussi, dans les macrophages, l'enzyme iNOS est inhibée par la 1,25 dihydroxyvitamine D₃ entraînant une diminution du NO (Bouvard et *al.*, 2010). Plusieurs études ont rapporté les effets de la vitamine D sur les macrophages, tels que l'activation des gènes des cathelicidines et des défensines lors d'une infection par *Mycobacterium Tuberculosis* (Coussens et *al.*, 2009 ; Yuk et *al.*, 2009).

Par ailleurs, un déficit en vitamine D₃ a été associé, par plusieurs études épidémiologiques, à la fréquence ou à la gravité de certaines infections aiguës, dans lesquelles l'activation de l'immunité innée joue un rôle essentiel. Sadeghi et *al.* (2006), ont rapporté qu'un déficit en vitamine D₃ peut favoriser les infections à *Staphylococcus aureus*. Il est probable que la supplémentation en vitamine D₃ puisse contribuer à réduire les conséquences de l'immunopathologie induite par la persistance d'un agent pathogène.

1.4.6.2. Rôle de la vitamine D dans l'immunité adaptative

Contrairement à son effet sur l'immunité innée, l'action immunomodulatrice de la vitamine D sur les principaux acteurs cellulaires de l'immunité adaptative est globalement suppressive (Figure 1.15).

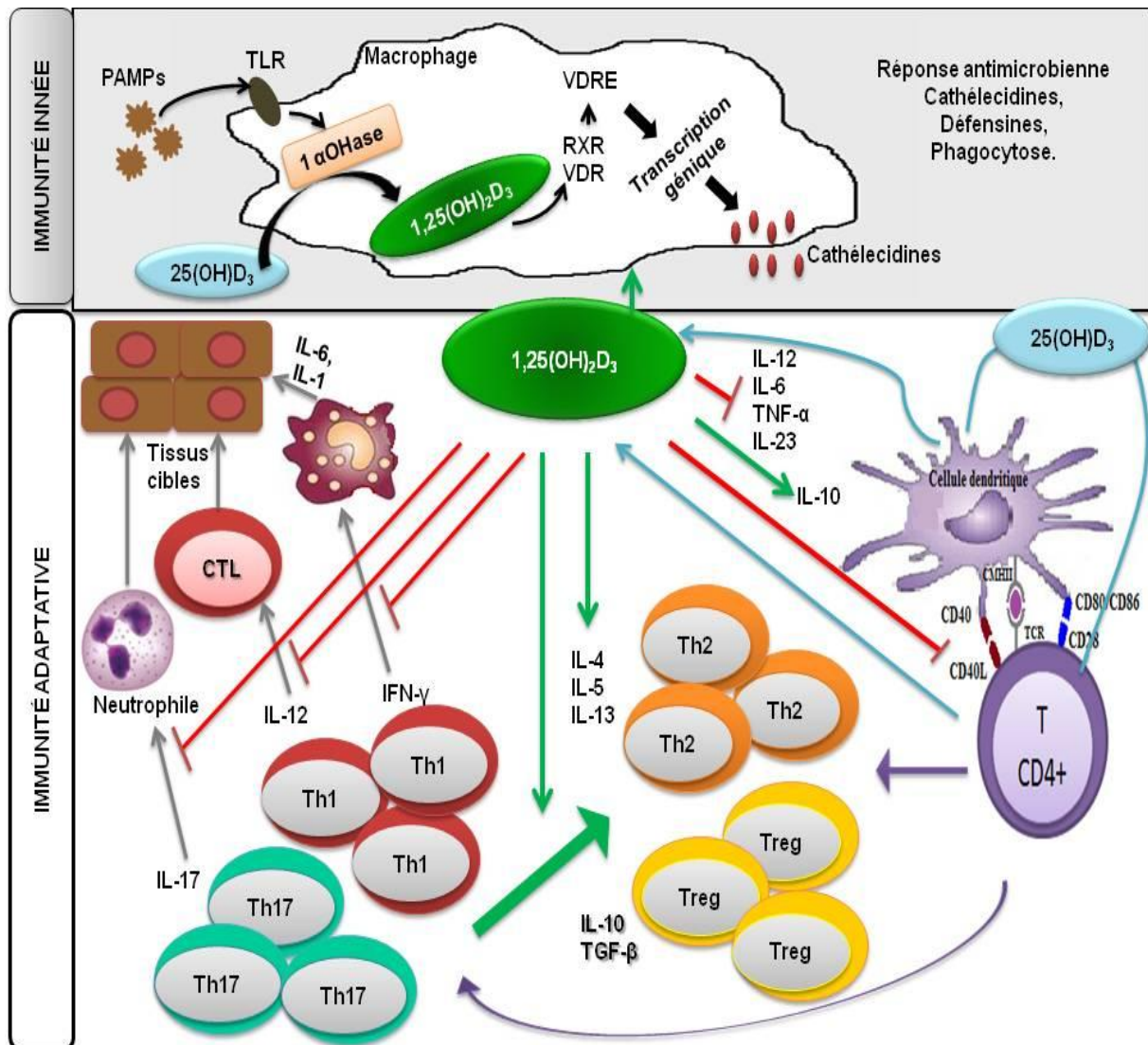


Figure 1.15. Les effets immunomodulateurs de la 1,25(OH)₂D₃ (Mathieu, 2011 ; Schwalfenberg, 2011). La 1,25(OH)₂D₃, d'une part, stimule la réponse immunitaire innée en augmentant l'activité phagocytaire et la production des protéines antimicrobiennes, et, d'autre part, module l'immunité adaptative. La 1,25(OH)₂D₃ inhibe l'expression des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86) et du CMHII à la surface des cellules dendritiques, et inhibe la production des cytokines, telles que l'IL-12. Par conséquent, la 1,25(OH)₂D₃ oriente indirectement la polarisation des LTh vers un profilé anti-inflammatoire Th2/Treg. En outre, la 1,25(OH)₂D₃ peut agir directement sur les LT, en inhibant la production des cytokines Th1 (IL-2 et IFN-γ) et Th17 (IL-17), en stimulant la sécrétion des cytokine Th2 (IL-4) et en favorisant le développement des Treg. 1 αOHase: 1 alpha-hydroxylase, CTL: Lymphocyte T cytotoxique, IFN: Interféron, IL: Interleukine, LTh: Lymphocyte T helper, TNF: facteur de nécrose tumorale, PAMP: Motif moléculaire associé au pathogène, RXR : Récepteur du rétinolde X, TLR: Récepteur de type Toll, Treg : lymphocyte T régulateur, VDR : Récepteur de la vitamine D, VDRE: Élément de réponse à la vitamine D.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les cellules dendritiques sont des cellules cibles clés pour le calcitriol. L'activation intracrine et paracrine de la vitamine D au niveau des cellules dendritiques inhibe leur production de l'IL-12 et de l'IL-23 (Schoindre et *al.*, 2012a), et diminue leurs propriétés fonctionnelles, notamment la présentation antigénique, en inhibant leur maturation et en diminuant l'expression des molécules de costimulation, à savoir le CD80/CD86, ainsi que les molécules du CMH de classe II (Mathieu, 2011; Mora et *al.*, 2008).

Par le biais de son action sur les cellules dendritiques, et/ou par une action directe, le calcitriol joue un rôle dans l'orientation de la réponse lymphocytaire Th en inhibant les réponses Th1 et Th17, tout en favorisant les réponses Th2 et Treg (Lang, 2013) (Figure 1.15). En effet, la 1,25 dihydroxyvitamine D₃ agit directement sur les lymphocytes Th, essentiellement en diminuant leur activation et leur prolifération. Elle induit à la fois une inhibition de la production des cytokines proinflammatoires comme l'IL-12 et l'IFN- γ , cytokines effectrices des réponses Th1, le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-2, de même que celles des réponses Th17, à savoir l'IL-6, l'IL-23, l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22 (Bouvard et *al.*, 2010). Elle induit également une augmentation des taux des cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, cytokines effectrices des réponses Th2, ainsi que l'IL-10 et le TGF- β qui sont considérées principalement comme des cytokines effectrices des réponses Treg (Mathieu, 2011).

Par ailleurs, *via* la modulation des lymphocytes Th, la 1,25(OH)₂D₃ limite l'activation et la prolifération des lymphocytes B au cours de la réponse immune et module la production des anticorps (Lang, 2013). Aussi, il a été suggéré que le calcitriol peut agir directement sur les lymphocytes B, induit leur apoptose et inhibe leur prolifération, la génération des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes, ainsi que la production des immunoglobulines (Chen et *al.*, 2007).

1.4.7. Vitamine D et diabète de type 1

« Le déficit en vitamine D₃ est un facteur de risque dans l'apparition des maladies auto-immunes » ; une hypothèse qui semble être soutenue par la relation entre la vitamine D₃ et les lymphocytes, essentiellement par l'effet inhibiteur de la vitamine D₃ sur la production des cytokines de type Th1/Th17, et plutôt inducteur de celles des Th2/Treg (Cantorna et Waddell, 2014 ; Peelen et *al.*, 2011). En effet, l'implication du déficit en vitamine

Chapitre 1. Revue de la littérature

D₃ dans plusieurs maladies auto-immunes a été largement suspectée, particulièrement celles dont la prévalence suit un gradient nord-sud dans les études épidémiologiques, notamment la sclérose en plaque et le DT1 (Ponsonby et *al.*, 2002).

Des preuves irréfutables provenant de données épidémiologiques, des études *in vitro*, et d'autres réalisées sur le modèle animal, suggèrent une forte association entre la vitamine D₃ et le DT1, telles qu'une faible concentration en 25(OH)D₃ chez des patients atteints du DT1 comparé à des sujets contrôles a été constatée (Li et *al.*, 2014), et l'existence d'une corrélation inverse entre l'incidence du DT1 et le nombre d'heures d'ensoleillement et la température moyenne (Schoindre et *al.*, 2012b). De ce fait, le rôle de la vitamine D dans la prévention et/ou le traitement du diabète auto-immun est de mieux en mieux documenté.

L'effet de la vitamine D₃ sur le développement du DT1 chez les enfants a été étudié. Il a été suggéré que la consommation de la vitamine D₃, en forme d'huile de foie de morue par les femmes pendant la grossesse, était associée à un moindre risque d'apparition du DT1 chez leurs enfants (Stene et *al.*, 2000), ce qui est en concordance avec les résultats de l'équipe de Fronczak (2003), ayant révélé une corrélation entre l'apport alimentaire en vitamine D₃ chez les femmes enceintes avec des faibles concentrations en auto-anticorps anti-îlots chez leurs enfants.

Par ailleurs, Il a été suggéré qu'une supplémentation en vitamine D₃ chez les nourrissons pourrait avoir un effet protecteur du développement du DT1 (Zipitis et Akobeng, 2008). Il a été montré que le risque de développer un DT1 était réduit à 33 % chez les enfants supplémentés en vitamine D₃ comparativement aux enfants non-supplémentés (Danescu et *al.*, 2009). Cet effet réducteur peut être dû aux effets immunomodulateurs de la vitamine D₃ sur le processus auto-immun responsable de la destruction des cellules β pancréatiques (Danescu et *al.*, 2009).

Dans ce contexte, et vu l'expression du VDR et de la 1 α -hydroxylase par les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et par de nombreuses cellules, le calcitriol peut être considéré comme un messager avec différents effets physiologiques sur les cellules immunitaires, et peut avoir donc des effets thérapeutiques et /ou même préventifs de cette maladie auto-immune (Danescu et *al.*, 2009). Nombre de travaux réalisés essentiellement sur le modèle animal ont suggéré que la vitamine D₃ peut moduler la pathogenèse du DT1 (Giulietti et *al.*, 2004 ; Mathieu et *al.*, 1995). A côté des travaux réalisés sur les souris NOD, un modèle animal qui développe spontanément le DT1, ayant constaté

Chapitre 1. Revue de la littérature

qu'une supplémentation par le calcitriol peut significativement réduire l'incidence du DT1 (Mathieu et *al.*, 1994).

L'équipe de Gregori (2002), a montré que le calcitriol peut diminuer la réponse inflammatoire au niveau des îlots pancréatiques. Aussi, d'autres études ont révélé un effet inhibiteur du calcitriol sur la production des agents inflammatoires impliqués dans le mécanisme de destruction des cellules β (Mathieu et Gysemans, 2006). Par conséquent, le mécanisme de protection par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ au cours du DT1 semble être dû à une modulation de la réponse immune qu'il s'agit plus exactement d'une déviation de la réponse immune vers un phénotype anti-inflammatoire (Mathieu et Gysemans, 2006).

1.5. Problématique et objectifs

1.5.1. Problématique

Le diabète de type 1, est une maladie auto-immune dans laquelle les cellules β des îlots de Langerhans sont sélectivement et progressivement détruites par les cellules mononucléées et les lymphocytes T autoréactifs. Il a été démontré que la dérégulation de la balance immunitaire en faveur du profil inflammatoire joue un rôle important dans le processus autodestructif des cellules β pancréatiques. Par ailleurs, il y a eu ces dernières années un effort considérable pour comprendre les rôles possibles de la vitamine D_3 , y compris son rôle dans le système immunitaire et, en particulier, sur les cellules T. En effet, les récepteurs de la vitamine D se trouvent en concentration importante dans les lymphocytes T et les populations des macrophages. Dans cette optique, nous avons évalué le rôle de la vitamine D_3 active ($1,25(OH)_2D_3$) sur les balances immunitaires au début du DT1.

1.5.2. Objectifs

1. Evaluer l'effet de la vitamine D_3 sur les balances; Th1/Th2, Th17/Treg, la production du NO/activité de l'arginase et le niveau d'activation des cellules mononucléées isolées à partir du sang périphérique d'enfants diabétiques de type 1.
2. Etudier l'effet de la vitamine D_3 sur l'activation des voies de signalisation STAT4/Tbet et STAT6/GATA3 au niveau des monocytes au début du DT.

1.5.3. But

Montrer que la vitamine D_3 pourrait avoir un rôle immunomodulateur au début du DT1.

Chapitre 2

La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1, "1,25-dihydroxyvitamin D₃ down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes"

2.1. Matériels et méthodes	52
2.2. Résultats	58
2.3. Discussion	69

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale auprès d'un journal de spécialité avec un comité de lecture spécialisé, *Immunology letters*.

Immunology Letters 179 (2016) 122–130

Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

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

1,25-dihydroxyvitamin D₃ down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes

Lamia Ysmail-Dahlouk, Wafa Nouari, Mourad Aribi*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 April 2016
Received in revised form 30 August 2016
Accepted 2 October 2016
Available online 4 October 2016

Keywords:
1,25(OH)₂D₃
Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines
PBMCs
Monocytes
p-STAT4 and p-STAT6
Type 1 diabetes

ABSTRACT

Background: Type 1 diabetes (T1D) is associated with an imbalance between inflammation and repair. Recently, the biologically active form of vitamin D₃, i.e. 1,25(OH)₂D₃, has been reported to have potent immunomodulatory effects on both innate and adaptive immune cells, as well as on the production of their specific cytokines.

Methods: We examined the effect of 1,25(OH)₂D₃ on the production of proinflammatory Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg related cytokines, as well as on the phosphorylation of monocyte-expressed STAT4 and STAT6 at the recent-onset human T1D.

Results: The levels of IFN- γ , IL-17 and nitric oxide (NO) production were significantly increased in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with T1D compared to controls. Similarly, STAT4 tyrosine phosphorylation (p-STAT4, Tyr693) levels were significantly increased in monocytes from patients when compared to controls. Conversely, the levels of IL-4, IL-10 and p-STAT6 (Tyr641) were significantly decreased in type 1 diabetic patients than in controls. Treatment with 1,25(OH)₂D₃ resulted in significant up-regulation of IL-4, IL-10, arginase activity, and p-STAT6 and, conversely, down-regulation of IFN- γ , IL-17 and NO production levels, as well as p-STAT4. Additionally, 1,25(OH)₂D₃ significantly enhanced Treg-to-Th17 ratio, and induced a significant decrease in Th1-to-Th2, NO production-to-arginase activity and p-STAT4-to-p-STAT6 ratios.

Conclusions: Our study suggests that the biologically active form of vitamin D can reverse the activation of inflammatory pathways at the onset of T1D. Additionally, its immunomodulation properties may vary depending on the overall patterns of cytokines. From a therapeutic point of view, vitamin D may potentially be suggested as an immunological adjuvant and a potential anti-inflammatory agent in individuals at risk of T1D.

© 2016 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Bureau éditorial : <http://www.journals.elsevier.com/immunology-letters/editorial-board>

Editeur en chef : Vito Pistoia.

Abstracting and indexing

1. BIOBASE
2. Chemical Abstracts
3. Current Contents/Life Sciences
4. MEDLINE®
5. EMBASE
6. Pascal et Francis (INST-CNRS)
7. Reference Update
8. Science Citation Index
9. SIIC Data Bases
10. Scopus

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Conception de l'étude

Les expériences ont été réalisées sur des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), des monocytes et des lysats cellulaires. Les PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles ont été isolées à partir du sang périphérique par une centrifugation sur gradient de densité. L'effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des cytokines proinflammatoires Th1-Th17 et des cytokines anti-inflammatoires Th2-Treg, et sur la production du NO ont été évalués dans les surnageants de cultures de PBMCs. Les lysats cellulaires ont été utilisés pour la mesure de l'activité de l'arginase. Les monocytes ont été enrichis à partir des PBMCs par une sélection négative, et ont été utilisés pour évaluer l'effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la phosphorylation des STAT4 et des STAT6 (Figure 2.1).

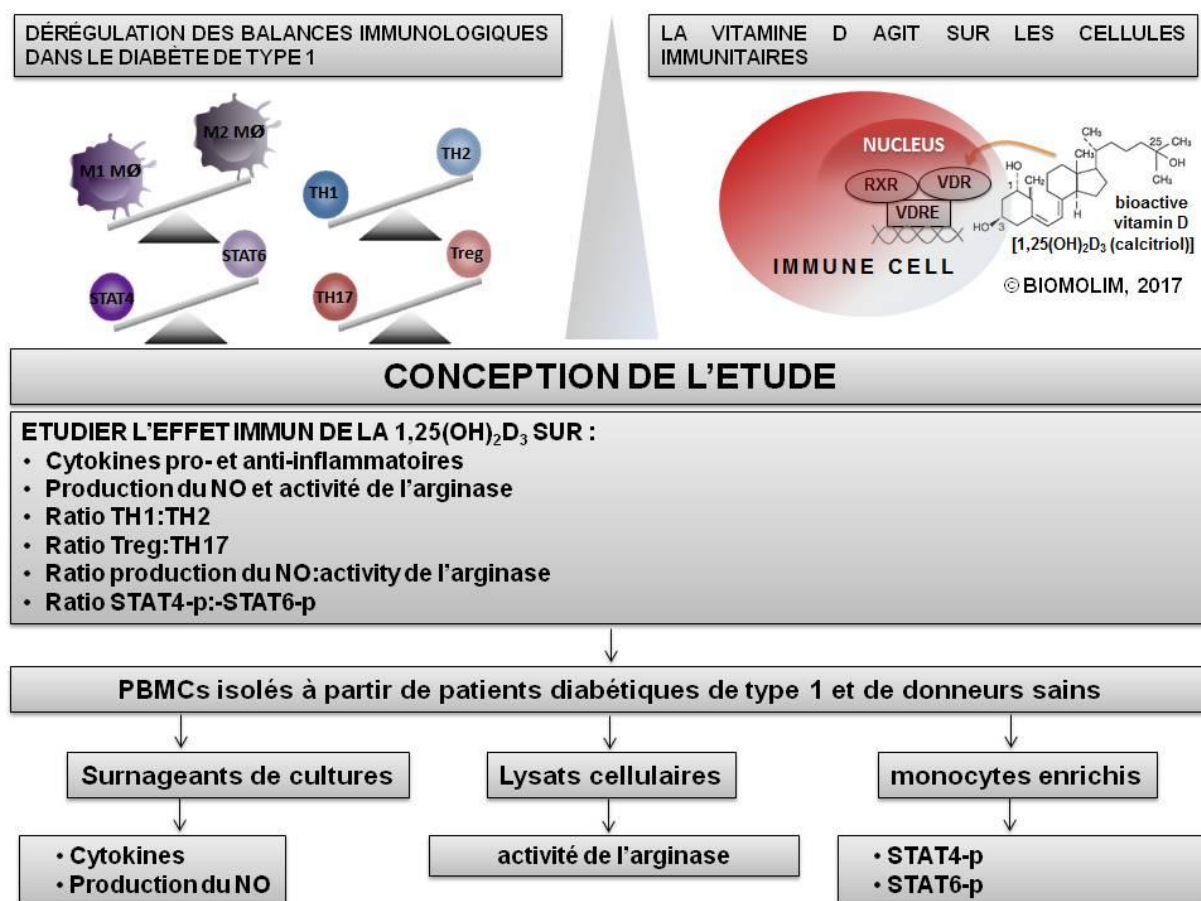


Figure 2.1. Organigramme de l'étude.

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

2.1.2. Echantillons cellulaires

Quatre patients nouvellement diagnostiqués avec un DT1 et quatre témoins sains, appariés en fonction de l'âge, du sexe, et de l'indice de masse corporelle, qui répondaient aux critères d'admissibilité ont été recrutés dans cette étude, selon les règles d'éthique et les bonnes pratiques, conformément aux déclarations d'Helsinki. Ainsi, tous les jeunes adultes, patients et contrôles, ou les parents des enfants recrutés ont signé un consentement éclairé.

Les critères d'inclusion étaient des adolescents atteints du DT1 (l'âge \leq 22 ans) avec une durée de maladie de moins de 18 mois (apparition récente). Les critères d'exclusion ont été essentiellement l'association de la maladie avec d'autres pathologies auto-immunes, l'infection, l'inflammation, et tous les autres facteurs qui pourraient interférer avec le processus inflammatoire comme l'obésité, le tabagisme et la consommation d'alcool. Le tableau 2.1 présente les principales caractéristiques des patients recrutés dans cette étude.

Tableau 2.1. Les principales caractéristiques des sujets volontaires atteints du diabète de type 1

	Genre	Âge (Mois)	Âge du diagnostique (Mois)	Durée du DT1 (Mois)	Indice de masse corporelle (Kg/m ²)
Volontaire 1	Féminin	98	84	14	21,43
Volontaire 2	Masculin	133	117	16	20,18
Volontaire 3	Masculin	155	142	13	21,41
Volontaire 4	Masculin	254	243	11	20,09

Les PBMCs ont été isolées à partir du sang veineux frais des patients diabétiques de type 1 et des sujets sains, récupéré dans des tubes héparinés (BD, Belliver Industrial Estate, UK).

Un diluât a été obtenu en mélangeant un volume égal de sang total (patients et sujets sains) et de milieu de culture RPMI 1640 (Sigma Chemical 16 Co., St. Louis, USA), enrichis par l'addition de 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 50 µg/mL de gentamycine et 10 % du sérum de veau fœtal (SVF). La suspension cellulaire a été déposée sur un

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

demi-volume d'Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA), afin de réaliser une centrifugation sur gradient de densité. Les PBMCs récupérées à l'interface du milieu ficoll ont été lavées deux fois, et la viabilité des cellules a été estimée par la coloration au bleu trypan (TBET, *trypan blue exclusion test*) (Richardson et Fedoroff, 1997).

2.1.3. Mise en culture des PBMCs

Les PBMCs préparées ont été mises en culture, à une concentration égale à 10^6 cellules/mL, dans des microplaques de culture à 96 puits à fond rond en trois à six répétitions. Les PBMCs ont été stimulées par la phytohaemagglutinine (PHA) à raison de 5 $\mu\text{g/mL}$ (Prabhakar et al., 2004), puis incubées en présence et en absence de 10^{-7} M de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) (Jeffery et al., 2009). Après 24 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 , les cellules et les surnageants recueillis ont été conservés à -80°C pour des dosages ultérieurs.

2.1.4. Dosage immuno-enzymatique des cytokines

Le taux de production de l'IFN- γ , de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-17, au niveau des surnageants de cultures de PBMCs ont été évalués par une technique immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) quantitative de type sandwich, selon les instructions préconisés par le kit commercial (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA).

Brièvement, les standards et les surnageants de cultures ont été incubés sous agitation pendant 2 heures et demi avec des premiers anticorps (anti-cytokines) qui tapissent les puits d'une microplaque de microtitration à raison de 100 μL pour chaque cytokine. Après plusieurs lavages, 100 μL d'anticorps biotinylé ont été ajoutés à tous les puits. Suite à une heure d'incubation, 100 μL de streptavidine couplé à la peroxydase ont été ajoutés aux différents puits.

Une révélation de l'activité enzymatique a été réalisée après 45 minutes. Le tétraméthylbenzidine (TMB) a été utilisé comme le substrat de la réaction enzymatique à raison de 50 μL par puits. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, la réaction a été arrêtée avec une solution d'acide sulfurique (50 μL). Enfin, l'intensité de la coloration apparue, proportionnelle à la quantité de cytokines présentes, a été immédiatement lue à 450 nm par un lecteur de microplaques ELISA (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK).

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

Les limites de détection (LOD) étaient de 15 pg/mL pour l'IFN- γ , 5 pg/mL pour l'IL-4, 1 pg/mL pour l'IL-10 et 80 pg/mL pour l'IL-17.

2.1.5. Dosage du monoxyde d'azote

la production du NO au niveau des surnageants de culture des PBMCs, incubées pendant 24 heures, a été estimée en quantifiant l'accumulation des métabolites oxydatives (NO_x, nitrites et nitrates), par une réaction colorimétrique en utilisant le réactif de Griess, l'acide trichloracétique (TCA), et le chlorure de Vanadium III, comme décrit précédemment (Guevara et *al.*, 1998).

Les concentrations des NO_x ont été déterminées par une courbe d'étalonnage établie de 0-150 μ mol/L de nitrite de sodium après une lecture de l'absorbance à 540 nm.

2.1.6. Dosage de l'activité de l'arginase

Les culôts cellulaires, récupérés immédiatement par une centrifugation des cultures cellulaires de PBMCs après incubations, ont été utilisés pour l'estimation de l'activité de l'arginase en utilisant une méthode spectrophotométrique basée sur la détermination du taux de l'urée produit après l'ajout de la L-arginine, comme décrit précédemment (Rouzaut et *al.*, 1999).

Brièvement, les cellules ont été lysées avec le Triton X-100 à 10 % et incubées sous agitation pendant 30 minutes. Un mélange de Tris-HCl et de MnCl₂ a été ajouté et le tout a été incubé pendant 10 minutes à 56°C afin d'activer l'enzyme. La réaction d'hydrolyse a commencé après l'addition d'un volume égal d'une solution d'arginine (0,5 M) au lysat activé, le tout a été ensuite incubé à 37°C pendant 1 heure. Afin de stopper la réaction enzymatique, 400 μ L d'un mélange d'acides ont été ajoutés et la concentration de l'urée généré par l'arginase a été déterminée, suite à la lecture de l'intensité de la coloration apparue à 600 nm, en utilisant un kit commercial (UREA/BUN-COLOR, BioSystems, S.A. Costa Brava 30, Barcelonna Spain). Enfin, l'activité de l'arginase a été exprimée en mU urée/mg de protéines/1 heure.

2.1.7. Préparation des monocytes

Les monocytes ont été séparés à partir des PBMCs, récupérées à partir du sang total des patients diabétiques de type 1 et des sujets contrôles, par une sélection négative en utilisant

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

le Kit Human Monocyte Enrichment EasySep (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), selon les instructions du fabricant.

7×10^7 de PBMCs ont été mises en suspension dans du PBS (*phosphate buffered saline*) avec 1 mM d'EDTA (*Ethylene diamine tetraacetic acid*), et 2 % de SVF, puis incubées à 02-08°C pendant 10 minutes avec un cocktail d'anticorps d'enrichissement (50 μ L/mL).

50 μ L/mL de particules magnétiques ont été ajoutées ensuite à la suspension, puis le tout a été incubé pendant 5 minutes. Enfin, les monocytes ont été récupérés à partir de la fraction négative par une centrifugation à 400 x g pendant 10 minutes, et la viabilité cellulaire a été évaluée par une TBET.

2.1.8. Dosage des STAT4 et STAT6 phosphorylés

Les concentrations relatives des STAT4 (Tyr693) et des STAT6 (Tyr641) phosphorylés, au niveau des cultures des monocytes traités et non traités par la 1,25(OH)₂D₃, ont été mesurés par une ELISA qualitative avec des kits commerciaux respectifs, selon les instructions du fabricant (Abcam, Germany).

Les monocytes préparés ont été repris dans du RPMI 1640 supplémenté avec 2 Mm de L-glutamine, 50 μ g/mL de gentamycine et 10 % de SVF à une concentration de 5×10^5 cellule/mL, et mis dans une microplaque de culture à 96 puits à fond plat et incubés à 37°C pendant 4 heures dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂ (Yang et al., 2012).

Après incubation, les monocytes adhérents ont été stimulés par 100 ng/mL de LPS (Laverny et al., 2010), et supplémentés avec l'IFN- γ (10 ng/mL) et l'IL-4 (10 ng/mL) pour le dosage des STAT4 et des STAT6 phosphorylés (STAT4-p et STAT6-p), respectivement (Frucht et al., 2000; Wurster et al., 2000). Toutes les cultures ont été réalisées en présence et en absence de 10^{-7} M de la 1,25(OH)₂D₃ (Yang et al., 2012).

Après 30 minutes d'incubation à 37°C et à 5 % de CO₂, les puits ont été lavés avec le tampon de lavage (A), et 100 μ L de formaldéhyde ont été ajoutés aux différents puits. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, 200 μ L de solution Quenching ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Suite à l'ajout de 100 μ L de la solution de blocage et d'une heure d'incubation, les puits ont été lavés avec le tampon de lavage (B), et 50 μ L du premier anticorps anti-phospho-STAT4 (Tyr693) et anti-phospho-STAT6 (Tyr641) ont été ajoutés aux puits appropriés et incubés pendant 2

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

heures à température ambiante. 50 µL du deuxième anticorps couplé à la peroxydase de raifort (HRP, *horseradish peroxidase*) ont été ensuite ajoutés aux puits appropriés.

Après une heure d'incubation, l'activité enzymatique a été révélée par l'addition du TMB à raison de 100 µL par puits, suivi de 30 minutes d'incubation à l'obscurité. Afin d'arrêter la réaction chromogène, 50 µL d'acide phosphorique (solution stop) ont été ajoutés, et au final, l'absorbance a été immédiatement lue à 450 nm par un lecteur de plaque d'ELISA.

2.1.9. Analyses statistiques des données

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS software version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les données ont été présentées sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne. La normalité a été vérifiée avant les tests statistiques. La comparaison entre les moyennes a été réalisée en utilisant des tests non paramétriques ; le test Kruskal-Wallis (K-W) et le test Mann-Whitney U, pour la recherche des différences entre les différents groupes et entre deux groupes, respectivement. Une signification statistique a été constatée lorsque la valeur de p a été inférieure à 0,05.

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

2.2. Résultats

Dans la présente étude, nous avons évalué en *ex vivo* le rôle immunomodulateur de la forme bioactive de la vitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃) sur la production des cytokines proinflammatoires Th1-Th17 et anti-inflammatoires Th2-Treg et sur les niveaux de phosphorylation des STAT4 et des STAT6 au début du DT1. Les expériences ont été effectuées sur des PBMCs et des monocytes des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles stimulés et mis en culture en présence et en absence de la 1,25(OH)₂D₃.

L'effet modulateur de la vitamine D₃ sur la production du NO au début du DT1 a été évalué au niveau des cultures de PBMCs. En se basant sur leurs profils de sécrétion cytokinique respectifs, les ratios Th1/Th2 et Treg/Th17 ont été estimés à partir des ratios IFN- γ /IL-4 et IL-10/IL-17, respectivement. Enfin, l'effet de la forme bioactive de la vitamine D₃ sur la production des cytokines proinflammatoires combinées (PICs) Th1/Th17 et anti-inflammatoires combinées (AICs) Th2/Treg a été évalué.

2.2.1. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des cytokines Th1 et Th2

Les concentrations de l'IFN- γ et de l'IL-4 ont été déterminées dans les surnageants de cultures de PBMCs. Les résultats obtenus, présentés sur la figure 2.2, montrent des niveaux significativement élevés de l'IFN- γ au niveau des surnageants de cultures de PBMCs des patients diabétiques par rapport aux concentrations observées dans les cultures des sujets contrôles. Cependant, les concentrations des IL-4 ont été significativement diminuées au sein des cultures des patients par rapport à celles des témoins (pour les deux groupes, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U).

Suite au traitement par la 1,25(OH)₂D₃, nous avons constaté une augmentation significative de la production de l'IFN- γ et une diminution significative des concentrations de l'IL-4 produites par les PBMCs des sujets non diabétiques comparées à celles des cultures non traitées (pour les deux comparaisons, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). Nous avons observé que le traitement des PBMCs des patients atteints du DT1 par la 1,25(OH)₂D₃ a induit une diminution significative des concentrations de l'IFN- γ et une augmentation significative des teneurs en IL-4 par rapport à celles des PBMCs des patients non traités ($p = 0,006$ et $p = 0,021$ par le test Mann-Whitney U).

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

Pour les deux cytokines, en utilisant le test de Kruskal-Wallis, la valeur de p a été de 0,008 pour l'IFN- γ , et de 0,009 pour l'IL-4.

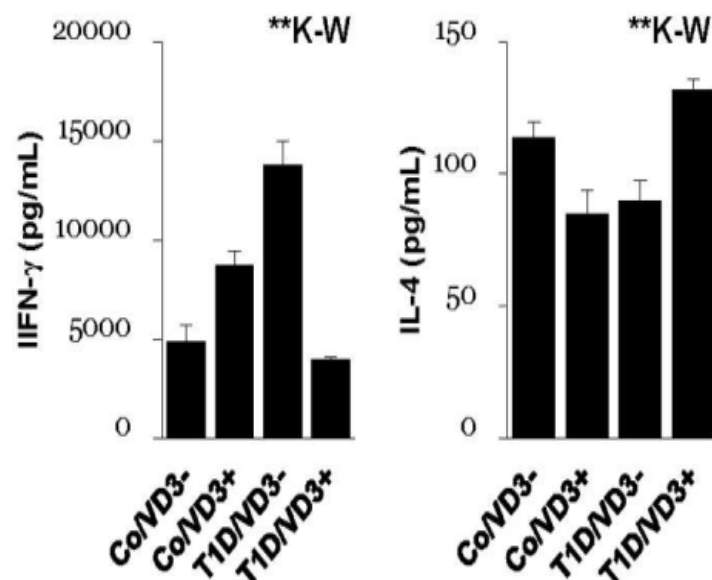


Figure 2.2 Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production de l'IFN- γ et de l'IL-4 par les PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. IL: interleukine, IFN: interféron, K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)₂D₃. ** $p < 0.01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U: IFN- γ ; Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ $p < 0.05$, T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p = 0.006$, IL-4; Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$

2.2.2. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des cytokines Th17 et Treg

Au regard des résultats présentés sur la figure 2.3, la production de l'IL-10 par les PBMCs des patients diabétiques a été significativement diminuée par rapport à celle des contrôles. Cependant, les concentrations de l'IL-17 ont été significativement plus élevées au niveau des cultures de patients diabétiques comparées aux cultures des témoins (pour les deux comparaisons, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U).

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

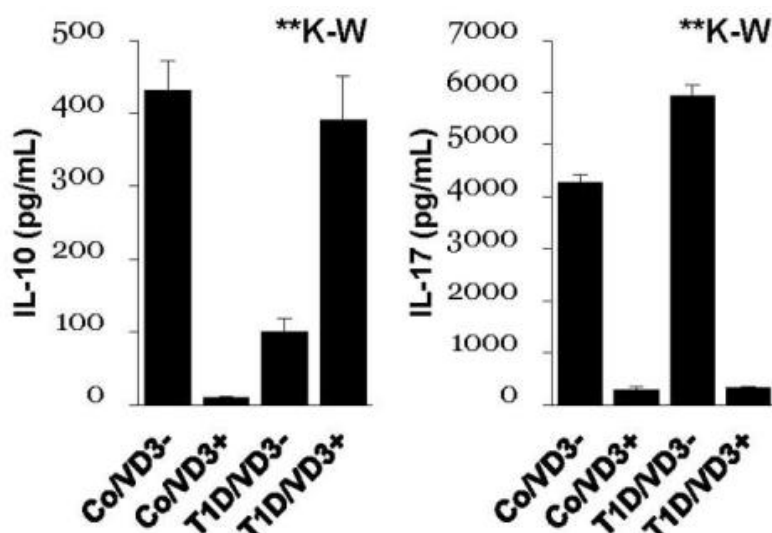


Figure 2.3. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production de l'IL-10 et de l'IL-17 par les PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. IL: interleukine, K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)₂D₃. ***p* < 0.01 par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U: IL-10; Co/VD3- vs. Co/VD3+, *p* < 0.01, Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, *p* < 0.05, IL-17; Co/VD3- vs. Co/VD3+, *p* < 0.01, Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3- vs. T1D/VD3+ ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+, *p* < 0.05, T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, *p* < 0.01.

Une diminution significative de la production de l'IL-10 ainsi que celle de l'IL-17 a été constatée dans les cultures de PBMCs des sujets contrôles traitées par 1,25(OH)₂D₃ par rapport à celles des cultures non traitées (pour les deux comparaisons, *p* < 0,01 par le test de Mann-Whitney *U*). Par ailleurs, nous avons constaté une augmentation significative des teneurs d'IL-10 et une diminution des taux de production de l'IL-17 au niveau des cultures de PBMCs des patients diabétiques traitées par la 1,25(OH)₂D₃ par rapport aux cultures non traitées (*p* < 0,05 et *p* < 0,01 par le test de Mann-Whitney *U*).

Pour toutes les comparaisons, *p* < 0,01 en utilisant le test de Kruskal-Wallis.

2.2.3 Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production du monoxyde d'azote et sur l'activité de l'arginase

Le dosage du monoxyde d'azote, effectué sur les surnageants de cultures, ainsi que l'estimation de l'activité de l'arginase, au sein des lysats cellulaires, nous ont permis d'obtenir les résultats présentés sur la figure 2.4.

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

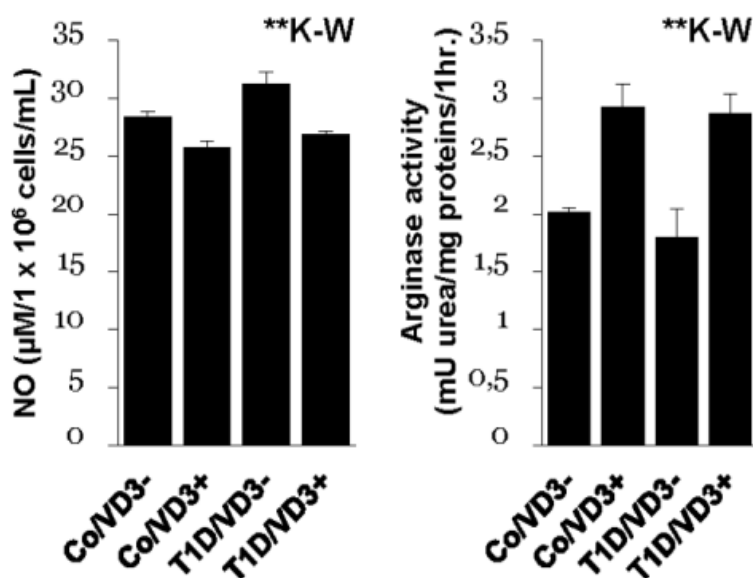


Figure 2.4. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production du monoxyde d'azote et sur l'activité de l'arginase au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. NO: monoxyde d'azote, K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)₂D₃. ***p* < 0.01 par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U: production du NO; Co/VD3- vs. Co/VD3+ *p* < 0.01, Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3- vs. T1D/VD3+, *p* < 0.05, Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, *p* < 0.01. Activité de l'arginase; Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3+ ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3-, *p* < 0.01, T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, *p* < 0.05.

Une différence significative a été constatée au niveau des concentrations du NO produites par les PBMCs des patients diabétiques de type 1 par rapport aux contrôles. En effet, les concentrations du NO produites par les PBMCs des patients ont été significativement plus élevées par rapport à celles produites par les PBMCs des sujets contrôles. Cependant, nous avons observé qu'il n'y avait pas de différence significative dans les niveaux de l'activité de l'arginase entre les deux groupes (*p* = 0,047 et *p* = 0,465, respectivement, par le test de Mann-Whitney U).

Toutefois, le traitement des cultures par la 1,25(OH)₂D₃ a induit une diminution significative des taux de production du NO et une augmentation significative de l'activité de l'arginase au sein des PBMCs des patients diabétiques et des sujets contrôles par rapport aux cultures non traitées (pour le groupe contrôle; la production du NO ou l'activité de l'arginase, *p* < 0,01, pour le groupe de patients; la production du NO, *p* < 0,01, activité de l'arginase, *p* < 0,05, par le test Mann-Whitney U).

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

Pour toutes les comparaisons, $p < 0,01$ par le test de Kruskal-Wallis.

2.2.4. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur les ratios Th1/Th2, Treg/Th17 et production du NO/activité de l'arginase

Nous avons évalué l'effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur les ratios Th1/Th2, Treg/Th17 et la production du NO/activité de l'arginase au début du DT1. En se basant sur leurs profils de sécrétion cytokinique respectifs, les ratios Th1/Th2 et Treg/Th17 ont été estimés à partir des ratios IFN- γ /IL-4 et IL-10/IL-17, respectivement.

Nous avons constaté, figures 2.5, qu'en absence de la 1,25(OH)₂D₃, le ratio Th1/Th2 a été significativement plus élevé au niveau des PBMCs des patients diabétiques par rapport aux cultures des sujets contrôles. Inversement, le ratio Treg/Th17 a été significativement diminué (pour les deux comparaisons, $p < 0,05$, par le test de Mann-Whitney U) (figure 2.6).

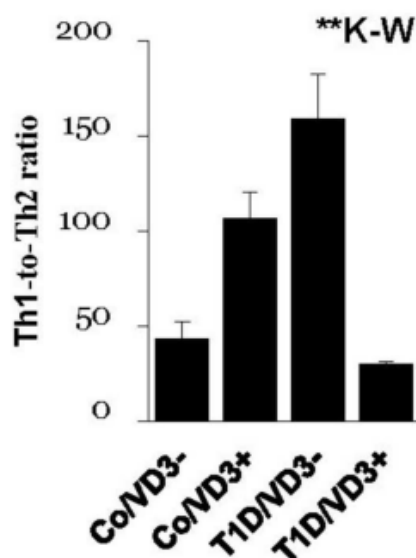


Figure 2.5. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur le ratios Th1/Th2 au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Th: cellule T helper, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)₂D₃. ** $p < 0.01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U: Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$.

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

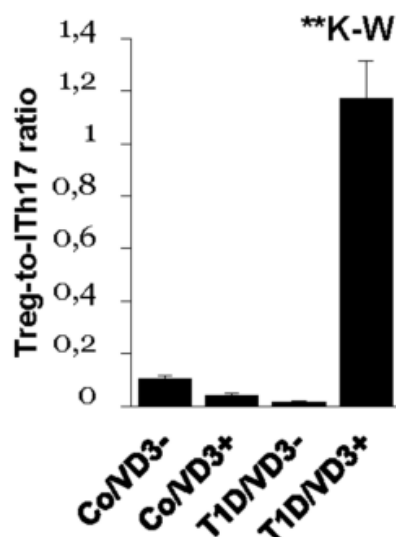


Figure 2.6. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur le ratios Treg/Th17 au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. *K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Th: cellule T helper, Treg: T régulateur, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)₂D₃. **p<0.01 par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U: Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3- vs. T1D/VD3+ ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, p < 0.05.*

Le traitement des PBMCs des sujets contrôles par la 1,25(OH)₂D₃ a induit une augmentation significative du ratio Th1/Th2 et une diminution significative du ratio Treg/Th17 par rapport aux cultures non traitées (pour les deux groupes, $p < 0,05$, par le test Mann-Whitney U). A l'inverse, la 1,25(OH)₂D₃ a conduit à une diminution significative du ratio Th1/Th2 et une augmentation significative du ratio Treg/Th17 dans les cultures de PBMCs des patients diabétiques en comparaison à ceux des patients non traités ($p < 0.05$ et $p < 0.01$ respectivement, par le test de Mann-Whitney U).

En utilisant le test de Kruskal-Wallis, les valeurs de p ont été de 0,006 pour le ratio Th1/Th2 et de 0,003 pour le ratio Treg/Th17.

Comme le montre la figure 2.7, le ratio production du NO/activité de l'arginase a été plus élevé au niveau des PBMCs des patients diabétiques en comparaison à celui des contrôles, mais la différence n'a pas été significative ($p = 0.117$). De même, le ratio production du NO/activité de l'arginase au sein des cultures des contrôles a été significativement diminué en présence de la vitamine D₃ active en comparaison aux cultures de sujets contrôles non

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

traitées ($p = 0,009$, par le test de Mann-Whitney U). Aussi, le traitement des PBMCs des patients diabétiques par la 1,25(OH)₂D₃ a induit une diminution significative du ratio production du NO/activité de l'arginase par rapport aux cultures PBMCs des patients non traitées ($p < 0.01$, par le test de Mann-Whitney U).

En utilisant le test de Kruskal-Wallis pour la comparaison entre les différents groupes, la valeur de p a été de 0,002.

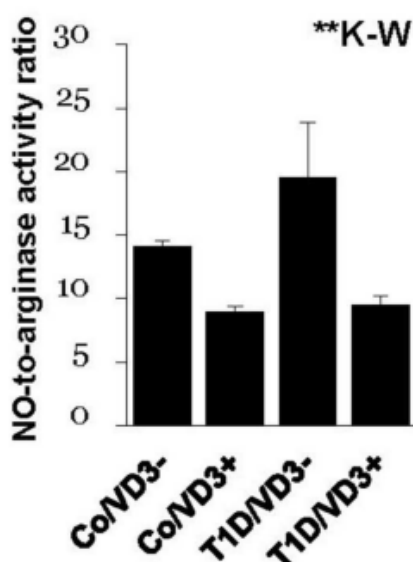


Figure 2.7. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur le ratios production du NO/activité de l'arginase au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles.

*K-W: test de Kruskal-Wallis, NO : Monoxyde d'azote, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)₂D₃. ** $p < 0.01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U : Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3+ ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.01$.*

2.2.5. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur l'expression des STAT4-p et STAT6-p au niveau des monocytes en réponse au LPS/IFN- γ et au LPS/IL-4 respectivement

Afin d'évaluer l'effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur les niveaux de phosphorylation relatives des STAT4 (Tyr 693) et des STAT6 (Tyr 641) au sein des monocytes des patients atteints du DT1, un dosage qualitatif des STAT phosphorylés (STAT-p) a été réalisé par une ELISA au niveau des monocytes du sang périphérique des patients atteints du DT1 et des sujets

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

contrôles stimulés par le LPS et supplémentés avec l'IFN- γ ou avec l'IL-4 en présence et en absence de la 1,25(OH)₂D₃.

Comme le montre la figure 2.8, les concentrations relatives des STAT4 phosphorylés (STAT4-p) ont été significativement plus élevées au sein des monocytes des patients par rapport aux sujets contrôles. Cependant, les taux relatifs des STAT6 phosphorylés (STAT6-p) dans des monocytes des patients ont été significativement diminués par rapport à celles des contrôles (pour les deux groupes, $p < 0,01$ par le test Mann-Whitney U).

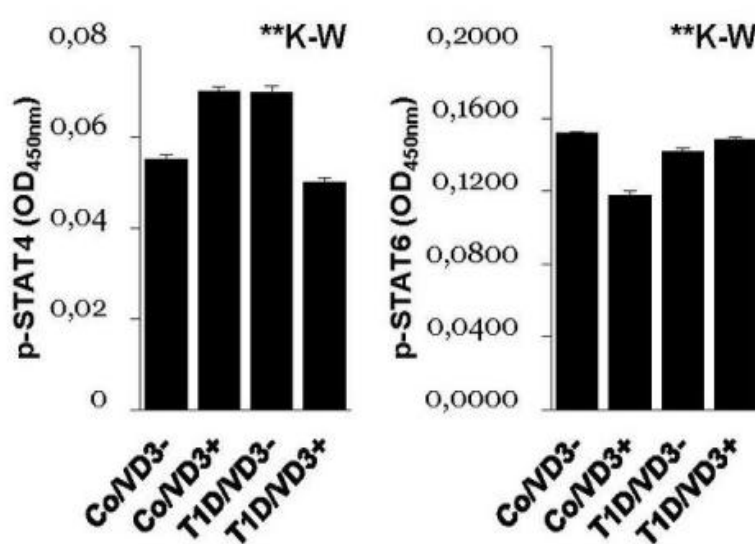


Figure 2. 8. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la phosphorylation des STAT4 et STAT6 au sein des monocytes des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. *K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, STAT: transducteur de signal et activateur de la transcription, p-STAT: STAT phosphorylé, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: monocytes des sujets contrôles non traités par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: monocytes des sujets contrôles traités par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: monocytes des patients diabétiques de type 1 non traités par la 1,25(OH)₂D₃; T1D/VD3+: monocytes des patients diabétiques de type 1 traités par la 1,25(OH)₂D₃. ** $p < 0.01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U : p-STAT4; Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3-, $p < 0.01$, Co/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$, Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+ $p < 0.01$. p-STAT6; Co/VD3- vs. Co/VD3+, $p < 0.01$, Co/VD3- vs. T1D/VD3-, $p < 0.05$, Co/VD3- vs. T1D/VD3+ ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+, $p < 0.01$, T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$.*

Aussi, nous avons constaté que le traitement des monocytes des sujets contrôles par la 1,25(OH)₂D₃ a induit une augmentation significative des taux relatifs des STAT4-p et une diminution significative des niveaux de STAT6-p en comparaison aux monocytes non traités par la 1,25(OH)₂D₃ (pour les deux groupes, $p < 0,01$ par le test Mann-Whitney U).

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

Toutefois, nos résultats ont montré qu'après traitement des cultures de monocytes des patients diabétiques par la 1,25(OH)₂D₃, les niveaux relatifs des STAT4-p ont été significativement diminués et ceux des STAT6-p ont été significativement augmentés au sein des monocytes des patients en comparaison à ceux non traités ($p = 0,009$ et $p = 0,036$, respectivement, par le test de Mann-Whitney U).

Pour la comparaison entre les différents groupes, $p < 0,01$ par le test de Kruskal-Wallis.

2.2.6. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur le ratio STAT4-p/STAT6-p

Nous avons constaté, figure 2.9, que le ratio STAT4-p/STAT6-p a été significativement plus élevé au sein des monocytes des patients diabétiques en comparaison à celui des contrôles ($p < 0,01$, par le test Mann-Whitney U).

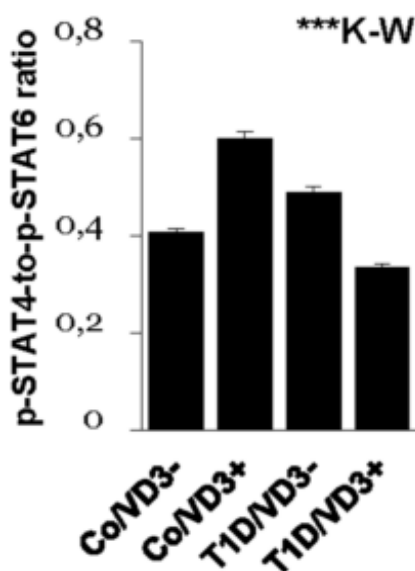


Figure 2.9. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur le ratios STAT4-p/STAT6-p au niveau des monocytes des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. *K-W: test de Kruskal-Wallis, STAT: transducteur de signal et activateur de la transcription, p-STAT: STAT phosphorylé, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: monocytes des sujets contrôles non traités par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: monocytes des sujets contrôles traités par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: monocytes des patients diabétiques de type 1 non traités par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: monocytes des patients diabétiques de type 1 traités par la 1,25(OH)₂D₃. ** $p < 0.01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U : Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3- vs. T1D/VD3+ ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.01$.*

Le traitement des monocytes des sujets contrôles par la 1,25(OH)₂D₃ a induit une augmentation significative du ratio STAT4-p/STAT6-p. A l'inverse, la 1,25(OH)₂D₃ a

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

provoqué une diminution significative du ratio STAT4-p/STAT6-p au sein des monocytes des patients (pour les deux groupes, $p < 0,01$, par le test de Mann-Whitney U).

Pour la comparaison entre les quatre groupes, $p < 0,001$ par le test Kruskal-Wallis

2.2.7. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des cytokines proinflammatoires combinées (PICs) Th1/Th17 et anti-inflammatoires combinées (AICs) Th2/Treg, et sur le ratio PICs/AICs

Comme le montre la figure 2.10, les taux de production des PICs (IFN- γ + IL-17) ont été significativement plus élevés au sein des PBMCs des patients par rapport aux contrôles, tandis que les concentrations des AICs (IL-4 + IL-10) ont été significativement diminuées (pour les deux comparaisons, $p < 0,05$, par le test de Mann-Whitney U).

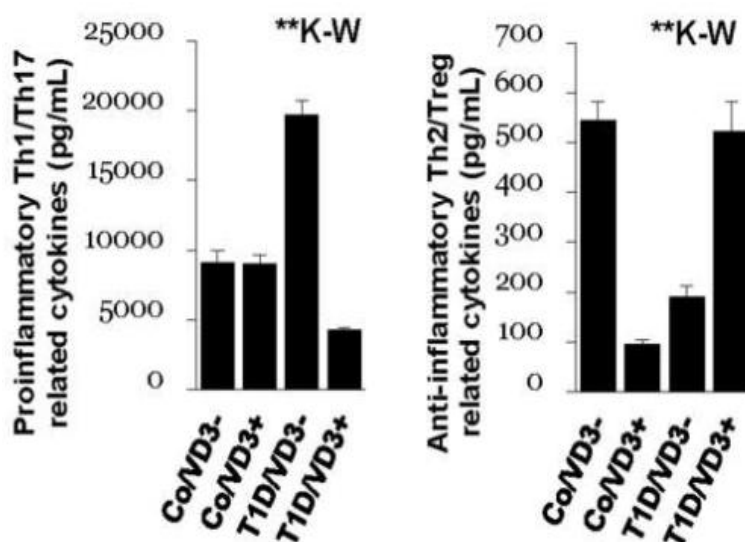


Figure 2.10. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des PICs et des AICs par les PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. AICs: cytokines anti-inflammatoires (IL-4 + IL-10), PICs: cytokines proinflammatoires (IFN- γ + IL-17), IL: Interleukine, IFN: Interféron, Th: cellule T helper, Treg: T régulateur, K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)₂D₃. ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney U : PICs; Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3- vs. T1D/VD3+ ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0,05$. AICs; Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3- ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0,05$.

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

Le traitement des PBMCs des sujets contrôles par la 1,25(OH)₂D₃ a induit une diminution significative des niveaux de production des AICs par rapport aux cultures des contrôles non traitées (pour AICs, $p < 0.05$ par le test de Mann-Whitney *U*). De même, la 1,25(OH)₂D₃ a provoqué une diminution significative des concentrations des PICs et une augmentation significative des taux de production des AICs au niveau des PBMCs des patients diabétiques de type 1 en comparaison aux cultures des patients non traitées (pour PICs et AICs, la valeur de p était inférieure à 0.05).

Par ailleurs, comme le montre la figure 2.11, le ratio PICs/AICs a été significativement plus élevé dans les cultures des patients par rapport aux contrôles ($p < 0.05$ par le test de Mann-Whitney *U* test). Aussi, suite au traitement par la 1,25(OH)₂D₃, le ratio PICs/AICs a été significativement augmenté au sein des cultures des sujets contrôles, et a été significativement diminué au sein des cultures des patients diabétiques par rapport aux cultures non traitées (pour les deux groupes, $p < 0.05$ par le test de Mann-Whitney *U*).

Pour la comparaison entre les différents groupes, $p < 0,01$ par le test Kruskal-Wallis.

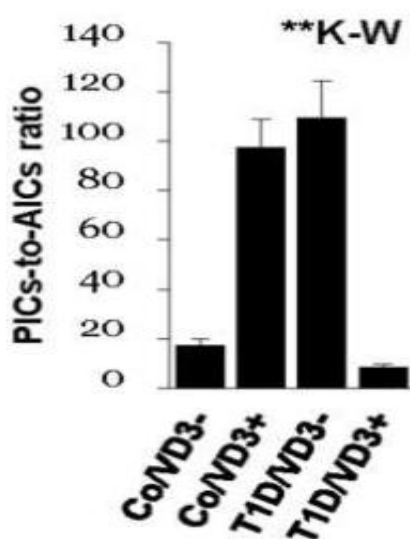


Figure 2.11. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur le ratio PICs/AICs au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles. AICs: cytokines anti-inflammatoires (IL-4+ IL-10), PICs: cytokines proinflammatoires (IFN- γ + IL-17), IL: Interleukine, IFN: Interféron, Th: cellule T helper, Treg: T régulateur, K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)₂D₃. ** $p < 0.01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence entre les différents groupes sont données comme suit par le test de Mann-Whitney *U*: Co/VD3- vs. Co/VD3+ ou Co/VD3- vs. T1D/VD3- ou Co/VD3- vs. T1D/VD3+ ou Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ ou T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$.

2.3. Discussion

Le DT1 résulte de la destruction des cellules β pancréatiques suite à leur exposition à des produits inflammatoires, y compris les cytokines et les radicaux libres, et/ou après leur contact direct avec les lymphocytes T autoréactifs et les macrophages. Il a été suggéré que les cytokines proinflammatoires de type Th1 pourraient jouer un rôle crucial dans la réponse immunitaire conduisant à la lyse des cellules β pancréatiques. Cependant, le développement du DT1 est généralement associé à un défaut d'immunorégulation (Mathis et Benoist, 2004).

Par ailleurs, la différenciation des cellules T CD4⁺ en lymphocytes T effecteurs dépend non seulement des cytokines présentes dans le microenvironnement mais aussi des facteurs de transcription spécifiques et des signaux de costimulation (Moser et Murphy, 2000). Aussi, d'autres facteurs sont autant impliqués tels que la vitamine D₃.

La modulation de la réponse immunitaire, une des stratégies de prévention du DT1, est l'une des propriétés de la vitamine D₃. Plusieurs effets protecteurs de la destruction des cellules β pancréatiques par la forme bioactive de la vitamine D₃ ont été décrits, comme la diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I (Hahn et *al.*, 1997), et l'inhibition de l'expression des molécules Fas, également connues sous le nom de Apo-1 ou encore CD95, et qui sont impliquées dans l'apoptose des cellules β pancréatiques (Riachy et *al.*, 2006). Néanmoins, les principales propriétés anti-inflammatoires et immunorégulatrices de la vitamine D₃ semblent être médiées par son contrôle sur la production des cytokines.

L'effet protecteur de la vitamine D₃ au cours du DT1 a été estimé dans le modèle animal en utilisant des ligands synthétiques du VDR. Il a été précédemment montré, chez les souris NOD, que l'analogue de la vitamine D₃; « 1,25-dihydroxy-16,23Z-diène-26,27-hexafluoro-19-nor » (BXL-219, RO-26-2198), qui est impliqué dans la modulation de la réponse immune en agissant sur les CPA et les cellules T (Pedullà et *al.*, 2007), et l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques, est capable de diminuer la production d'IL-12 et de l'IFN- γ en réponse au LPS, et de favoriser l'augmentation du nombre des lymphocytes T régulateurs au sein des ganglions lymphatiques pancréatiques (Gregori et *al.*, 2002), mais aussi à induire une diminution de la production des chimiokines proinflammatoires par les cellules des îlots pancréatiques, bloquant ainsi de manière sélective l'infiltration des cellules Th1 au niveau du pancréas. Le BXL-219 peut également augmenter l'expression du I κ B α (*nuclear factor of*

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

kappa light-chain polypeptide gene in B cells inhibitor) au niveau des cellules pancréatiques, diminuant ainsi la production du facteur nucléaire kappa B (NFκB) (Giarratana et al., 2004).

2.3.1. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ la production des cytokines Th1 et Th2

La différenciation des précurseurs des cellules T auxiliaires naïves (Thp) en lymphocytes Th1 ou en cellules Th2 dépend du microenvironnement cytokinique local. Au cours de ce travail, nos résultats ont dévoilé une augmentation des taux de production de l'IFN-γ, cytokine de type Th1, produites par les PBMCs des patients atteints du DT1. Ces résultats concordent avec des études antérieures constatant une production accrue des cytokines de type Th1 produites par des PBMCs des patients atteints du DT1 (Rabinovitch et Suarez-Pinzon, 2007 ; Karlsson Faresjö et al., 2004). Le rôle pathogène des cytokines Th1 produites par les PBMCs au cours du DT1 a été largement décrit. Ainsi, ces cytokines peuvent influencer l'activation des macrophages et des cellules cytotoxiques qui sont fortement impliquées dans la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques.

Par ailleurs, nous avons observé une diminution de la production de l'IL-4 par les PBMCs des patients atteints du DT1, conformément rapportés par plusieurs auteurs montrant de faibles niveaux de production des cytokines de type Th2 par des PBMCs des patients atteints du DT1 (Rapoport et al., 2005). Aussi, nous avons montré l'augmentation du ratio Th1/Th2, évalué par rapport au ratio IFN-γ/IL-4, au niveau des PBMC des patients. Dans ce contexte, une corrélation entre l'insulite destructrice et un ratio IFN-γ/IL-4 élevé a été précédemment rapportée (Kolb, 1997).

Nos résultats obtenus suite au traitement de nos cultures de PBMCs des patients diabétiques par la 1,25(OH)₂D₃ ont révélé une diminution significative de la production de l'IFN-γ et du ratio Th1/Th2, et une augmentation significative des taux de production de l'IL-4. Ces résultats corrélerent avec d'autres études suggérant que la 1,25(OH)₂D₃ peut inhiber la transcription des gènes des cytokines de types Th1 (IL-2 et IFN-γ) ou/et ceux impliqués dans la différenciation des clones Th1 constatant un effet inhibiteur de la 1,25(OH)₂D₃ sur la différenciation des cellule Th1, tout en favorisant le développement de cellules Th2 sécrétrices de l'IL-4 (Gauzzi et al., 2005). Par ailleurs, des études expérimentales réalisées sur des souris NOD ont montré que la 1,25(OH)₂D₃ diminue localement la sécrétion de l'IFN-γ et favorise la production de l'IL-4 (Busta et al., 2011). Nous suggérons que la forme bioactive de la vitamine D₃ peut moduler les réponses immunitaires Th1 et Th2 au début du DT1.

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

2.3.2. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des cytokines Th17 et Treg

Les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle capital dans le maintien de la tolérance immunologique périphérique et la prévention de l'auto-immunité. Il a été rapporté que l'IL-10 est l'une des principales cytokines anti-inflammatoires nécessaires à la régulation de l'activation d'autres cellules immunitaires en limitant la production des cytokines proinflammatoires, comme l'IFN- γ (Moore et *al.*, 1993).

Contrairement à l'IL-10, l'IL-17, produite par les cellules T CD4⁺ Th17, est impliquée dans la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes, comme le DT1 (Honkanen et *al.*, 2010). Aussi, il a été récemment montré que les cellules T et les monocytes provenant de patients atteints du DT1 produisent des niveaux élevés d'IL-17 (Marwaha et *al.*, 2010). Des études supplémentaires, réalisées sur le modèle du DT1 induit par de multiples faibles doses de streptozotocine (MLD-STZ, *multiple low dose streptozotocine*), ont révélé une augmentation de la production de l'IL-17 et une diminution de celle de l'IL-10 (Singh et *al.*, 2015). Ces données sont en accord avec nos résultats obtenus.

D'autre part, nous avons constaté que la 1,25(OH)₂D₃ a inhibé la production de l'IL-17, a stimulé celle de l'IL-10, et a induit l'augmentation du ratio Treg/Th17 au sein des cultures de PBMCs des patients atteints du DT1. Nos résultats corroborent des données récentes suggérant que la 1,25(OH)₂D₃ peut agir directement sur les cellules T, favorise la sécrétion de l'IL-10 et inhibe la production des cytokines proinflammatoires, comme l'IL-17 (Chambers et Hawrylowicz, 2011 ; Jeffery et *al.*, 2009), et l'IFN- γ (Adorini et Penna, 2008). A notre connaissance, il n'y a aucune d'étude similaire portant sur le DT1 permettant de faire une comparaison directe avec nos résultats.

2.3.3. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production du monoxyde d'azote et l'activité de l'arginase

Le monoxyde d'azote (NO), une molécule de signalisation qui joue un rôle important dans les réponses immunitaires innées, est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine par la NOS (Kubes et McCafferty, 2000). De même, la L-arginine est également le substrat de l'enzyme arginase (Aribi et *al.*, 2015). La NOS et l'arginase définissent le profil proinflammatoire M1; macrophages classiquement activés, et anti-inflammatoire M2; macrophages alternativement activés, respectivement (Rath et *al.*, 2014).

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

Il a été précédemment rapporté que le K_m de l'arginase des mammifères est dans l'intervalle de 2 à 20 mM et celui de la NOS est dans l'intervalle de 2 à 20 μ M (Wu et Morris, 1998). L'expression de l'arginase ou de la NOS dépend des conditions immunologiques. Ainsi, durant l'inflammation, une grande quantité de NO peut être produite par les monocytes/macrophages humains suite à l'induction de l'expression de l'iNOS en réponse à des cytokines proinflammatoires (Reiling et *al.*, 1994), comme l'IFN- γ , *via* l'activation de la voie NF- κ B (Morgan et Liu, 2011 ; Vila-del Sol et *al.*, 2006). L'arginase entre en compétition avec l'iNOS pour leur substrat commun, et par conséquent contribue à l'inhibition des réponses immunes M1/Th1, cela est considéré comme un mécanisme essentiel de l'immunosuppression (Munder, 2009).

Par ailleurs, Il a été rapporté que la production accrue du NO peut provoquer la lyse des cellules β pancréatiques (Liu et *al.*, 2014). Bien qu'il n'y a pas d'études sur la production du NO réalisées sur des PBMCs des patients atteints du DT1, nos résultats soutiennent et complètent d'autres résultats suggérant des taux élevés du NO circulant chez les patients atteints du DT1 (Savino et *al.*, 2006 ; Hoeldtke, 2003).

Suite au traitement de nos cultures par la 1,25(OH) $_2$ D $_3$, connue pour avoir des effets anti-inflammatoires, nous avons montré pour la première fois que la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ inhibe la production du NO, stimule l'activité de l'arginase et diminue le ratio production du NO/activité de l'arginase au niveau des PBMCs des patients atteints du DT1 et des contrôles. Il serait très intéressant de vérifier si l'augmentation de l'activité de l'arginase et/ou des cytokines anti-inflammatoires soit la cause de la diminution de la production du NO.

2.3.4. Effet de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sur l'expression des STAT4 et STAT6 phosphorylés

Les monocytes, une population de cellules hétérogènes, sont capables de changer leur phénotype en réponse à différents stimuli (Yang et *al.*, 2014). Afin d'étudier l'impact de l'environnement cytokinique sur la transduction du signal au sein des monocytes des patients atteints du DT1, nous avons évalué l'expression relative des STAT4-p et des STAT6-p au sein des monocytes activés des patients atteints du DT1 et des sujets contrôles mis en culture en présence et en absence de la forme bioactive de la vitamine D $_3$.

Les protéines STAT sont une famille de facteurs de transcription intracellulaires impliqués dans la transduction du signal en réponse aux cytokines, hormones et aux facteurs de croissance. Ils participent à différents événements tels que la survie, la prolifération, la

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

différenciation, l'apoptose, l'angiogénèse, le développement fœtal, la transformation, l'inflammation et la réponse immunitaire (Benekli et al., 2003 ; Calò et al., 2003).

De cette famille, STAT4 et STAT6 sont des facteurs de transcription clés dans la polarisation des lymphocytes Th. En effet, STAT4 est nécessaire pour le développement des clones Th1 et est généralement activé par l'IL-12, mais peut également être phosphorylé au sein des cellules humaines en réponse à l'IFN- γ suite à l'activation de Jak1 (*janus kinase 1*) et Tyk2 (*tyrosine kinase 2*) (Wurster et al., 2000). L'association de Jak2 avec Tyk2 peut être aussi nécessaire pour la signalisation de l'IFN- γ et la différenciation des cellules Th1 productrices de l'IFN- γ à partir des cellules Th naïves (Ghoreschi et al., 2009). STAT6 est activé en réponse à l'IL-4, et est essentiel pour le développement des cellules Th2 (Kaplan et al., 1996). STAT4 et STAT6 peuvent également être exprimés par les cellules mononucléées activées, incluant les monocytes du sang périphérique (Fiset et al., 2006 ; Frucht et al., 2000).

Nos résultats ont révélé une augmentation des STAT4-p et du ratio STAT4-p/STAT6-p, et une diminution des niveaux de STAT6-p au sein des monocytes des patients atteints du DT1, ce qui montre l'effet prédominant des cytokines de type Th1 sur l'expression des STAT4 au sein des monocytes des patients atteints du DT1. Nos résultats concordent avec les données démontrant que les monocytes isolés à partir des patients nouvellement diagnostiqués pour un DT1 produisent des cytokines proinflammatoires capables d'induire le développement des cellules Th17, et la différenciation et/ou l'expansion des cellules Th17-Th1 (Bradshaw et al., 2009)

Par ailleurs, nous avons observé que le traitement des monocytes par la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ a induit une augmentation des niveaux relatifs des STAT6-p et une diminution de ceux des STAT4-p et du ratio STAT4-p/STAT6-p au sein des cultures de patients diabétiques. Ce travail fournit un nouvel aperçu sur l'effet de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sur l'activation des STAT4 et des STAT6 au niveau des monocytes au début du DT1. Nous suggérons que la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ peut contrer l'activation des voies inflammatoires impliquant la cascade de signalisation Jak/STAT au sein des monocytes au début du DT1.

Chapitre 2. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ régule négativement la production des cytokines proinflammatoires et du monoxyde d'azote et augmente la phosphorylation des STAT6 exprimés par les monocytes au début du diabète de type 1

2.3.5. Effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des cytokines proinflammatoires combinées (PICs) Th1-Th17 et anti-inflammatoires combinées (AICs) Th2-Treg

Les médiateurs inflammatoires peuvent jouer un rôle important dans la réponse immunitaire dirigée contre les cellules β pancréatiques. Ces médiateurs sont impliqués essentiellement dans la formation de l'insulite, la destruction des cellules β et médient le dialogue entre les cellules des îlots pancréatiques et les cellules immunitaires offensives infiltrées (Eizirik *et al.*, 2009).

Il a été rapporté que la combinaison de médiateurs inflammatoires prédispose la lyse des cellules β par les CTLs autoréactives (Gusdon *et al.*, 2006). Une diminution de la production des AICs, y compris les cytokines de type Th2-Treg, au cours du DT1 a été précédemment observée (Kretowski *et al.*, 2000). Ces données sont en accord avec nos résultats montrant une augmentation de la production des PICs (IFN- γ + IL-17) et une diminution de la sécrétion des AICs (IL-4 + IL-10) par les PBMCs des patients diabétiques. Il a été rapporté que la perte des cellules β pancréatiques est non seulement due à une production accrue des cytokines proinflammatoires, mais elle peut également être provoquée par un déficit en cytokines anti-inflammatoires (Russell et Morgan, 2014).

D'autres études réalisées sur le modèle NOD ont révélé que le traitement par l'IL-4, l'IL-10 ou par l'IL-13 peut retarder l'apparition du DT1 (Papaccio *et al.*, 2002), et que l'incidence de cette maladie peut être réduite par un transfert des macrophages anti-inflammatoire M2 et des cellules Treg (Parsa *et al.*, 2012).

Les propriétés immunomodulatrice de la vitamine D₃ peuvent dépendre de la signature cytokinique globale. De ce fait, l'évaluation de l'effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur les niveaux de production des cytokines combinées et sur le ratio PICs/AICs peut être plus intéressant que l'évaluation de son effet sur la production des PICs et des AICs séparément. Dans cette étude, nous avons constaté que la forme bioactive de la vitamine D₃ peut induire une diminution de la production des PICs et du ratio PICs/AICs, et une augmentation de celle des AICs au sein des cultures de PBMCs des patients atteints du DT1.

Chapitre 3

Conclusions et perspectives

Chapitre 3

Conclusions et perspectives

Le DT1 est une maladie auto-immune qui apparaît le plus souvent pendant l'enfance ou l'adolescence. Il se caractérise par une déficience absolue de la production de l'insuline suite à une destruction sélective et progressive des cellules β pancréatiques par les cellules mononucléées.

Les résultats de ce travail de thèse viennent, dans un premier temps, ajouter des données concernant la dérégulation des balances immunes au début du DT1. Nous avons aussi confirmé la prédominance d'un profil proinflammatoire relatif à l'axe Th1-Th17, mais également une surproduction du NO.

Nos résultats ont également permis de montrer que l'immunologie du DT1 ne se limitait pas à un excès de réponse proinflammatoire Th1-Th17, mais aussi qu'un déficit quantitatif en réponse anti-inflammatoire existe, attestée par une réduction de la production des cytokines de type Th2-Treg.

À côté de ses effets sur le métabolisme phosphocalcique, la vitamine D_3 est également considérée comme une hormone stéroïdienne dotée de propriétés immunomodulatrices remarquables sur les cellules immunitaires. Afin qu'elle puisse exercer ses fonctions immunes, elle doit être hydroxylée en 1,25-dihydroxyvitamine D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) et devenir pleinement active.

À notre connaissance, c'est le premier rapport décrivant l'effet de la vitamine D_3 sur la modulation de la production des cytokines par les PBMCs au début du DT1. Aussi, la présente étude montre l'effet inhibiteur de la $1,25(OH)_2D_3$ sur la production de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines de type Th1/Th17, d'une part, et sa capacité immunomodulatrice, ayant pour effet de favoriser la synthèse des cytokines anti-inflammatoires de type Th2/Treg, d'autre part.

Nous avons aussi eu l'opportunité d'être les premiers à mettre en évidence l'effet de la $1,25(OH)_2D_3$ sur la régulation de l'activation des protéines STAT4 et STAT6 aux niveaux des monocytes des patients atteints du DT1. Nos résultats ont montré que la $1,25(OH)_2D_3$ peut inhiber l'activation des STAT4 et favoriser celle des STAT6. Par conséquent, la $1,25(OH)_2D_3$

pourrait avoir un rôle à jouer dans la stimulation de l'activation des voies anti-inflammatoires impliquant la cascade de signalisation Jak/STAT au sein des monocytes au début du DT1.

Par ailleurs, nous avons essayé de compléter ces travaux par l'étude de l'effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur la balance NO:arginase. Nous avons ainsi pu montrer qu'elle pourrait moduler le ratio NO:arginase en faveur de l'augmentation de l'activité de l'arginase, ce qui caractérise les macrophages anti-inflammatoires, alternatives M2.

Au regard de ces résultats, il nous serait tout-à-fait possible de suggérer que la forme bioactive de la vitamine D_3 peut avoir un effet protecteur sur les cellules β pancréatiques au début du processus auto-immun.

Nos résultats suscitent des investigations complémentaires. Ainsi, il serait intéressant de:

- Renforcer le panel des cytokines et des facteurs de transcriptions afin de mieux situer l'effet immunomodulateur de la vitamine D_3 au début du DT1.
- Expliquer pourquoi la vitamine D_3 peut agir différemment sur la production des cytokines en fonction du changement des conditions physiologiques.
- Déterminer le mode d'action de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ qui conduit à la diminution de la production du NO.
- Etudier l'effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'activation des réponses T spécifique à l'antigène comme l'acide glutamique décarboxylase 65 (GAD (65)).
- Tester l'effet de certains ligands synthétiques du VDR, tel que le BXL-219, sur la régulation de la balance cytokinique proinflammatoire/anti-inflammatoire, mais également sur les voies de signalisation impliquées dans la polarisation des cellules monocytes/macrophages, sachant que toutes les deux expriment constitutivement le VDR.
- Evaluer, au début du DT1, l'effet de la vitamine D_3 sur la modulation des fonctions des cellules dendritiques vu leurs rôle crucial dans l'initiation du processus autodestructeur des cellules β pancréatiques.
- Enfin, il serait très souhaitable de confirmer nos résultats à l'aide d'études *in vivo*.

Chapitre 4

Bibliographie

Chapitre 4

Bibliographie

A

- Adams, J.S., and Hewison, M. (2010). Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:471–8.
- Adorini, L., and Penna G. (2008). Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 4(8):404-12.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357(Pt 3), 593-615.
- Altman, D.G. (1999). *Practical Statistics for Medical Research*, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Fla.
- Amrani, A., Verdaguer, J., Thiessen, S., Bou, S., Santamaria, P. (2000). IL-1alpha, IL-1beta, and IFN-gamma mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4(+) T lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation*.105(4):459-468.
- Amsen, D., Spilianakis, C.G., and Flavell, R.A. (2009). How are T H1 and TH2 effector cells made?. *Current Opinion in Immunology*. 21:153–160.
- Annunziato, F., and Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther*. 11:257
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, E., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fiumani, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudizi, R., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine*. 204(8):849–1861.
- Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B., Rao, A. (2006). Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol*. 24:607-656.
- Arafa, R.M., Desouky, S.M., Emam, S.M., Abed, N.T., Mohamed. S.Y. (2015). Detection of Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen-4 Gene Polymorphism in Type 1 Diabetes Mellitus. *Egypt J Immunol*. 22(1):49-57.
- Aranow, C. (2011). Vitamin D and the immune system, *J. Invest. Med*. 59: 881–886.
- Aribi, M. (2011). Autoimmunity and Immunotherapy of Type 1 Diabetes. *Type 1 Diabetes-Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. Edited by Prof. David Wagner. 660: 3-46.
- Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., Aymeric, J-L. (2015). Macrophage bactericidal activities against staphylococcus aureus are enhanced In vivo by selenium supplementation in a dose-Dependent manner, *PLoS One*. 10 :e0135515,
- Aribi, M., Moulessehoul, S., Benabadi, A.B., Kendouci, M. (2004). HLA DR phenotypic frequencies and genetic risk of Type 1 diabetes in west region of Algeria, Tlemcen *BMC Genetics*. 5:24
- Aribi, M., Moulessehoul, S., Kendouci-Tani, M., Benabadi, A.B., Hichami, A., Khan, N.A. (2007). Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 13(8); 372-378.

Chapitre 4 : Bibliographie

Armbrecht, H.J., Boltz, M.A., Hodam, T.L. (2003). PTH increases renal 25(OH)D3-1 α -hydroxylase (CYP1a) mRNA but not renal 1,25(OH)2D3 production in adult rats. *Am. J. Physiol.-Renal.* 53:F1032–F1036.

Arnush, M., Scarim, A.L., Heitmeier, M.R., Kelly, C.B., Corbett, J.A. (1998). Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 160, 2684–2691.

Ascenzi, P., Bocedi, A., and Gradoni, L. (2003). The anti-parasitic effects of nitric oxide. *IUBMB Life* 55, 573-578.

Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., Michels, A.W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet.* Jan 4;383 (9911):69-82.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 27:669-92.

Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J.L., Dubin, P.J., Pilewski, J.M., Myerburg, M.M., Mason, C.A., Iwakura, Y., and Kolls, J.K. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine.* 14(3):275–281.

Awane, M., Andres, P.G., Li, D.J., and Reinecker, H.C. (1999). NF-kappa B inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 162, 5337-5344.

B

Bach, E. A., Szabo, S. J., Dighe, A. S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Murphy, K. M., and Benoist, C., and Mathis, D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 58, 1027-1033.

Bach, E.A., Szabo, S.J., Dighe, A.S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Murphy, K.M., Schreiber, R. D. (1995). Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets. *Science* 270, 1215-1218.

Bach, J.F. (2002 B). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 347:911-20.

Bach, J.F. (2002a). Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. *Arthritis Research.* 4(3):3-15.

Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., Mathieu, C. (2010). Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 10(4): p. 482-96.

Belvisi, M.G., Stretton, C.D., Yacoub, M., Barnes, P.J. (1992). Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 1992;210:221-222.

Benekli, M., Baer, M.R., Baumann, H., Wetzler, M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias, *Blood* 101: 2940–2954.

Bennett, S.T., Wilson, A.J., Cucca, F., Nerup, J., Pociot, F., McKinney, P.A., Barnett, A.H., Bain, S.C., Todd, J.A. (1996). IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus. *J Autoimmun.* 9(3):415-21.

Chapitre 4 : Bibliographie

- Berrih-Aknin, S., Eymard, B. (1999). Thymus et pathologies. *Médecine thérapeutique*.5(7):579-86.
- Beyerlein, A., Thiering, E., Pflueger, M., Bidlingmaier, M., Stock, J., Knopff, A., Winkler, C., Heinrich, J., Ziegler, A.G. (2014). Early infant growth is associated with the risk of islet autoimmunity in genetically susceptible children. *Pediatr Diabetes*. 15(7):534-42.
- Bingley, P.J. (2010). Clinical applications of diabetes antibody testing. *J Clin Endocrinol Metab*.95:25–33.
- Bonnechi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:19-134.
- Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A., and Doniach, D. (1974). Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 2(7892)1279-1283.
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, HF., Lieben, L., Mathieu, C., Demay, M. (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr. Rev.* 29: 726–776.
- Bouillon, R., Verlinden, L., Eelen, G., De Clercq, P., Vandewalle, M., Mathieu, C., Verstuyf, A. (2005). Mechanisms for the selective action of vitamin D analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 97(1-2):21-30.
- Bour-Jordan, H., Salomon, B.L., Thompson, H.L., Szot, G.L., Bernhard, M.R., Bluestone, J.A. (2004). Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 114(7):979-987.
- Bouvard B, Annveiller C, Sallé A, Beauchet O, Chappard D, Audran M, Legrand E. (2010). Les effets extra-osseux de la vitamine D: faits, questions et controverses. *Revue du rhumatisme*.77SA18–A25.
- Bradshaw, E.M., Raddassi, K., Elyaman, W., Orban, T., Gottlieb, P.A., Kent, S.C. (2009). Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950;183: 4432–4439.
- Brauner, H., Elemans, M., Lemos, S., Broberger, C., Holmberg, D., Flodström-Tullberg, M., Kärre, K., Höglund, P. (2010). Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 184, 2272–2280.
- Bredt, D.S., Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*.87:682-685.
- Broere, F., Sergei, G., Apasov, Sitkovsky M.V., and van Eden, W. (2011). T cell subsets and T cell-mediated immunity. F.P. Nijkamp and M.J. Parnham (eds.), *Principles of Immunopharmacology: 3rd revised and extended edition*.
- Busta, A., Alfonso, B., and Poretsky, L.(2011). Role of Vitamin D in the Pathogenesis and Therapy of Type 1 Diabetes Mellitus.chap 19, *Livre: Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. Edited by Chih-Pn Liu, ISBN 978-953-307-756-7, 482 pages, Publisher: In Tech, 21;470:403-422.

C

Chapitre 4 : Bibliographie

- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D.A., Stella, A. M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *NatRev Neurosci.* 8(10):766-75.
- Calderon, B., Suri, A., Unanue, E. R. (2006). In CD4+ T-cell-induced diabetes, macrophages are the final effector cells that mediate islet beta-cell killing: studies from an acute model. *Am J Pathol* 169: 2137–2147.
- Calò, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., et al. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis, *J. Cell. Physiol.* 197:157–168.
- Campbell, I.L., Iscaro, A., Harrison, L.C. (1988). IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol.* 141:2325-9.
- Cantor, J., and Haskins, K. (2007). Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1. *J. Immunol.* 179, 5760-5767.
- Cantorna, M., and Waddell, A. (2014). The vitamin D receptor turns off chronically activated T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1317:70–5.
- Cavallo, M.G., Fava, D., Monetini, L., Barone, F., Pozzilli, P. (1996). Cell-mediated immune response to beta casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet.* 348(9032):926-8.
- Chambers, E.S., Hawrylowicz, C.M. (2011). The impact of vitamin D on regulatory T Cells. *Curr Allergy Asthma Rep.* 11: 29–36.
- Chatila, T.A. (2005). Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 116(5):949-59 quiz 60.
- Chatzigeorgiou, A., Harokopos, V., Mylona-Karagianni, C., Tsouvalas, E., Aidinis, V., Kamper, E.F. (2010). The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Ann Med.* 42(6):426-38.
- Chen, S., Sims, G.P., Chen, X.X., Gu, Y.Y., Chen, S., Lipsky, PE. (2007). Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D on human B cell differentiation. *J Immunol* 179: 1634–1647.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine.* 198(12):1875– 1886.
- Chi, H., Bogwald, J., Dalmo, R.A., Zhang, W., Hu, Y.H. (2016). Th17 master transcription factors ROR α and ROR γ regulate the expression of IL-17C, IL-17D and IL-17F in *Cynoglossus semilaevis*. *Dev Comp Immunol.* 55:169-78.
- Chuster, I. (2011). Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814: 186–199.
- Collins, M., Ling, V., and Carreno, B.M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* 6(6):223.

Chapitre 4 : Bibliographie

Comité d'experts en diabétologie. (2015). Guide de bonnes pratiques en diabétologie à l'usage des praticiens.

Côrte-Real, J., Duarte, N., Tavares, L., Penha-Gonçalves, C. (2009). Autoimmunity triggers in the NOD mouse: a role for natural auto-antibody reactivities in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.*1173:442-8.

Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, Chiodetti, L., Young, H.A., Hu-Li, J., Zhu, J., Paul, W.E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101(11): 3880–85

Couper, J.J., Steele, C., Beresford, S., Powell, T., McCaul, K., Pollard, A. (1999). Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes.* 48:2145-9.

Coussens, A., Timms, P.M., Boucher, B.J., Venton, T.R., Ashcroft, A.T., Skolimowska, K.H., Newton, S.M., Wilkinson, K.A., Davidson, R.N., Griffiths, C.J., Wilkinson, R.J., Martineau, A.R. (2009). 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits matrix metalloproteinases induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology.*127:539-48.

Crane, B.R., Rosenfeld, R.J., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Ghosh, S., Tainer, J.A., DeGroot, C.J.A., Ruuls, S.R., Theeuwes, J.W.M., Dukstra, C.D., van der Valk P. Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.*56:10-20.

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.P., D'Cruz, D., Casanova, J.L., Trouillet, C., Geissmann, F. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 24;33(3):375-86.

Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, WKwan, S., Churakova, T. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744–748.

D

Dabelea, D. (2009). The accelerating epidemic of childhood diabetes, *Lancet Lond. Engl.*373;1999–2000.

Dahlen, E., Dawe, K., Ohlsson, L., and Hedlund, G. (1998). Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol.* 160:3585–3593.

Dahlén, E., Dawe, K., Ohlsson, L., Hedlund, G. (1998). Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol.* 160(7):3585-93.

D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonocchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells, *J Immunol* 161, 5111-5.

Chapitre 4 : Bibliographie

Danescu, L.G., Levy,S., Levy,J. (2009). Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine*.35(1):11-7.

Davenport, C., Radford, P.M., Al-Bukhari, T.A., Lai, M., Bottazzo, G.F., Todd, I. (1998). Heterogeneity in the occurrence of a subset of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in autoimmune polyendocrine patients with islet cell antibodies. *Clinical and Experimental Immunology*. 111(3): 497-505.

Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*.7(9):684-700.

Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*.47(5):450–455.

Deluca, H.F., and Cantorna, M.T. (2001). Vitamin D: its role and uses in immunology, *FASEB. J.* 15: 2579–2585.

Dickensheets H.L., Venkataraman C., Schindler U., Donnelly R.P. (1999) .Interferons inhibit activation of STAT6 by interleukin 4 in human monocytes by inducing SOCS-1 gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:10800–10805.

DiLorenzo, T.P., Peakman, M. and Roep, B.O. (2007). Translational mini-review series on type 1 diabetes: systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*. 148 (1):1-16.

Doucet, C., Brouty-Boye, D., Pottin-Clemenceau, C., Jasmin, C., Canonica, G.W., and Azzarone, B. (1998). IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *International Immunology*. 10(10):1421–33.

Dromei, J.A., Lee, B.H., Yu, H., Young H.E., Thearle, D.J, Jensen, K.P., et al. (2011). Generation and expansion of regulatory human CD4(+) T-cell clones specific for pancreatic islet autoantigens. *J. Autoimmun.* 36: 47–55,

Dubois-Laforgue, D. (2007). Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1. *Endocrinologie-Nutrition*. 10-366-C-10

Duncan, A.J., and Heales, S.J.R. (2005). Nitric oxide and neurological disorders. *Mol. Aspects Med* 26, 67-96.

DuPage, M., and Bluestone, J.A. (2016). *Nature Reviews Immunology* 16, 149–163.

Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 289(1):F8-28.

E

Eisenstein, E.M., Williams, C.B. (2009). The Treg/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatr Res*. May;65(5 Pt 2):26R-31R.

Eizirik, D.L., Colli, M.L., Ortis, F. (2009).The role of inflammation ininsulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes, *Nat. Rev. Endocrinol.* 5: 219–226.

Chapitre 4 : Bibliographie

El-Gayar,S., Thuring-Nahler,H., Pfeilschifter, J., Rollinghoff, M., Bogdan, C. (2003). Translational control of inducible nitricoxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J Immunol* 171:4561–8.

Erbagci, A.B., Tarakçioğlu, M., Coşkun, Y.,Sivasli, E., Namiduru, E.S. (2001). Mediators of inflammation in children with type 1 diabetes mellitus: cytokines in type 1 diabetic children. *Clinical Biochemistry*. 34(4):645-650.

F

Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. (2006). Peacekeepers of the immune system. *Sci Am*. 295(4):56-63.

Fiset, P.O., Tulic, M.K., Skrabin, P.S.A., Grover, S.M., Létuvé, S., Mazer, B.D., et al. (2006). Signal transducer and activator of transcription 6 down-regulates toll-like receptor-4 expression of a monocytic cell line, *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc.Allergy Clin. Immunol*. 36:158–165,

Fitch, F. W., McKisic, M. D., Lancki, D. W., and Gajewski, T. F. (1993). Differential regulation of murine T lymphocyte subsets, *Annu Rev Immunol* 11, 29-48.

Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr,A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Developmental regulation of Fox3 expression during ontogeny. *The Journal of experimental medicine* 202, 901-906.

Fronczak, C.M., Barón, A.E., Chase, H.P., Ross, C., Brady, H.L., Hoffman, M., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., Norris, J.M. (2003). In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes Care*. 26:3237-42.

Frucht, D.M., Aringer, M., Galon, J., Danning, C., Brown, M., Fan, S., et al. (2000). Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation, *J. Immunol. Baltim. Md. 1950*. 164: 4659–4664.

Fuchtenbusch, M., Ziegler, A.G., Hummel, M. (2004). Elimination of dietary gluten and development of type 1 diabetes in high risk subjects. *Rev Diabet Stud*. 1(1): 39-41.

Fujio, K., Okamura, T., and Yamamoto, K. (2010). The family of IL10-secreting CD4+ T cells. *Advances in Immunology*. 105:99-130.

G

Gaffen, S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*. 9(8):556– 567.

Gaillard, O., and Desbène, C. (2013). Immunoanalytical characteristics of vitamin D (25(OH)D and 1,25(OH)₂D). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 28(1):84–90.

Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., Palmer D.C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S.E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., Restifo, N.P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8 Tcells. *Journal of Clinical Investigation*.115(6):1616–26.

Gauzzi, M.C., Purificato, C., Donato, K., Jin, Y., Wang, L., Daniel, K.C., et al. (2005). Suppressive effect of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol*. 174: 270–6.

Chapitre 4 : Bibliographie

- Geenen, V., Kecha, O., Brilot, F., Martens, H., Lefebvre, P. (2000). Le rôle du thymus dans la physiopathologie du diabète de type 1. *Bull Acad Royale Médecine*. 155 : 237-244.
- Geenen, V., Brilot, F., Louis, C., Hansenne, I., Renard, C.h., Martens, H. (2005). Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes. *Rev Med Liege*. 60 (5-6):291-6.
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*.19(1):71-82.
- Georgiou, H.M., Mandel, T.E. (1995). Induction of insulinitis in athymic (nude) mice. The effect of NOD thymus and pancreas transplantation. *Diabetes*. 44 : 49-59.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., O'shea, J.J. (2009). Janus kinases in immune cell signaling, *Immunol. Rev*. 228:273–287.
- Giarratana, N., Penna, G., Amuchastegui, S., Mariani, R., Daniel, K.C., Adorini, L. (2004) . A vitamin D analog down-regulates proinflammatory chemokine production by pancreatic islets inhibiting T cell recruitment and type 1 diabetes development. *J. Immunol. Baltim. Md*. 1950 173: 2280–2287.
- Giellis, J. F., Lin, J. Y., Wingler, K., Van Schil, P.E., Schmidt, H.H., Moens, A.L. (2011). Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radic Biol Med*. 1;50(7):765-76.
- Gilliam, L.K., Palmer, J.P. and Lernmark, Å. (2004). Autoantibodies and the disease process of type 1 diabetes mellitus, In: *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, D. LeRoith, S.I. Taylor and J.M., Olefsky, (Eds), 499-518, Lippincott, ISBN 0-7817-4097-5(hc), Philadelphia PA 19106, USA.
- Gitelman, S.E., and Bluestone, J.A. (2016). Regulatory T cell therapy for type 1 diabetes: May the force be with you. *Journal of Autoimmunity*. *J Autoimmun*.71:78-87.
- Giulietti A., Gysemans C., Stoffels K., van Etten E., Decallonne B., Overbergh L., Bouillon R., Mathieu C. (2004a). Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 47, 451–462.
- Giulietti, A., Stoffels, K., Decallonne, B., Overbergh, L., Mathieu, C. (2004b). Monocytic expression behavior of cytokines in diabetic patients upon inflammatory stimulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*.1037(1):74-78.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. Jan;3(1):23-35.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 5:953-64.
- Grage-Griebenow, E., Flad, H.D., Ernst, M. (2001). Heterogeneity of human peripheral bloodmonocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 69:11-20.
- Graser, R.T., DiLorenzo, T.P., Wang, F., Christianson, G.J., Chapman, H.D., Roopenian, D.C., Nathenson, S.G., Serreze, D.V. (2000). Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 164(7):3913-3918.
- Green, E.A., Wong, F.S., Eshima, K., Mora, C., Flavell, R.A. (2000). Neonatal tumor necrosis factor alpha promotes diabetes in nonobese diabetic mice by CD154-independent antigen presentation to CD8(+) T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 191(2):225-238.

Chapitre 4 : Bibliographie

Gregori, S., Giarratana, N., Smirolto, S., Uskokovic, M., Adorini, L. (2002). A 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 51:1367–1374.

Griffin, M.D., Xing, N., Kumar, R. (2003). Vitamin D, its analogs as regulators of Immune activation and antigen presentation, *Annu. Rev. Nutr.* 23:117–145.

Groen, H., Klatter, F., Pater, J., Nieuwenhuis, P., Rozing, J. (2003). Temporary, but essential requirement of CD8⁺ T cells early in pathogenesis of diabetes in BB rats as revealed by thymectomy and CD8 depletion. *Clin Dev Immunol.* 10(2-4):141-51.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589-601.

Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., et al. (1998) Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 274: 177–188.

Guillausseau, P.J. (1997). Classification and diagnostic criteria of diabetes: propositions of ADA and WHO. *Diabetes Metab.* 23(5):454-5.

Gur, C., Porgador, A., Elboim, M., Gazit, R., Mizrahi, S., Stern-Ginossar, N., Achdout, H., Ghadially, H., Dor, Y., Nir, T., Doviner, V., Hershkovitz, O., Mendelson, M., Naparstek, Y., Mandelboim, O. (2010). The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nature Immunol.* 11:121–128.

Gusdon, A.M., Corbett, J.A., Mathews, C.E., (2006). Type 1 diabetes: islet inflammation the contribution of cytokines and beta cells, *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 3: 367–372.

H

Hagopian, W.A., Karlsen, A.E., Gottsäter, A., Landin-Olsson, M., Grubin, C.E., Sundkvist, G., Petersen, J.S., Boel, E., Dyrberg, T., Lernmark, A. (1993). Quantitative assay using recombinant human islet glutamic acid decarboxylase (GAD65) shows that 64k autoantibody positivity at onset predicts diabetes type. *The Journal of Clinical Investigation.* 91(1):368.

Hahn, H.J., Kuttler, B., Mathieu, C., Bouillon, R. (1997). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduces MHC antigen expression on pancreatic beta-cells in vitro, *Transplant. Proc.* 29: 2156–2157.

Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O. (1992). Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 90:1901-10.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol* 6, 1123–1132.

Chapitre 4 : Bibliographie

Haviarová, Z., Janegová, A., Janega, P., Durdík, S., Kováč, P., Stvrtinová, V., Mráz, P. (2011). Expression of Constitutive Nitric Oxide Synthase Isoforms in Varicose Vein Wall; Preliminary Results International Journal of Vascular Medicine. 2011:204723.

Healey, D., Ozegbe, P., Arden, S., Chandler, P., Hutton, J., Cooke, A. (1995). In vivo activity and in vitro specificity of CD4+ Th1 and Th2 cells derived from the spleens of diabetic NOD mice. J Clin Invest. 95(6):2979-85.

Hiroi, M., Sakaeda, Y., Yamaguchi, H., Ohmori, Y. (2013). Anti-inflammatory cytokine interleukin-4 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription, Mediators Inflamm. 2013; 369-693.

Ho, I. C., Lo, D., and Glimcher, L. H. (1998). c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms., J Exp Med 188, 1859-66.

Hoeldtke, R.D. (2003). Nitrosative stress in early type 1 diabetes david H. P. streeten memorial lecture, Clin. Auton Res. 13: 406–421.

Hoenderop, J.G.J., Nilius, B., Bindels, R.J.M. (2005). Calcium absorption across epithelia. Physiol. Rev. 85(1):373–422.

Holick, M.F. (1994). McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. Am J Clin Nutr.60(4):619-30.

Holick, M.F. (2006). High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. Mayo Clin Proc. 81(3):353–73.

Holick, M.F. (2007). Vitamin D deficiency. N. Engl. J. Med. 357:266–281.

Holick, M.F., and Garabedian, M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. (2006). In: Favus MJ, editor. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Washington: American Society for Bone and Mineral Research. 106–14.

Honeyman, M., Wasserfall, C., Nerup, J., and Rossini, A. (1997). Prediction and prevention of IDDM. Diabetologia. 40:B58-B61.

Honkanen, J., Nieminen, J.K., Gao, R., Luopajarvi, K., Salo, H.M., Ilonen, J., Knip, M., Otonkoski, T. & Vaarala, O. (2010). IL-17 immunity in human type 1 diabetes. Journal of Immunology. 185(3)1959-1967.

Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L., and Glimcher, L.H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. Science. 307(5708):430–433,

Hyppönen, E., Läärä, E., Reunanen, A., Järvelin, M.R., Virtanen, S.M. (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study, Lancet Lond. Engl. 358:1500–1503.

I

In't Veld, P. (2011). Insulinitis in human type 1 diabetes: the quest for an elusive lesion. Islets. 3:131–38.

Chapitre 4 : Bibliographie

International Diabetes Federation (2013). Diabetes atlas. 6th edition;. (<http://www.idf.org/atlasmap/atlasmap>).

International Diabetes Federation (2015). Diabetes Atlas. 7th edition. (<http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>).

International Expert Committee. (2009). International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 32:1327–34.

Isidro,R.A., Appleyard,C.B.(2016).Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.1;311(1):G59-73.

Itoh, N., Hanafusa, T., Miyazaki, A., Miyagawa, J., Yamagata, K., Yamamoto, K., Waguri, M., Imagawa, A., Tamura, S., Inada, M., Kawata, S., Tarui, S., Kono, N. and Matsuzawa, Y. (1993). Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *The Journal of Clinical Investigation*. 92(5):2313-2322.

J

Jaeckel, E., Manns, M., Von Herrath, M. 2002. Viruses and diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 958:7-25.

Janeway, C. (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th ed, New York: Garland Science. xxiii, 823 p.

Jeffery, L.E., Burke, F., Mura, M., Zheng, Y., Qureshi, O.S., Hewison. (2009).1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3, *J. Immunol. Baltim. Md*. 1950.183; 5458–5467.

Jetten, A.M. (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*.7:e003.

Jonuleit,H., and Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*.15;171(12):6323-7.

Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., and Pelletier, J.P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*.160, 3513-3521.

Jurutka, P.W., Bartik, L., Whitfield, G.K., Mathern, D.R., Barthel, T.K., Gurevich, M., Hsieh, J.C., Kaczmarek, M., Haussler, C.A., Haussler, M.R. (2007). Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands. *J Bone Miner Res*. 22(2):2-10.

Jutel, M., and Akdis, C. (2008). T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chemical Immunology and Allergy*. 94(158):177.

K

Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., Grusby, M.J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*. 4: 313–319.

Chapitre 4 : Bibliographie

Kapur, S., Bédard, S., Marcotte, B., Côté, CH., and Marette, A. (1997). Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes*.46(11):1691- 700.

Karlsson Faresjö, M.G.E., Ernerudh, J., Ludvigsson, J. (2004). Cytokine profile in children during the first 3 months after the diagnosis of type 1 diabetes, *Scand. J.Immunol.* 59: 517–526.

Khosla, S. 2001. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology.* 1;142(12):5050–5.

Kida, K., Kaino, Y., It, o T. and Hirai, H. (1998). Controversies on the prevention of insulindependent diabetes mellitus by immunomodulation: lessons from NOD mice treated with beta-1,6;1,3-D-glucan and rhIGF-I. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*, (11)2:327-333.

Kim, J.I., Ho I.C., Grusby M.J., and Glimcher L.H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity*.10(6):745–51.

Kim, J.H., Lee, C.G., Lee, Y.A., Yang, S.W., Shin, C.H. (2016). Increasing incidence of type 1 diabetes among Korean children and adolescents: analysis of data from a nationwide registry in Korea. *Pediatr Diabetes*. 17(7):519-524.

Kimura, T., Naka, K., Nohara, Y., Fujii-Kuriyama., and T. Kishimoto. (2008). Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.105(28):9721–9726.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirmsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol*.9(12): 833-44.

Ko, K.S., Lee, M., Koh, J.J. & Kim, S.W. (2001). Combined administration of plasmids encoding IL-4 and IL-10 prevents the developments of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy.* 4(4):313-316.

Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S., Stamler, J.S. (1994). Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*.372:546-548.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10, *J Exp Med* 184, 741-6.

Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W.F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Kubo, M., Satake, M. (2009). The Runx3 transcription factor augments Th1 and down-modulates Th2 Phenotypes by interacting with and attenuating GATA3. *Journal of Immunology*.183(12):7817–7824.

Kolb H. (1997). Benign versus destructive insulinitis, *Diabetes. Metab. Rev.* 13:139–146.

Kolb, H., Kolb-Bachofen, V.(1992). Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol.* 13:157-60.

Komine, O., Hayashi, K., Natsume, W., Watanabe, T., Seki, Y., Seki, N., Yagi, R., Sukzuki, W., Tamauchi, H., Hozumi, K., Habu, S., Kubo, M., Satake, M. (2003). The Runx1 transcription factor

Chapitre 4 : Bibliographie

inhibits the differentiation of naive CD4 T cells into the Th2 lineage by repressing GATA3 expression. *Journal of Experimental Medicine*.198(1):51–61.

Kretowski, A., Mysliwiec, J., Kinalska, I. (2000) In vitro interleukin-13 production by peripheral blood in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus and their first degree relatives. *Scand. J. Immunol.* 51:321–325.

Kristiansen, O.P., and Mandrup-Poulsen, T. (2005). Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?. *Diabetes.* 54(2):114- 124.

Kubes, P., McCafferty, D.M. (2000). Nitric oxide and intestinal inflammation, *Am. J. Med.*109 :150–158.
Kuhn, R., Rajewsky, K., and Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice, *Science* 254, 707-10.

Kulmala, P., Savola, K., Petersen, J.S., Vähäsalo, P., Karjalainen, J., Löppönen, T., Dyrberg, T., Akerblom, H.K., Knip, M. (1998). Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *The Journal of Clinical Investigation.* 101(2): 327-336.

L

Lang, P.-O. (2013). The immunomodulating role of Vitamin D: What is its place in the protection against infections?. *NPG Neurologie-Psychiatrie-Gériatrie.* 13,71—78.

Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine.* 201(2):233–240.

Laverny, G., Penna, G., Vetrano, S., Correale, C., Nebuloni, M., Danese, S., et al. (2010). Efficacy of a potent and safe vitamin D receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease, *Immunol. Lett.* 131 49–58.

Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G.Y., Nizet, V., Karin, M. (2005). IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature.*434 (7037):1138-1143.

Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R.J., Morris, S.M., Ratan, R.R., (2003). Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA.*100:4843–8.

Lee, L.F., Xu, B., Michie, S.A., Beilhack, G.F., Warganich, T., Turley, S., and McDevitt, H.O. (2005). The role of TNF- α in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*102(44):15995-16000.

Lehuen, A., Diana, J., Zacccone, P., Cooke, A. (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature Reviews Immunology.* 10:501-513.

Lenschow, D.J., Ho, S.C., Sattar, H., Rhee, L., Gray, G., Nabavi, N., Herold, K.C., Bluestone, J.A. (1995). Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *The Journal of Experimental Medicine.*181(3):1145-1155.

Chapitre 4 : Bibliographie

Leonard, W.J., and Spolski, R. (2005). Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature Reviews Immunology*. 5(9):688–698.

Levy-Weil, F.E. (2010). La vitamine D en rhumatologie. *Feuill Biol*. 29:445—51.

Li, J., Xiao, B, Xiang, Yu. (2014). Immune Function of Vitamin D in Type 1 Diabetes Mellitus. *International Journal of BioMedicine*. 4(2):67-71

Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T cell produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26, 579-591.

Liaskou, E., Wilson, D.V., Oo, Y.H. (2012). Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm*. 2012:949157.

Lieben, L., Carmeliet, G., Masuyama, R. (2011). Calcemic actions of vitamin D: Effects on the intestine, kidney and bone. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 25:561–72.

Like, A.A., Kislaukis, E., Williams, R.M., Rossini, A.A. (1982). Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB:W rat. *Science*. 216:644-646.

Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *The Journal of experimental medicine* 194, 127-134.

Lips, P. (2006). Vitamin D physiology. *Prog Biophys Molecular Biol*. 92:4-8.

Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., Goodnow, C.C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol*. 4 : 350-354.

Liston, A., Lesage, S., Gray, D.H., O'Reilly, L.A., Strasser, A., Fahrner, A.M., Boyd, R.L., Wilson, J., Baxter, A.G., Gallo, E.M., Crabtree, G.R., Peng, K., Wilson, S.R., Goodnow, C.C. (2004). Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity*. 21(6):817-30.

Little, F.F., Cruikshank, W.W., and Center, D.M. (2001). IL-9 stimulates release of chemotactic factors from human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 25(3):347–352.

Liu, X., Turban, S., Carter, R.N., Ahmad, S., Ramage, L., Webster, S.P., et al. (2014). β -Cell-Specific glucocorticoid reactivation attenuates inflammatory β -Cell destruction. *Front. Endocrinol*. 5: 165.

Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., and Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes, *Nature* 391, 344-5.

Lorenc, R., Kaczmarewicz, E., Kryskiewicz, E., Pludowski, I.P. (2012). Vitamin D provision and supplementation standards. *Standardy Medyczne. Pediatria*. 9: 595-604.

Lourenço, E. V., La Cava, A. (2011). Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity*. 44(1): 33–42.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, Article ID 925135, 12 pages.

Chapitre 4 : Bibliographie

Ludvigsson, J., Faresjö, M., Hjorth, M., Axelsson, S., Chéramy, M., Pihl, M., et al. (2008). GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes, *N. Engl.J. Med.* 359: 1909–1920.

M

Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., Mayer-Davis, E. J. (2010). Chapter 1: Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 39(3): 481–497.

Mai, J., Wang, H., Yang, XF. (2010). Th 17 cells interplay with Foxp3+ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity. *Front Biosci.*1;15:986-1006.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677-86.

Martin, A.P., Rankin, S., Pitchford, S., Charo, I.F., Furtado, G.C., Lira, S.A. (2008). Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes. *Diabetes.* 57;3025–3033.

Martin, P., and Moscat, J. (2012). Th1/Th2 Differentiation and B Cell Function by the Atypical PKCs and Their Regulators. *Front Immunol.*6(3):241.

Marwaha, A.K., Crome, S.Q., Panagiotopoulos, C., Berg, K.B., Qin, H., Ouyang, Q., et al. (2010). Cutting edge: increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950.185 : 3814–3818.

Masuda, S., Byford, V., Arabian, A., Sakai, Y., Demay, M.B., St-Arnaud, R., Jones, G. (2005). Altered pharmacokinetics of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in the blood and tissues of the 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (Cyp24a1) null mouse. *Endocrinology.*146(2):825-34.

Mathieu, C., Waer, M., Casteels, K., Laureys, J., Bouillon, R. (1995). Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25-dihydroxyvitamin D3, KH1060. *Endocrinology* 136, 866–872

Mathieu, C. (2011). Vitamin D and the Immune System: Getting It Right. *IBMS BoneKEy.* 8(4):178-186.

Mathieu, C., Gysemans, C. (2006). Vitamin D and diabetes. *Av Diabetol.* 2006; 22(3): 187-193.

Mathieu, C., Waer, M., Laureys, J., Rutgeerts, O., Bouillon, R. (1994). Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D. *Diabetologia.*37:552-8.

Mathis D., Benoist C. (2004). Back to central tolerance. *Immunity.* 20. 509–516.

McCollum, E.V., Simmonds, N., Becker, J.E., Shipley, P.G. (1922). Studies on Experimental Rickets Xxi. An Experimental Demonstration of the Existence of a Vitamin Which Promotes Calcium Deposition. *J. Biol. Chem.*53:293–312.

McGeachy, M. J., and Cua, D. J. (2007). The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. *Semin. Immunol* 19, 372–376.

Chapitre 4 : Bibliographie

McGregor, C.M., Schoenberger, S.P., Green, E.A. (2004). CD154 is a negative regulator of autoaggressive CD8⁺ T cells in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(25):9345-9350.

Mehers, K.L., Gillespie, K.M. (2008). The genetic basis for type 1 diabetes. *Br Med Bull*. 88(1):115-29.

Miossec, P. (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect*. 11, 625–630.

Mire-Sluis, A.R., Das, R.G. and Lernmark, Å. (2000). The World Health Organization International Collaborative Study for Islet Cell Antibodies. *Diabetologia*. 43(10):1282.

Miyara, M., Ito, Y., Sakaguchi, S. (2014). TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 10(9):543-51.

Modolell, M., Corralizal, M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase / arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol*. 25:1101–4.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1 deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.

Monnier, L., and Fumat, C. (2010). *Diabétologie*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson.

Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T.R. (1993). Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol*. 11:165–190.

Mora, J.R., Iwata, M., von Andrian, U.H. (2008). Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 8: 685–698.

Morgan, M.J., and Liu Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling, *Cell Res*. 21:103–115.

Morris, S.M. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 22: 87-105.

Moser, M., Murphy, K.M. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development, *Nat. Immunol*. 1:199–205.

Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu Rev Immunol* 7, 145.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 8(12):958-69.

Mukherjee, G., and D'Irenzo, T.P. (2010). The immunotherapeutic potential of dendritic cells in type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*. 161(2);197-207.

Chapitre 4 : Bibliographie

Mukherjee, R., Barman, K. P., Thatoi, K. P., Tripathy, R., Das, K. B, Ravindran, B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* 11;5:13886.

Munder, M. (2009). Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system, *Br. J. Pharmacol.* 158: 638–651.

Muntoni, S., Cocco, P., Muntoni, S., Aru, G. (2006). Nitrate in community water supplies and risk of childhood type 1 diabetes in Sardinia, Italy. *Eur J Epidemiol.* 21(3):245-7.

Muraille, E., Leo, O., Moser, M. (2014). TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escapemechanism? *Front Immunol.* 26;5:603.

Murray, H.W., Rubin, B.Y., and Carriero, S.M. (1985). Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: Oxygendependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology.*134(3):1982–1988.

N

Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, JA., Ploegh, H., Peters, C., Rudensky, A.Y. (1998). critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, 280(5362):450-3.

Nishikawa, H., Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer.* 127(4):759-767.

Noorchashm, H., Lieu, Y.K., Noorchashm, N., Rostami, S.Y., Greeley, S.A., Schlachterman, A., Song, H.K., Noto, L.E., Jevnikar, A.M., Barker, C.F., Najji, A. (1999). I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 163(2):743-50.

Norcross, M.A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol.* 135D(2):113-34.

Norris, J.M., Pietropaolo, M. (1999). Controversial topics series: Milk proteins and diabetes. *J. Endocrinol. Invest.* 22: 568-580.

Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., Aribi M. (2016). Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*, *Int.Immunopharmacol.* 30:94–101.

Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M., et al. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480–483.

O

O'Neill, S.K., Liu, E., and Cambier, J.C. (2009). Recent progress confirms a critical role for B cells in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 16(4):293-8.

Chapitre 4 : Bibliographie

Ochoa, J.B., Bernard, A.C., O'Brien, W.E., Griffen, M.M., Maley, M.E., Rockich, A.K., Tsuei, B.J., Boulanger, B.R., Kearney, P.A., Morris, S.M. (2001). Arginase I Expression and Activity in Human Mononuclear Cells After Injury. *ANNALS OF SURGERY*. 233(3): 393–399.

O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 8, 275-83.

Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Ehrlich, L.R., Bour-Jordan, H., Santamaria, P., Bluestone, J.A., Lanier, L.L. (2004). NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity*. 20(6):757-767.

Okubo, Y., Torrey, H., Butterworth, J., Zheng, H., and Faustman, D.L. (2016). Treg activation defect in type 1 diabetes: correction with TNFR2 agonism. *Clin Transl Immunology*. 5(1): e56.

OMS. (2014). Diabète. Disponible sur : http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/fr/

OMS. Le diabète. WHO. 2012. Disponible en ligne: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html>

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*. 29:71–109.

Overbergh, L., Decallonne, B., Waer, M., Rutgeerts, O., Valckx, D., Casteels, K.M., Laureys, J., Bouillon, R., Mathieu, C. (2000). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ induces an autoantigen-specific T-helper1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes*.49(8):1301-7.

P

Palmer, J.P., Asplin, C.M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P.K., Paquette, T.L. (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science (New York, N.Y)*. 222 (4630):1337-1339.

Papaccio, G., Pisanti, F.A., Montefiano, R.D., Graziano, A., Latronico, M.V.G. (2002). Th1 and Th2 cytokines exert regulatory effects upon islet microvascular areas in the NODmouse; *J.Cell.Biochem*.86:651–664.

Parsa, R., Andresen P., Gillett A., Mia S., Zhang X-M., Mayans S., et al. (2012). Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice, *Diabetes* 61:2881–2892.

Pedullà M., Desiderio V., Graziano A., d'Aquino R., Puca A., Papaccio G. (2007) . Effects of a vitamin D3 analog on diabetes in the bio breeding (BB) rat, *J. Cell. Biochem*. 100: 808–814.

Peelen, E., Knioppenberg, S., Muris, A.H., Thewissen, M., Smolders, J., Tervaert, J.W., Smolders, J., Tervaert, J.W., Hupperts, R., Damoiseaux, J. (2011). Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmun Rev*.10:733–43.

Pérez De Nanclares, G., Bilbao, J.R., Calvo, B., Vitoria, J.C., Vázquez, F., Castaño, L. (2003). 5'-Insulin gene VNTR polymorphism is specific for type 1 diabetes: no association with celiac or Addison's disease. *Ann N Y Acad Sci*.1005:319-23.

Chapitre 4 : Bibliographie

Pescovitz, M.D., Greenbaum, C.J., Krause-Steinrauf, H., Becker, D.J., Stephen, E.G., Goland, R., Gottlieb, P.A., Marks, J.B., McGee, P.F., Moran, A.M., Raskin, P., Rodriguez, H., Schatz, D.A., Wherrett, D., Wilson, D.M., Lachin, J.M., and Skyler, J.S. (2009). Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med.* 361:2143-2152.

Poligone, B., Weaver, D.J., Sen, P., Baldwin, A.S., Tisch, R. (2002). Elevated NF- κ B activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J. Immunol.* 168, 188–196.

Ponsonby, A-L., McMichael, A., van der Mei, I. (2002). Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology.* 181-182:71- 8.

Prabhakar, U., Eirikis, E., Reddy, M., Silvestro, E., Spitz, S., Pendley, C., et al. (2004). Validation and comparative analysis of a multiplexed assay for the simultaneous quantitative measurement of Th1/Th2 cytokines in human serum and human peripheral blood mononuclear cell culture supernatants, *J. Immunol. Methods* 29:27–38.

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

R

Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L. (2007). Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes, *Cell Biochem. Biophys.* 48:159–163.

Rachez, C., Freedman, L.P. (2000). Mechanisms of gene regulation by vitamin D (3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene.* 246: 9–21.

Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., and Moncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *The Lancet* 330, 1057-1058.

Raine, T., Zaccane, P., Mastroeni, P., Cooke, A. (2006). Salmonella typhimurium infection in nonobese diabetic mice generates immunomodulatory dendritic cells able to prevent type 1 diabetes. *J Immunol.* 177(4):2224-33.

Rao, K.M. (2000). Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*3(1): 27-58.

Rapoport, M.J., Bistrizter, T., Aharoni, D., Weiss, M., Ramot, Y., Buchs, A., et al.(2005). TH1/TH2 Cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients. *Cytokine.* 30. 219–227.

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol.* 27;5:532.

Redondo, M.J., and Eisenbarth, G.S. (2002). Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes and associated disorders. *Diabetologia.* 45:605-622.

Reiling N., Ulmer A.J., Duchrow M., Ernst M., Flad H.D, Hauschildt S. (1994). Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur. J. Immunol.* 24:1941–1944.

Chapitre 4 : Bibliographie

Riachy R., Vandewalle B., Moerman E., Belaich S., Lukowiak B., Gmyr V., et al. (2006) . 1,25-Dihydroxyvitamin D3 protects human pancreatic islets against cytokine-induced apoptosis via down-regulation of the Fas receptor, *Apoptosis Int. J. Program Cell Death*.11: 151–159.

Riachy, R., Vandewalle, B., Belaich, S., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Zerimech, F., et al. (2001). Beneficial effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on cytokine-treated human pancreatic islets. *J Endocrinol*.169(1):161–8.

Ricciardolo, F.L., Sterk, P.J., Gaston, B., Folkerts, G. (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 84: 731-65

Richardson, A., Fedoroff, S. (1997). Quantification of cells in culture, in: S. Fedoroff, A. Richardson (Eds.), *Protoc. Neural Cell Cult*, Humana Press, Totowa, NJ. 219–233.

Riley, W.J., Maclaren, N.K., Krischer, J., Spillar, R.P., Silverstein, J.H., Schatz, D.A., Schwartz, S., Malone, J., Shah, S. and Vadheim, C. (1990). A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *The New England Journal of Medicine*. 323(17):1167-1172.

Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S. B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., and O'Garra, A. (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB, *Immunity* 7, 571-81.

Romagnani, S.(1992). Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the natural immune response?. *Immunol Today*:13:379-81.

Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., and Levings, M.K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev*.182:68.

Rothenberg, M.E., and Hogan, S.P. (2006). The eosinophil. *Annual review of immunology* 24,147-174.

Rouzaut A., Subirá M.L., de Miguel C., Domingo-de-Miguel E., González A., Santiago E., et al. (1999). Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO, *Biochim. Biophys. Acta*. 1451: 319–333.

Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., Wagner, U. (2012). The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum*. 64(3):671-7.

Russell, M.A., and Morgan, N.G. (2014). The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic β -cell, *Islets* 6:e950547.

Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J.N., Wynn, T.A., Murray, P.J. (2001). Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol*.166: 2173-7.

S

Sad, S., Marcotte, R., and Mosmann, T.R. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2, 271-279.

Sadeghi, K., Wessner, B., Laggner, U., Ploder, M., Tamandl, D., Friedl, J., Zügel, U., Steinmeyer, A., Pollak, A., Roth, E., Boltz-Nitulescu, G., Spittler, A. (2006). Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR

Chapitre 4 : Bibliographie

expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol*.36:361-70.

Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266, 1208-1212.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., Nomura, T. (2006). Foxp3+CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews*. 212:8–27.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 155(3):1151-64.

Savino, A., Pelliccia, P., Schiavone, C., Primavera, A., Tumini, S., Mohn, A. (2006). Serum and urinary nitrites and nitrates and Doppler sonography in children with diabetes, *Diabetes Care* 29:2676–2681.

Schmidt, A., Oberle, N., and Krammer, P.H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology* 3, 51.

Schoindre, Y., Terrier, B., Kahn, J.E., Saadoun, D., Souberbielle, J-C., Benveniste, Amoura, O.Z. Piette J-C, Cacoub, P., Costedoat-Chalumeau, N. (2012a). Vitamine D et auto-immunité. Première partie : aspects fondamentaux/La Revue de médecine interne. 33 :80–86

Schoindre, Y., Terrier, B., Kahn, J.-E., Saadoun, D., Souberbielle, J.-C, Benveniste, O., Piette, J.-C, Cacoub, P., Costedoat-Chalumeau, N. (2012b). Vitamin D and autoimmunity. Second part: Clinical aspects. *La Revue de médecine interne*. 33 :87–93

Schwalfenberg, G.K. (2011). A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Mol Nutr Food Res*.55(1):96-108.

Seay, H. R., Yusko, E., Rothweiler, S. J., Zhang, L., Posgai, A.L., Campbell-Thompson, M., Vignali, M., Emerson, R.O., Kaddis, J.S., Ko, D., Nakayama, M., Smith, M.J., Cambier, J.C., Pugliese, A., Atkinson, M.A., Robins, H.S., Brusko, T.M. (2016). Tissue distribution and clonal diversity of the T and B cell repertoire in type 1 diabetes. *JCI Insight*. 8;1(20):e88242.

Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17, 829-874.

Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., Kelleher, A., Fazekas de St Groth, B. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203(7):1693-700.

Serreze, D.V., Fleming, S.A., Chapman, H.D, Richard, S.D., Leiter, E.H., Tisch, R.M. (1998). B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 161(8):3912-8.

Sgouroudis, E., Kornete, M., Piccirillo, C.A. (2011). IL-2 production by dendritic cells promotes Foxp3(+) regulatory T-cell expansion in autoimmune-resistant NOD congenic mice. *Autoimmunity*. 44(5):406-14.

Chapitre 4 : Bibliographie

- Shinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K., Murphy, K.M., Loh, D.Y., Reinherz, E.L., and Alt, F. (1993). Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259, 822-825.
- Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., Nakayama, T. (2008). Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. *J Biol Chem.* 283(42):28216-25.
- Shuai K. (1999). The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog Biophys Mol Biol.* 71(3-4):405-22.
- Singer, I.I., Kawa, D.W., Scott, S., Weidener, R.J., Mumford, R.A., Riehl, T.E., Stenson, W.F. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 111: 871-85.
- Singh, K., Kadesjö, E., Lindroos, J., Hjort, M., Lundberg, M., Espes, D., et al. (2015). Interleukin-35 Administration counteracts established murine type 1 diabetes? Possible involvement of regulatory T cells, *Sci. Rep.* 5. 12633.
- Sloka, S., Silva, C., Wang J., and Yon, V.W. (2011). Predominance of Th2 polarization by Vitamin D through a STAT6-dependent mechanism. *Journal of Neuroinflammation.* 8:56.
- Sokol, C.L., Chu N.Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer T.M., and Medzhitov R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nature Immunology.* 10(7):713–720.
- Souberbielle, J. C, Prié, D., Courbebaisse, M., Friedlander, G., Houillier, P., Maruani, G., Cavalier, E., Cormier, C. (2008). Update on vitamin D and evaluation of vitamin D status. *Ann. Endocrinol.* 69(6):501–10.
- Souberbielle, J.C. (2013). Actualités sur la vitamine D. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 48(2):63-74.
- Spaans, E.A., Gusdorf, L. M., Groenier, K.H., Brand, P.L., Veeze, H.J., Reeser, H.M., Bilo, H.J., Kleefstra, N. The incidence of type 1 diabetes is still increasing in the Netherlands, but has stabilised in children under five (Young DUDEs-1). (2015). *Acta Paediatr.* 104(6):626-9.
- Speeckaert, M., Huang, G., Delanghe, J.R., Taes, Y.E. (2006). Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin. Chim. Acta.* 372: 33–42.
- Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching. *Current opinion in immunology* 8, 199-205.
- Steinke, J.W., and Borish, L. (2001). Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research.* 2(2): 66–70.
- Stene, L.C., Iriksen, J. U, Magnus, P., Joner, G. (2000). Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring, *Diabetologia.* 43;1093–1098.
- Stene, L.C., Ulriksen, J., Magnus, P., Joner, G. (2000). Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring. *Diabetologia.* 43(9):1093-8.
- Stephens, R.J., Ritchie, J.M., Harrison, L.C. (2002). Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 168, 5032–5041.

Chapitre 4 : Bibliographie

Stuehr, D.J., Getzoff, E.D. (1999). N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *Embo J*; 18: 6271-81.

Suarez-Pinzon, W.L., and Rabinovitch, A. (2001). Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits. *International Journal of Experimental Diabetes Research*. 2(1):3-17.

Summers, S.A., Garza, L.A., Zhou, H., Birnbaum, M.J. (1998). Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol*. 18(9):5457-64.

Sun, J., Kong, J., Duan, Y., Szeto, F.L., Liao, A., Madara, J.L., et al. (2006). Increased NF-kappa B activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 291(2):315–322.

Suzuki, J., Maruyama, S., Tamauchi, H., Kuwahara, M., Horiuchi, M., Mizuki, M., Ochi, M., Sawasaki, T., Zhu, J., Yasukawa, M., Yamashita, M. (2016). Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the Thelper type 1 programme in activated CD4 T cells. *Immunology*. 147(4) :476–487.

Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors, *J Immunol*. 145, 3796.

Swain, S.L., McKinstry, K.K., Strutt, T.M. (2012). Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nature Reviews Immunology* 12, 136-148.

Szabo, C., Southan, G.J., Wood, E., Thiemermann, C., Vane, J.R. (1994). Inhibition by spermine of the induction of nitric oxide synthase in J774.2 macrophages: requirement of a serum factor. *Br J Pharmacol*. 112: 355-6.

Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells, *J Exp Med* 185, 817-24.

Szeszko, J.S., Howson, J.M., Cooper, J.D., Walker, N.M., Twells, R.C., Stevens, H.E., Nutland, S.L., Todd, J.A. (2006). Analysis of polymorphisms of the interleukin-18 gene in type 1 diabetes and Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Diabetes*. 55(2):559-562.

T

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology*. 6(2):127–135.

Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., and Inoue, N. (2010). Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGFβ-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *Journal of Immunology*. 185(2):842–855.

Tan, T., Xiang, Y., Chang, C., Zhou, Z. (2014). Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 47(2):234-43.

Thierfelder, W.E., VanDeursen, J.M., Yamamoto, K. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*. 382(6587):171–174.

Chapitre 4 : Bibliographie

Thorvaldson, L., Johansson, S.E., Hoglund, P. and Sandler, S. (2005). Impact of plastic adhesion in vitro on analysis of Th1 and Th2 cytokines and immune cell distribution from mice with multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Immunological Methods*. 20;307(1-2):73-81.

Thrower, S.L., James, L., Hall, W., Green, K.M., Arif, S., Allen, J.S., et al. (2009). Proinsulin Peptide immunotherapy in type 1 diabetes: report of a first-in-man Phase I safety study, *Clin. Exp. Immunol.* 155:156–165.

Toda, N., Okamura, T. (1990). Endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 95(6):295-308.

Todd, J.A. (1995). Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 8560-8565.

Trinchieri, G. (1993). Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells, *Immunol Today* 14, 335-338.

Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*.19(5):641–644.

Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benoist, C., Mathis, D. (2003). Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med*.198(10):1527-37.

U

Usui,T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. *Immunity*.18(3):415–428.

V

Van de Graaf, S.F., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006). Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290(6):F1295-302.

Van den Brandt, J., Fischery, H.J., Waltery, L., Hünig, T., Klötingy, I. & Reichardt H.M. (2010). Type 1 diabetes in BioBreeding rats is critically linked to an imbalance between Th17 and regulatory T cells and an altered TCR repertoire. *Journal of Immunology*.185(4):2285-2294.

Van Etten, E., and Mathieu, C. (2005). Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D. Basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 97 : 93-101.

Veldhoen, M., Hirota, K., A. M. Westendorf et al., “The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins”. (2008). *Nature*, 453(7191):106–109,

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006).TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17producing T cells. *Immunity*. 24(2):179–189.

Viaro, F., Nobre, F., and Evora, P.R.B. (2000). Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 74(4)380–393.

Chapitre 4 : Bibliographie

Vila-del Sol, V., Diaz-Munoz, M.D., Fresno, M. (2006). Requirement of tumor necrosis factor and nuclear factor- κ B in the induction by IFN- γ of inducible nitric oxide synthase in macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 81: 272–283.

Virtanen, S.M., Laara, E., Hyponen, E., Reijonen, H., Rasanen, L., Aro, A. (2000). The childhood diabetes in Finland study group. Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes. *Diabetes.* 49:912-7.

Visperas, A., Vignali, D. A. (2016). Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them?. *J Immunol.* 15;197(10):3762-3770.

Von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* 6, 338-344.

W

Wagner, C.L., Taylor, S.N., and Hollis, B.W. (2008). Does vitamin D make the world go 'round'? *Breastfeed Med.*3(4):239-50.

Waldman, S.A., and Murad, F. (1988). Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 12 Suppl 5, S115-118.

Walker, L. S., and Abbas, A. K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2, 11-19.

Walker, L.S., and von Herrath, M. (2016). CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.*183(1):16-29.

Wang, B., Gonzalez, A., Benoist, C., Mathis, D. (1996). The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol.* 26(8):1762-9.

Weaver, C.T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., and Harrington, L. E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 821–852.

Webb, A.R. (2006). Who, what, where and when-influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Prog Biophys Mol Biol.*92(1):17-25.

Weber, C., Belge, K.U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S., Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol.*67(5):699-704.

Weiner, H. L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182:207.

Wen, L., Wong, F.S., Tang, J., Chen, N.Y., Altieri, M., David C. (2000). In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J Exp Med.* 191:97-104.

Chapitre 4 : Bibliographie

White, K.E., Biber, J., Murer, H., Econs, M.J. (1998). Chromosomal localization of two human genes involved in phosphate homeostasis: the type IIb sodium-phosphate cotransporter and stanniocalcin-2. *Somat Cell Mol Genet.* Nov;24(6):357-62.

Whitley, E., Ball, J. (2002). Statistics review 6: nonparametric methods, *Crit. Care Lond.Engl.* 6 -509–513.

Wicker, L.S., Miller, B.J., and Mullen, Y. (1986). Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes.* 35(8):855-60.

Wiktor-Jedrzejczak, W., and Gordon, S. (1996). Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev.* 76:927-47.

Willcox, A., Richardson, S.J., Bone, A.J., Foulis, A.K., Morgan, N.G. (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 155:173–81.

Wing, K., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 11: 7–13.

Witt, C. M., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A. K., and Robey, E. A. (2005). Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol* 3, e160.

Wong, F.S., Wen, L., Tang, M., Ramanathan, M., Visintin, I., Daugherty, J., Hannum, L.G., Janeway, C.A., Shlomchik, M.J. (2004). Investigation of the role of B cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetes.* 53(10):2581-7.

Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J., Ong, S.M., Dang, T.M., Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 53(1-3):41-57.

Wu, G., and Morris, S.M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond, *Biochem. J.*336: 1–17.

Wurster, A.L., Tanaka, T., Grusby, M.J. (2000). The biology of stat4 and stat6, *Oncogene.*19: 2577–2584.

X

Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 256:225-228.

Xu, D., Chan, W. L., Leung, B. P., Huang, F.-p., Wheeler, R., Piedrafita, D., Robinson, J. H., and Liew, F. Y. (1998). Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells., *J Exp Med* 187, 787-794.

Y

Yadav, D., Hill, N., Yagita, H., Azuma, M., Sarvetnick, N. (2009). Altered availability of PD-1/PD ligands is associated with the failure to control autoimmunity in NOD mice. *Cell Immunol.* 258(2):161-71.

Yamshchikov, A.V., Desai, N.S., Blumberg, H.M., Ziegler, T.R., Tangpricha, V. (2009). Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials. *Endocr Pract.* 15(5): p. 438-49.

Chapitre 4 : Bibliographie

Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X-F., Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2:1.

Yang, L., Luo, S., Huang, G., Peng, J., Li, X., Yan, X., Lin, J., Wenzlau, J.M., Davidson HW, Hutton JC, Zhou Z. (2010). The diagnostic value of zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) for type 1 diabetes in Chinese. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 26(7):579-584.

Yang, L.J. (2008). Big mac attack: does it play a direct role for monocytes/macrophages in type 1 diabetes?. *Diabetes.* 57, 2922–2923.

Yang, M., Shen, Z., Chen, D., Gan, H., Shen, Q., Yang, B. (2012). Effects of 1,25-(OH)₂D₃ on the expressions of vitamin D receptor, STAT5 and cytoskeletal rearrangement in human monocytes incubated with sera from type 2 diabetes patients and diabetic nephropathy patients with uremia, *Inflamm Res.* 61:511–520.

Yang, X.D., Michie, S.A., Mebius, R.E., Tisch, R., Weissman, I., McDevitt, H.O. (1996). The role of cell adhesion molecules in the development of IDDM: implications for pathogenesis and therapy. *Diabetes.* 45:705-10.

Yangyang, L., Liu, Y., and Cong-Qiu, C. (2015). Th17 Cells in Type 1 Diabetes: Role in the Pathogenesis and Regulation by Gut Microbiome. *Mediators of Inflammation.* 638470, 7.

Yoon, J.-W., and Jun, H.-S. (2005). Autoimmune destruction of pancreatic beta cells, *Am. J. Ther.* 12:580–591.

Yoon, J.W., and Jun, H.S. (2001). Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-independent diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 928(1):200-211.

Yuk, J.M., Shin, D.M., Lee, H.M., Yang, C.S., Jin, H.S., Kim, K.K., Lee, Z.W., Lee, S.H., Kim, J.M., Jo, E.K. (2009). Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe.* 6:231-43.

Z

Zaoui, S., Biémont, C., Meguenni, K. (2007). Approche épidémiologique du diabète en milieu urbain et rural dans la région de Tlemcen (Ouest algérien). *Cahiers Santé.* 17,1:15-21.

Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E. (2012). Vitamin D Inhibits Monocyte/macrophage Pro-inflammatory Cytokine Production by Targeting Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1. *J Immunol.* 188(5): 2127–2135.

Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J., and Shevach, E.M. (2006). Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107, 3925-3932.

Zhou, L., Ivanov, I.I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., Littman, D.R. (2007). IL-6 programs TH17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology.* 8(9):967–974.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 1;112(5):1557-69.

Chapitre 4 : Bibliographie

Zhu, J., Guo, L., Watson C.J., Hu-Li, J., and Paul, W. E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in TH2 differentiation and cell expansion. *Journal of Immunology*. 166(12):7276–81.

Zhu, J., Jankovic, D., Grinberg, A., Guo, L., and Paul, W.E. (2006). Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(48):18214– 18219.

Zhu, J., Guo, L., Min, B., Watson, C.J., Hu-Li, J., Young, H.A., Tschlis, P.N., Paul, W.E. (2002). Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity*.16(5):733-44.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Fingerle, G., Ströbel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schütt, C., Passlick, B., Pforte, A (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*.23(9):2053-8.

Zipitis, C.S., Akobeng, A.K. (2008). Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*.93(6):512-7.

Zorn, E., Nelson, E.A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E., Canning, C., Soiffer, R.J. (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*. 108:1571-9.



1,25-dihydroxyvitamin D₃ down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes



Lamia Ysmail-Dahlouk, Wafa Nouari, Mourad Aribi*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2016

Received in revised form 30 August 2016

Accepted 2 October 2016

Available online 4 October 2016

Keywords:

1,25(OH)₂D₃

Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines

PBMCs

Monocytes

p-STAT4 and p-STAT6

Type 1 diabetes

ABSTRACT

Background: Type 1 diabetes (T1D) is associated with an imbalance between inflammation and repair. Recently, the biologically active form of vitamin D₃, i.e. 1,25(OH)₂D₃, has been reported to have potent immunomodulatory effects on both innate and adaptive immune cells, as well as on the production of their specific cytokines.

Methods: We examined the effect of 1,25(OH)₂D₃ on the production of proinflammatory Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg related cytokines, as well as on the phosphorylation of monocyte-expressed STAT4 and STAT6 at the recent-onset human T1D.

Results: The levels of IFN-γ, IL-17 and nitric oxide (NO) production were significantly increased in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with T1D compared to controls. Similarly, STAT4 tyrosine phosphorylation (p-STAT4, Tyr693) levels were significantly increased in monocytes from patients when compared to controls. Conversely, the levels of IL-4, IL-10 and p-STAT6 (Tyr641) were significantly decreased in type 1 diabetic patients than in controls. Treatment with 1,25(OH)₂D₃ resulted in significant up-regulation of IL-4, IL-10, arginase activity, and p-STAT6 and, conversely, down-regulation of IFN-γ, IL-17 and NO production levels, as well as p-STAT4. Additionally, 1,25(OH)₂D₃ significantly enhanced Treg-to-Th17 ratio, and induced a significant decrease in Th1-to-Th2, NO production-to-arginase activity and p-STAT4-to-p-STAT6 ratios.

Conclusions: Our study suggests that the biologically active form of vitamin D can reverse the activation of inflammatory pathways at the onset of T1D. Additionally, its immunomodulation properties may vary depending on the overall patterns of cytokines. From a therapeutic point of view, vitamin D may potentially be suggested as an immunological adjuvant and a potential anti-inflammatory agent in individuals at risk of T1D.

© 2016 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an organ-specific autoimmune disease characterized by an absolute deficiency of insulin, due to a progressive and selective destruction of pancreatic β-cells. The incidence of the disease has been increasing worldwide for several decades [1]. It is therefore considered as a major public health problem.

It has been reported that β-cells destruction is preceded by the infiltration of the pancreatic islets by innate immune cells, including monocytes-macrophages [2]. Such cells have been involved in autoreactive T cell activation and elevated proinflammatory cytokine production within the pancreatic lymph nodes (PLN) [3]. Of note, signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) is required for the promotion of the development of inflammatory subsets and limits adaptive Treg cell development; while STAT6 induces GATA-binding protein 3 (GATA-3), and not only is required for the anti-inflammatory activity of IL-4, but also suppresses IFN-γ-induced STAT1-dependent transcription [4].

Several studies have reported that Th1 and Th17 proinflammatory effectors are involved in the pathogenesis of T1D [2,5]. Therefore, regulation of the balance between proinflammatory

* Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, Imama-Mansourah, Rocate # 2, Department of Biology, University of Tlemcen, PO Box: 262, Imama-Mansourah, Tlemcen 13000, Algeria.

E-mail addresses: m.aribi@mail.univ-tlemcen.dz, m.aribi@outlook.fr, m.aribi@yahoo.fr (M. Aribi).

Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg cells can reverse recent-onset T1D. Additionally, numerous therapy trials have been undertaken to tilting the balance toward Th2/Treg cells in order to prevent the progression of T1D in its early stages [6–8]. Immunomodulatory regimens have been widely proposed as one of the greatest and effective prevention strategies for immune regulation in both mice and humans in various autoimmune diseases, including T1D. In this context, a special focus has been recently given to vitamin D.

Vitamin D, a hormone synthesized initially in the skin following ultra-violet B (UVB) ray exposure, or obtained directly via diet has two origins: vitamin D₂ from plants, and vitamin D₃ or cholecalciferol from animals. The conversion of 7-dehydrocholesterol to pre-vitamin D₃ leads to the formation of a 25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃], referred to as the storage form of vitamin D₃ [9]. In a second step, 25(OH)D₃ is catalyzed in the kidney by the enzyme so called 25-hydroxyvitamin D₃ 1-alpha-hydroxylase (VD3 1A hydroxylase) (cytochrome p450 27B1 or CYP27B1, EC 1.14.13.13) resulting in the formation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], also called 1,25-dihydroxycholecalciferol or calcitriol, which is considered as the biologically active form of vitamin D₃ [10]. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is transported to the target cells by vitamin D-binding protein, where it exerts its effects by direct transcriptional regulation of target genes [11]. Therefore, following it binding to the nuclear vitamin D receptor (VDR), i.e. a member of the nuclear receptor superfamily of steroid hormones, and then to the nuclear retinoic acid X receptor (RXR), the VDR-9-cis-RXR complex induces an effect at the vitamin-D response elements (VDREs) that regulate target genes [12].

Besides its classical role in the regulation of calcium and phosphorus balance, several studies have reported the effects of vitamin D₃ on activation, growth and differentiation of many cell types with remarkable immunomodulatory effects [13–15]. Immune cells, including T- and B-cells, and antigen-presenting cells (macrophages and dendritic cells) have the necessary machinery to synthesize and respond to vitamin D₃, which may act in a paracrine or autocrine manner in an immune environment [16]. It has been reported that vitamin D₃ deficiency increases the risk of development of several autoimmune diseases, including T1D [17,18].

In this study, we aimed to evaluate the *ex vivo* effect of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on the production of the proinflammatory Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg related cytokines, as well as on the phosphorylation of monocyte-expressed STAT4 and STAT6 at the recent-onset human T1D.

2. Materials and methods

2.1. Study design

Assays were performed on PBMCs, monocytes, and cell lysates. PBMCs were isolated by centrifugation on density gradient from whole blood of type 1 diabetic and healthy volunteers served as control subjects. Monocytes were enriched from PBMCs by negative selection. The effect of 1,25(OH)₂D₃ on the levels of proinflammatory Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg related cytokines, as well as on NO production were examined in PBMCs supernatants cultures. The effect of 1,25(OH)₂D₃ on the levels of STAT4 and STAT6 phosphorylation were measured in isolated monocytes. The effect of 1,25(OH)₂D₃ on arginase activity was evaluated on cell lysates. Each experiment was repeated the same way at least 4 times.

2.2. Cell samples and culture of PBMCs

In this *ex vivo* study, cell samples were isolated from peripheral blood of eight volunteers (four recent-onset type 1 diabetics and

Table 1

Characteristics of volunteers with type 1 diabetes.

Volunteer	Gender	Age (Mon)	Age at T1D diagnosis (Mon)	DD (Mon)	BMI (kg/m ²)
VOL1T1D	Female	98	84	14	21.43
VOL2T1D	Male	133	117	16	20.18
VOL3T1D	Male	155	142	13	21.41
VOL4T1D	Male	254	243	11	20.09

BMI: body mass index, DD: diabetes duration, T1D: type 1 diabetes.

four healthy subjects matched by gender, age and body mass index), after obtaining from parents or young adults informed consent for research use of blood samples, and approval by the local Ethics Committee of Tlemcen University. To minimize potential bias that could be introduced through a faulty experimental design, the blood samples were withdrawn at the same sunny time in the year, due to the importance of sun exposure as environmental factor in our study. Additionally, volunteers with T1D were chosen on the basis of the following criteria: adolescent or young type 1 diabetics (age ≤ 22 years), recent-onset T1D (diabetes duration < 18 months), absence of infection, inflammation, other autoimmune diseases, and all factors that may interfere with the inflammatory process such as obesity, smoking and alcohol intake. Diabetes duration was 13.5 ± (standard error of mean) 1.04 months (range 11–16) (Table 1). PBMCs were isolated from fresh venous blood collected into heparin tubes (BD, Belliver Industrial Estate, UK). Blood samples were first diluted with an equal volume of RPMI 1640 culture medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM of sodium pyruvate, 50 µg/mL gentamicin and 10% fetal calf serum (FCS). The cell suspension was placed on one-half volume of Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA) for density gradient centrifugation. The collected PBMCs were washed twice and cell viability assay was performed using Trypan Blue Exclusion Test (TBET) [19]. 10⁶ cells/mL of PBMCs were cultured in 96-well round-bottom polystyrene tissue culture plates on tri to six replicates. PBMCs were simulated by phytohemagglutinin (PHA) at a concentration of 5 µg/mL [20], then incubated in the presence or absence of 1,25(OH)₂D₃ (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), at a dose of 10⁻⁷ M [21]. After incubation for 24 h at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO₂, cell-free supernatants were collected and stored at – 80 °C.

2.3. Cytokine assays

Levels of IFN-γ, IL-4, IL-10 and IL-17 were measured by a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using respective commercial kits, according to the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). Briefly, standards and supernatants were incubated with shaking for 2½ h with the appropriate primary anti-cytokine antibody, which coats the wells of a microplate at a rate of 100 µL for each cytokine. After several washes, 100 µL of biotinylated antibodies were added to each well. Following to incubation for one hour, 100 µL of streptavidin coupled to peroxidase was added to different wells. The revelation of the enzymatic activity is carried out after 45 min. Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution was added to each well at a rate of 100 µL. After 30 min of incubation in the dark, the reaction was stopped by adding 50 µL of a sulfuric acid solution. Optical densities were measured immediately at 450 nm (OD450) with an ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). Sensitivities (limits of detection, LOD) of the assays were 15 pg/mL for IFN-γ, 5 pg/mL for IL-4, 1 pg/mL for IL-10 and 80 pg/mL for IL-17.

2.4. Nitric oxide assay

Nitric oxide (NO) levels in the PBMCs culture supernatants were spectrophotometrically determined at 540 nm after 24 h of incubation by measuring the NO end-products (nitrite and nitrate), using the sensitive colorimetric Griess reaction as described [22]. The concentration of NO was determined using a calibration curve established by 0–150 mmol/L of sodium nitrite.

2.5. Arginase activity assay

Arginase activity was assessed spectrophotometrically on cell lysates of PBMCs by measuring the amount of urea produced after the addition of L-arginine as previously described with minor modifications [23]. Cells were lysed with 10% of Triton X-100 and incubated with shaking for 30 min followed by addition of a mixture of Tris-HCl and MnCl₂. After heat activation of the enzyme, the hydrolysis reaction began after the addition of an equal volume of 0.5 M arginine. The reaction was stopped after 1 h incubation at 37 °C by adding 400 μL of a mixture of acids. The concentration of urea generated by arginase was determined at 600 nm using a commercial kit (UREA/BUN-COLOR, BioSystems SA Costa Brava 30 Spain Barcellona). The arginase activity was expressed as mU urea/mg proteins/1 h.

2.6. Monocytes preparation

The monocytes were separated from PBMCs by negative selection using a commercial kit of Human Monocyte Enrichment EasySep (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), according to the manufacturer's instructions. 7×10^7 PBMCs were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) with 1 mM EDTA and 2% FCS, and then incubated at 2–8 °C for 10 min with an enrichment antibody cocktail (50 μL/mL). Fifty μL/mL of magnetic particles were added to the suspension followed by a second incubation for 5 min. Finally monocytes were obtained from the negative fraction by centrifugation at $400 \times g$ for 10 min, and their viability was determined using TBET.

2.7. STAT4 and STAT6 phosphorylation assays

The relative amounts of STAT4 and STAT6 phosphorylation assays were carried out in monocytes treated or not with 1,25(OH)₂D₃ using STAT4 (Tyr693) and STAT6 (Tyr641) ELISA Kits (Abcam, Germany). Prepared monocytes were taken up in RPMI (Sigma Chemical Co. 16, St. Louis, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 μg/mL gentamycin and 10% FCS at a concentration of 5×10^5 cell/mL and incubated in 96-well plate culture at 37 °C and 5% CO₂ during 4 h [24]. The resulting adherent monocytes were activated with 100 ng/mL lipopolysaccharides (LPS) [25] supplemented with 10 ng/mL IFN-γ or IL-4 for the determination of p-STAT4 and p-STAT6, respectively [26–28]. All cell cultures were performed in the presence or absence of 10^{-7} M 1,25(OH)₂D₃ [24]. After incubation for 30 min at 37 °C in 5% CO₂ [28], then washing the wells with appropriate wash buffer (A), the cells were fixed with a solution containing formaldehyde (100 μL), and then incubated for 20 min at room temperature. Thereafter, 200 μL of Quenching Solution was added to each well and incubated for 20 min at room temperature. After incubation for 1 h with 100 μL blocking solution, the wells were washed with a second wash buffer (B), and 50 μL of primary antibody Anti-Phospho-STAT4 (Tyr693) and Anti-phospho-STAT6 (Tyr641) were added to the appropriate wells, and then incubated for 2 h at room temperature. Fifty μL of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody was then added to the appropriate wells. After 1 h incubation, the enzymatic activity was revealed by the addition of TMB, and then incubated for

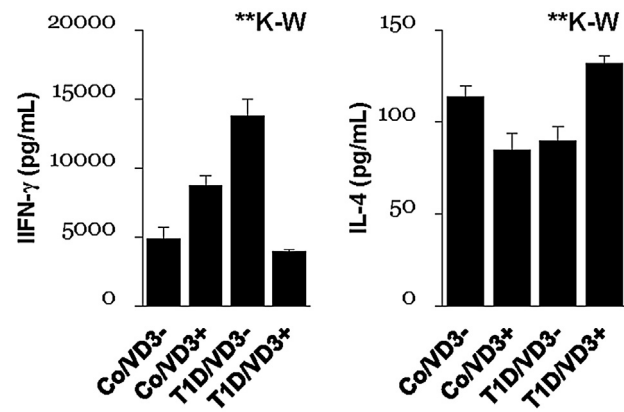


Fig. 1. Effect of 1 $\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on IL-4 and IFN- γ production in PBMCs from patients with a new-onset T1D. The two cytokines levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with type 1 diabetes and four healthy controls ($n = 16$ in each group). IL: interleukin, IFN: interferon, K-W: Kruskal-Wallis test, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, T1D: type 1 diabetes, Co/VD3-: PBMCs from healthy controls not treated with 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs from healthy controls treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs from type 1 diabetics not treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs from type 1 diabetics treated with 1,25(OH)₂D₃. ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: (i) IFN- γ : Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ $p < 0.05$, T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p = 0.006$, (ii) IL-4: Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ or T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$.

30 min in the dark. The chromogenic reaction was stopped by the addition of 50 μL phosphoric acid stop solution. The absorbance was read immediately at 450 nm on the ELISA plate reader.

2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using SPSS software version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were presented as means \pm standard error of mean (SEM). The assumption of normality was checked prior to statistical procedures. The means were compared with the Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney U nonparametric tests to search differences among all groups and between two groups, respectively, since the distribution of the outcomes was not assumed to be approximately normally distributed [29,30]. P -value less than 0.05 was considered as significant.

3. Results

In this study, we evaluated the *ex vivo* effect of the biologically active form of vitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] on the production of proinflammatory Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg related cytokines by PBMCs, as well as on the phosphorylation of monocyte-expressed STAT4 and STAT6 at the recent-onset human T1D. The experiments were performed on PBMCs or monocytes from type 1 diabetics and healthy controls treated or not with 1,25(OH)₂D₃. The modulating effect of 1,25(OH)₂D₃ on the levels of NO production in T1D was performed on a culture of PBMCs. On the basis of the respective signature cytokines, the Th1-to-Th2 and Treg-to-Th17 ratios were estimated from the IFN- γ -to-IL-4 ratio and IL-10-to-IL-17 ratio, respectively. Finally, the therapeutic effect of 1,25(OH)₂D₃ on combined proinflammatory (PICs) Th1/Th17 and anti-inflammatory (AICs) Th2/Treg related cytokines was assessed in PBMCs.

As shown in Fig. 1, IFN- γ levels were significantly increased in PBMCs of type 1 diabetic patients compared to controls; while those of IL-4 were significantly decreased (for both comparisons, $p < 0.05$

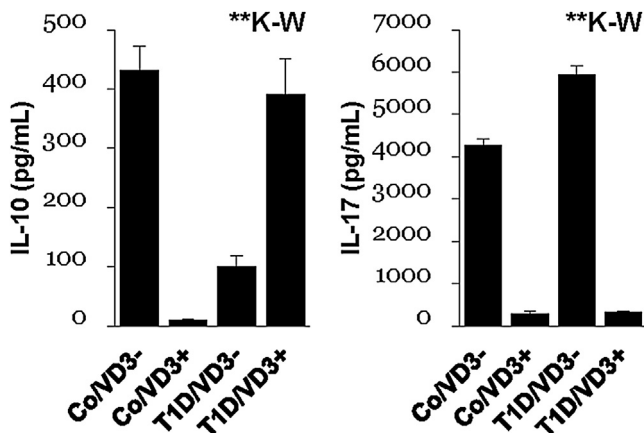


Fig. 2. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on IL-10 and IL-17 production in PBMCs from patients with a new-onset T1D. The two cytokines levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with type 1 diabetes and four healthy controls (n = 16 in each group). IL: interleukin, K-W: Kruskal-Wallis test, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, T1D: type 1 diabetes, Co/VD3⁻: PBMCs from healthy controls not treated with 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3⁺: PBMCs from healthy controls treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3⁻: PBMCs from type 1 diabetics not treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3⁺: PBMCs from type 1 diabetics treated with 1,25(OH)₂D₃. ***p* < 0.01 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: (i) IL-10; Co/VD3⁻ vs. Co/VD3⁺, *p* < 0.01, Co/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁻ or Co/VD3⁺ vs. T1D/VD3⁻ or Co/VD3⁺ vs. T1D/VD3⁺ or T1D/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁺, *p* < 0.05, (ii) IL-17; Co/VD3⁻ vs. Co/VD3⁺, *p* < 0.01, Co/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁻ or Co/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁺ or Co/VD3⁺ vs. T1D/VD3⁻ or Co/VD3⁺ vs. T1D/VD3⁺, *p* < 0.05, T1D/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁺, *p* < 0.01.

by Mann-Whitney *U* test). We also observed that the treatment of the PBMCs with the active vitamin D₃ induced a significant increase in IFN-γ levels and a significant decrease of those of IL-4 in control cells (for the two comparisons, *p* < 0.05 by Mann-Whitney *U* test). Conversely, the active vitamin D₃ induced a highly significant decrease of IFN-γ levels and a significant increase of IL-4 levels in PBMCs from type 1 diabetics compared to that of type 1 diabetics not 1,25(OH)₂D₃-treated PBMCs (respectively, *p* = 0.006 and *p* = 0.021 by Mann-Whitney *U* test). For the two cytokines using Kruskal-Wallis test, *p*-value was 0.008 for IFN-γ and *p*-value was 0.009 for IL-4.

We observe in Fig. 2 that the levels of IL-10 were significantly decreased in PBMCs of type 1 diabetic patients than in controls; whereas those of IL-17 were significantly increased (for the two comparisons, *p* < 0.05 by Mann-Whitney *U* test). Treatment with vitamin D₃ induced decreasing levels of both IL-10 and IL-17 in PBMCs of healthy control subjects (for both comparisons, *p* < 0.01 by Mann-Whitney *U* test). Additionally, 1,25(OH)₂D₃ significantly up-regulated levels of IL-10 and down-regulated those of IL-17 in PBMCs of patients with T1D (respectively, *p* < 0.05 and *p* < 0.01 by Mann-Whitney *U* test). For all comparisons, *p* < 0.01 by Kruskal-Wallis test.

The results for the effect of 1,25(OH)₂D₃ on the levels of NO production and arginase activity are reported in Fig. 3. Although levels of NO production in PBMCs of type 1 diabetics were significantly elevated when compared to controls, those of arginase activity were similar in both groups (respectively, *p* = 0.047 and *p* = 0.465 by Mann-Whitney *U* test). Conversely, we observed that treatment with vitamin D₃ induced a significant decrease in the levels of NO production and a significant increase in those of arginase activity in PBMCs of both control subjects and type 1 diabetic patients, when comparing with not 1,25(OH)₂D₃-treated PBMCs (Controls; NO production or arginase activity, *p* < 0.01, T1D; NO production, *p* < 0.01, arginase activity, *p* < 0.05 by Mann-Whitney *U* test). For all comparisons, *p* < 0.01 by Kruskal-Wallis test.

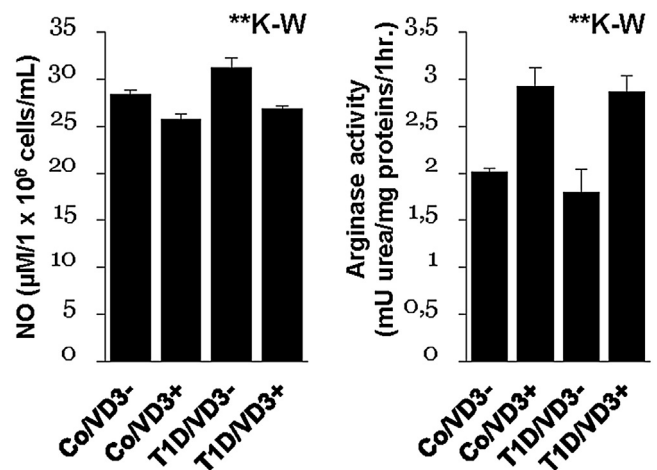


Fig. 3. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on nitric oxide production and arginase activity in PBMCs from patients with a new-onset T1D. NO assay was carried out spectrophotometrically with the sensitive colorimetric Griess reaction. Arginase activity was performed spectrophotometrically by measuring the amount of urea produced after the addition of L-arginine. Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of six independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with type 1 diabetes and four healthy controls (n = 24 in each group). K-W: Kruskal-Wallis test, NO: nitric oxide, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, T1D: type 1 diabetes, Co/VD3⁻: PBMCs from healthy controls not treated with 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3⁺: PBMCs from healthy controls treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3⁻: PBMCs from type 1 diabetics not treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3⁺: PBMCs from type 1 diabetics treated with 1,25(OH)₂D₃. ***p* < 0.01 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: (i) NO production; Co/VD3⁻ vs. Co/VD3⁺, *p* < 0.01, Co/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁻ or Co/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁺, *p* < 0.05, Co/VD3⁺ vs. T1D/VD3⁻ or T1D/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁺, *p* < 0.01, (ii) Arginase activity; Co/VD3⁻ vs. Co/VD3⁺ or Co/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁺ or Co/VD3⁺ vs. T1D/VD3⁻, *p* < 0.01, T1D/VD3⁻ vs. T1D/VD3⁺, *p* < 0.05.

As indicated in Fig. 4, relative levels of p-STAT4 were significantly increased in monocytes of type 1 diabetics when compared to controls; while those of p-STAT6 were significantly decreased (for the two comparisons, *p* < 0.01 by Mann-Whitney *U* test). Additionally, we see that treatment of monocytes from healthy controls with 1,25(OH)₂D₃ induced a significant increase in relative levels of p-STAT4 and a significant decrease in those of p-STAT6 (for both comparisons, *p* < 0.01 by Mann-Whitney *U* test). On the contrary, monocytes from type 1 diabetic patients display a significant decrease in relative levels of p-STAT4 and a significant increase in those of p-STAT6 when treated with 1,25(OH)₂D₃ (respectively, *p* = 0.009 and *p* = 0.036 by Mann-Whitney *U* test). For all comparisons, *p* < 0.01 by Kruskal-Wallis test.

As shown in Fig. 5, in the absence of 1,25(OH)₂D₃ treatment, Th1-to-Th2 ratio was significantly increased in PBMCs of type 1 diabetic patients than in controls; while Treg-to-Th17 ratio was significantly decreased (for both comparisons, *p* < 0.05 by Mann-Whitney *U* test). PBMCs treatment with 1,25(OH)₂D₃ induced a significant increase in Th1-to-Th2 ratio and a significant decrease of Treg-to-Th17 ratio in PBMCs of healthy control subjects (for the two comparisons, *p* < 0.05 by Mann-Whitney *U* test). By contrast, 1,25(OH)₂D₃ induced a significant decrease of Th1-to-Th2 ratio and a significant increase of Treg-to-Th17 ratio when compared to not 1,25(OH)₂D₃-treated PBMCs in type 1 diabetic patients (respectively, *p* < 0.05 and *p* < 0.01 by Mann-Whitney *U* test). When using Kruskal-Wallis test, *p*-values were 0.006 for Th1-to-Th2 ratio and 0.003 for Treg-to-Th17 ratio.

As depicted in Fig. 6, NO production-to-arginase activity ratio was increased in PBMCs of type 1 diabetic patients when compared to controls, whereas the difference did not quite reach a statistically significant level (*p* = 0.117). Additionally, NO production-to-arginase activity ratio was significantly decreased in 1,25(OH)₂D₃-treated control PBMCs compared to not

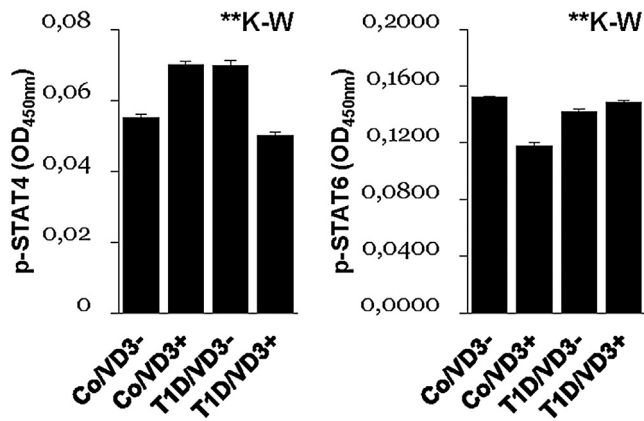


Fig. 4. Effect of 1 $\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on STAT4 and STAT6 phosphorylation in monocytes from patients with a new-onset T1D. Monocytes were enriched from PBMCs by negative selection. The relative amounts of STAT4 phosphorylation on tyrosine 693 (Y693, p-STAT4) and STAT6 on tyrosine 641 (Y641, p-STAT6) were measured qualitatively using a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with type 1 diabetes and four healthy controls ($n = 16$ in each group). K-W: Kruskal-Wallis test, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, p-STAT: phosphorylated STAT, STAT: signal transducer and activator of transcription, T1D: type 1 diabetes, Co/VD3-: monocytes from healthy controls not treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Co/VD3+: monocytes from healthy controls treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, T1D/VD3-: monocytes from type 1 diabetics not treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, T1D/VD3+: monocytes from type 1 diabetics treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: (i) p-STAT4; Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3-, $p < 0.01$, Co/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$, Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ or T1D/VD3- vs. T1D/VD3+ $p < 0.01$, (ii) p-STAT6; Co/VD3- vs. Co/VD3+, $p < 0.01$, Co/VD3- vs. T1D/VD3-, $p < 0.05$, Co/VD3- vs. T1D/VD3+ or Co/VD3+ vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3+, $p < 0.01$, T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$.

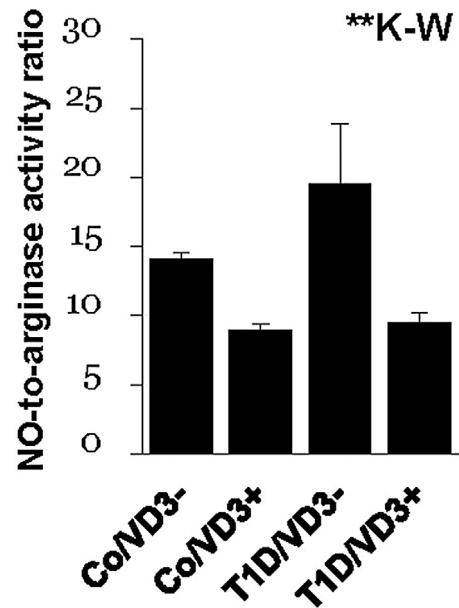


Fig. 6. Effect of 1 $\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on NO production-to-arginase activity ratio in PBMCs from patients with a new-onset T1D. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of six independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with type 1 diabetes and four healthy controls ($n = 24$ in each group). K-W: Kruskal-Wallis test, NO: nitric oxide, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, T1D: type 1 diabetes, Co/VD3-: PBMCs from healthy controls not treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Co/VD3+: PBMCs from healthy controls treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, T1D/VD3-: PBMCs from type 1 diabetics not treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, T1D/VD3+: PBMCs from type 1 diabetics treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3- or T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.01$.

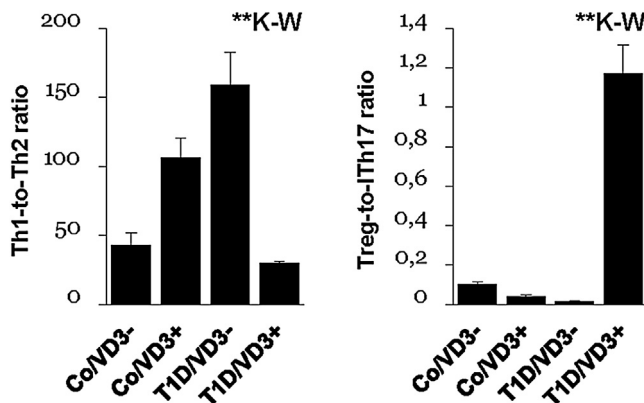


Fig. 5. Effect of 1 $\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on Th1-to-Th2 and Treg-to-Th17 ratios in PBMCs from patients with a new-onset T1D. The Th1-to-Th2 ratio was estimated from the IFN- γ -to-IL-4 ratio. The Treg-to-Th17 ratio was estimated from the IL-10-to-IL-17 ratio. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with type 1 diabetes and four healthy controls ($n = 16$ in each group). IL: interleukin, IFN: interferon, K-W: Kruskal-Wallis test, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, T1D: type 1 diabetes, Th: T helper cells, Treg: regulatory T cells, Co/VD3-: PBMCs from healthy controls not treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Co/VD3+: PBMCs from healthy controls treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, T1D/VD3-: PBMCs from type 1 diabetics not treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, T1D/VD3+: PBMCs from type 1 diabetics treated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: (i) Th1-to-Th2 ratio; Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ or T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$, (ii) Treg-to-Th17 ratio; Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3+, $p < 0.05$.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated control PBMCs ($p = 0.009$ by Mann-Whitney U test). Likewise, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induced a significant decrease of NO production-to-arginase activity ratio when compared to not $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated PBMCs in T1D subjects ($p < 0.01$ by Mann-Whitney U test). Statistical analysis with Kruskal-Wallis shows a significant difference between the four groups ($p = 0.002$).

We see in Fig. 7 that monocytes of patients with T1D express high levels of p-STAT4-to-p-STAT6 ratio compared to monocytes of control subjects ($p < 0.01$ by Mann-Whitney U test). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment induced a significant increase of p-STAT4-to-p-STAT6 ratio in monocytes of healthy controls. On the contrary, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ significantly decreased p-STAT4-to-p-STAT6 ratio in monocytes of type 1 diabetic patients (for both groups, $p < 0.01$ by Mann-Whitney U test). For comparison using Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$.

As indicated in Fig. 8, the levels of combined PICs (IFN- γ + IL-17) were significantly increased in PBMCs of patients than in those of healthy controls; whereas the levels of combined AICs (IL-4 + IL-10) were significantly decreased (for both comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, treatment of PBMCs with the biologically active form of vitamin D_3 induced a significant decrease in AICs levels when comparing between PBMCs of control subjects ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Moreover, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment down-regulated the levels of PICs and up-regulated the levels of AICs in PBMCs of type 1 diabetics (for both PICs and AICs, $p < 0.05$). Furthermore, PICs-to-AICs ratio was significantly increased in untreated PBMCs of type 1 diabetics when compared to untreated PBMCs of healthy controls ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Similarly, PICs-to-AICs ratio was significantly increased in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated PBMCs compared to not $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated PBMCs in healthy controls ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test).

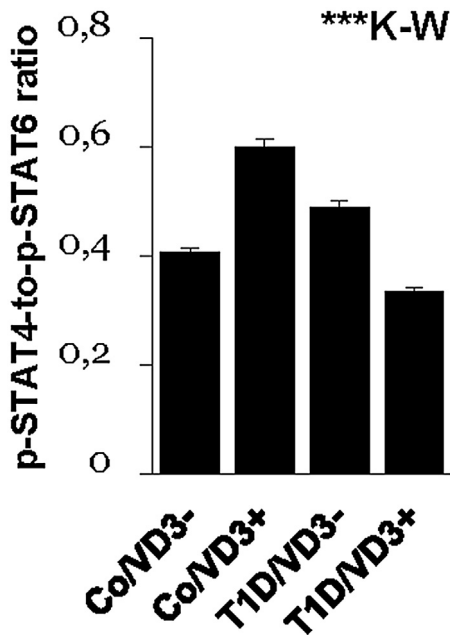


Fig. 7. Effect of 1 alpha,25(OH)₂D₃ on p-STAT4-to-p-STAT6 ratio in monocytes from patients with a new-onset T1D. Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with type 1 diabetes and four healthy controls (n = 16 in each group). K-W: Kruskal-Wallis test, STAT: signal transducer and activator of transcription, T1D: type 1 diabetes, Co/VD3-: monocytes from healthy controls not treated with 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: monocytes from healthy controls treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: monocytes from type 1 diabetics not treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: monocytes from type 1 diabetics treated with 1,25(OH)₂D₃. ****p* < 0.001 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3- vs. T1D/VD3+ or Co/VD3+ vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ or T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, *p* < 0.01.

Conversely, 1,25(OH)₂D₃ treatment induced a significant decrease in PICs-to-AICs ratio in PBMCs of patients with T1D (*p* < 0.05 by Mann-Whitney *U* test). Overall *p*-values were less than 0.01 using Kruskal-Wallis test.

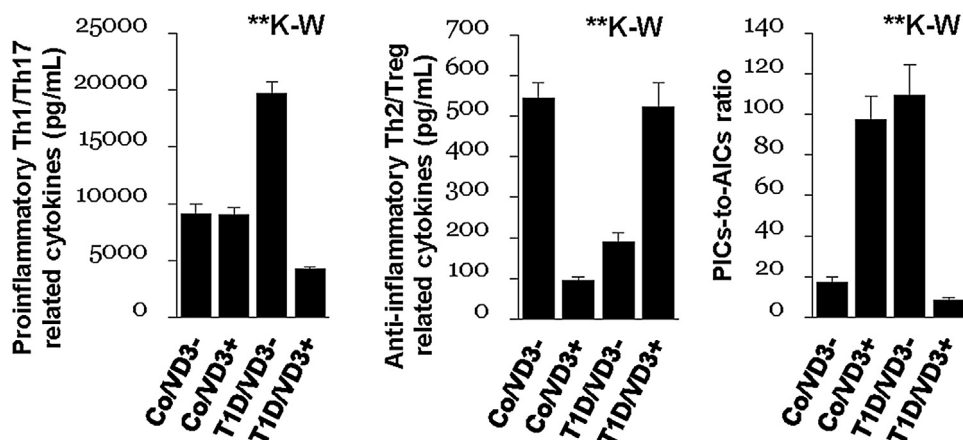


Fig. 8. Effect of 1 alpha,25(OH)₂D₃ on combined proinflammatory Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg related cytokines in PBMCs from patients with a new-onset T1D. Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with type 1 diabetes and four healthy controls (n = 16 in each group). AICs: anti-inflammatory cytokines (IL-4 + IL-10), IL: interleukin, K-W: Kruskal-Wallis test, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, PICs: proinflammatory cytokines (IFNγ + IL-17), T1D: type 1 diabetes, Th: T helper cells, Treg: regulatory T cells, Co/VD3-: PBMCs from healthy controls not treated with 1,25(OH)₂D₃, Co/VD3+: PBMCs from healthy controls treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3-: PBMCs from type 1 diabetics not treated with 1,25(OH)₂D₃, T1D/VD3+: PBMCs from type 1 diabetics treated with 1,25(OH)₂D₃. ***p* < 0.01 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: (i) PICs; Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3- vs. T1D/VD3+ or Co/VD3+ vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ or T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, *p* < 0.05, (ii) AICs; Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3- or Co/VD3+ vs. T1D/VD3+ or T1D/VD3- vs. T1D/VD3+, *p* < 0.05, (iii) PICs-to-AICs ratio; Co/VD3- vs. Co/VD3+ or Co/VD3- vs. T1D/VD3- or Co/VD3- vs. T1D/VD3+ or Co/VD3+ vs. T1D/VD3- or T1D/VD3+ vs. T1D/VD3+, *p* < 0.05.

4. Discussion

T1D results from the destruction of pancreatic β-cells following their exposition to inflammatory products, including cytokines and free radicals, and/or their direct contact with islet-autoreactive T cells and macrophages. It has been suggested that T helper-1-related proinflammatory cytokines might play the principal role in immune response leading to damage of β-cells, but in almost cases, the development of T1D is associated with a defective immunoregulation [31]. On the other hand, it is known that the differentiation of T CD4 cells into effectors T cells depends on cytokines that are present in PLN microenvironment, but also on specific transcription factors and co-stimulatory signals [32]. Other factors with beneficial effect on protective immunity, in particular on the regulation of inflammatory responses, seem to be involved in T CD4 cells activation and differentiation, such as vitamin D₃. The immunomodulatory properties of vitamin D₃ have been explored in different models of autoimmune diseases, including T1D. Therefore, a number of protective effects against pancreatic β-cells destruction by the bioactive form of vitamin D₃ have been described, through several mechanisms, including the decrease of major histocompatibility complex (MHC) class I expression [33], and the down-regulation of the first apoptosis signal (Fas, also known as Apo-1 or CD95) expression [34]. Nevertheless, the main anti-inflammatory and immunoregulatory actions of vitamin D₃ seem to be mediated through the control of cytokines production.

The protective role of vitamin D has been checked in animal model for T1D using some synthetic vitamin D receptor (VDR) ligands at the beginning of the disease. Therefore, it has previously been demonstrated in non-obese adult mice (NOD/Lt), that the analog 1,25-dihydroxy-16,23Z-diene-26,27-hexafluoro-19-nor vitamin D₃ (BXL-219, formerly Ro 26-2198), which modulates the immune response through antigen-presenting cells and activated T cells [35] and prevents dendritic cell maturation, is able, at nonhypercalcemic doses and short treatment, to decrease lipopolysaccharide-induced IL-12 and γ-interferon production, and to increase frequency of CD4+CD25+ regulatory T cells in PLN [36], but also to decrease the production of proinflammatory chemokines by islet cells, and therefore selectively blocking Th1 cell infiltration into the pancreas. BXL-219 has also been able to increase

the regulation of nuclear factor of kappa light-chain polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha (I κ B α) in the islet cells, and subsequently to decrease the production of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) [37].

The differentiation of naive T helper precursor (Thp) cells into T-helper 1 (Th1) cells or into Th2 cells depends on the local cytokines microenvironment. In this study, we observed an increase in the production levels of the Th1-related cytokine IFN- γ in PBMCs from type 1 diabetics, which corroborate and extend previous findings [38,39]. It has been demonstrated that the Th1 cytokines produced by PBMCs in T1D can influence the activation of macrophages and cytotoxic cells, which lead to the autoimmune destruction of β -cells. Conversely, we observed that IL-4 production by *in vitro*-activated PBMCs from T1D patients was decreased. Our results are consistent with previous data regarding the production levels of Th2-related cytokines by T1D PBMCs [40]. Additionally, we showed that the Th1-to-Th2-ratio as evaluated by IFN- γ -to-IL-4 ratio was increased in PBMCs from type 1 diabetics. In the same way, it has previously been reported that the destructive insulinitis correlates with high IFN- γ -to-IL-4 ratio [41]. Moreover, we observed that 1,25(OH) $_2$ D $_3$ downregulated IFN- γ levels and Th1-to-Th2-ratio, and upregulated levels of IL-4 in type 1 diabetics. We therefore suggest that the biologically active vitamin D $_3$ can modulate Th1- and Th2-mediated immune responses in T1D.

Regulatory CD4 $^+$ T cells (Tregs) play a vital role in maintaining immunological peripheral tolerance and prevention of autoimmunity. It has been reported that IL-10 is one of the main anti-inflammatory cytokines that are needed for suppression of immune-activating function of other immune cells by limiting the pro-inflammatory cytokines production, including Th1 cytokine IFN- γ [42]. In contrast to IL-10, the proinflammatory IL-17, which is typically produced by a lineage of CD4 $^+$ Th17 cells, has been reported to be involved in the pathogenesis of several autoimmune diseases, like T1D [5]. As recently shown, T cells and monocytes from T1D patients produce high levels of IL-17 [43]. Additional studies in the multiple low dose streptozotocin induced (MLDSTZ) T1D model have found that Treg cells showed an increased production of IL-17 and a decreased production of IL-10 [44]. These data are in fully agreement with our results. On the other hand, we observed that 1,25(OH) $_2$ D $_3$ downregulated production of IL-17, upregulated production of IL-10, and increased Treg-to-Th17 ratio in PBMCs from type 1 diabetic patients. Our results seem to corroborate recent data reporting that 1,25(OH) $_2$ D $_3$ may act directly on T cells to promote secretion of IL-10 and inhibition of proinflammatory cytokines production, including IL-17 [21,45] and IFN- γ [46]. Nevertheless, to the best of our knowledge, there are no similar studies focusing on T1D allowing us to make a more direct comparison with our results.

Nitric oxide is considered as a bioactive signaling messenger, which plays an important role in innate immune responses. It is synthesized from the amino acid L-arginine by a complex family of intracellular enzymes called NO synthase (NOS), of which three distinct isoforms have been isolated, purified and cloned; constitutively (cNOS) expressed neuronal NOS (NOS1 or nNOS) and endothelial NOS (NOS3 or eNOS) or an inducible isoform (NOS2 or iNOS) [47]. L-arginine is also the substrate for the enzyme arginase [48]. NOS and arginase can define respectively the classically activated proinflammatory M1 macrophages and the alternatively activated anti-inflammatory M2 macrophages [49]. It has previously been reported that Km of mammalian arginases is in the 2–20 mM range and of the various NOS isoenzymes in the 2–20 μ M range [50]. Although the affinity of arginase for arginine appeared higher than that of NOS, the expression of each other depends on the immune conditions. So during inflammation, a high amount of NO can be produced by human monocytes/macrophages by the induction of iNOS expression in response to proinflammatory

cytokines [51], such as IFN- γ , through the activation of the NF- κ B pathway [52,53]. Arginase can be expressed to competes with iNOS for arginine and therefore contributes to suppresses M1/Th1 immune responses, and this appears to be as an essential mechanism of inflammation-associated immunosuppression [54].

It has been reported that increased NO production can cause pancreatic β -cell damage and dysfunction [55]. Although there are no *ex vivo* investigation on NO production using human T1D PBMCs, our results supports and complement previous findings showing increased circulating levels of NO production in T1D patients [56,57]. Here, we demonstrated for the first time that 1,25(OH) $_2$ D $_3$ downregulated the NO production, upregulated the arginase activity, and decreased NO production-to-arginase activity ratio in both T1D and control PBMCs. Interestingly, it would be far more judicious to check if the increase in arginase activity and/or anti-inflammatory cytokines is behind the diminution of the NO production.

Monocytes are highly plastic and heterogeneous cells that are able to change their functional phenotype in response to different stimuli [58]. Therefore, to study the impact of environmental cytokine cues on signal transduction in monocyte of T1D, we have evaluated the relative phosphorylation expression of STAT4 (p-STAT4) and STAT6 (p-STAT6) in activated monocytes from T1D and healthy controls, cultured in the presence or absence of biologically active vitamin D $_3$.

STAT proteins are a seven-member family of intracellular transcription factors that are involved in signal transduction by cytokines, hormones, and growth factors. They can contribute to several events, including survival, proliferation, differentiation, apoptosis, angiogenesis, fetal development, transformation, inflammation, and immune response [59,60]. Of this family, STAT4 and STAT6 are key transcription factors for the polarization of T helper cells. Thus, STAT4 is required for the development of Th1 cells, and is predominantly activated by IL-12, but can also be phosphorylated in response to IFN- γ stimulation in human cells through activation of Janus kinase 1 (Jak1) and Tyrosine kinase 2 (Tyk2) [27]. The combination of Jak2 with Tyk2 can also be required for IFN- γ signaling and the differentiation of IFN- γ -producing Th1 cells from naive Th cells [61]. STAT6 is activated by IL-4 and is critical for the development of Th2 cells [62]. Both STAT4 and STAT6 can also be expressed in activated mononuclear cells, including peripheral blood monocytes [26,63].

Our results revealed high levels of p-STAT4 and p-STAT4-to-p-STAT6 ratio and decreased levels of p-STAT6 in monocytes from type 1 diabetic patients, which indicates the predominant effect of Th1 cytokines on the expression of STAT4 in T1D monocytes. In addition, our study is consistent with the data demonstrating that isolated monocytes from blood of recent-onset T1D produce significantly proinflammatory cytokines that are able to induce and expand Th17 cells, as well as the differentiation/expansion of CD4 T cells into Th17/Th1 cells [64]. Of note, we observed that treatment of monocytes with 1,25(OH) $_2$ D $_3$ induced increase in relative levels of p-STAT6 and decrease in those of p-STAT4 and p-STAT4-to-p-STAT6 ratio. Our work provide new insight regarding the effect of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ on STAT4 and STAT6 activation in T1D monocytes. So we suggest that 1,25(OH) $_2$ D $_3$ may reverse the activation of inflammatory pathways involving the canonical Jak/STAT signal transduction cascade in monocytes at the onset T1D.

Inflammatory mediators might contribute to major immune response against pancreatic β -cells. They contribute to insulinitis and destruction of β -cell and mediate the dialog between pancreatic islets and offensive immune infiltrating cells [65]. The combination of proinflammatory mediators has been reported to predispose β -cells for lysis by autoreactive cytotoxic T cells [66]. It has previously been observed that AICs, including Th2/Treg related cytokines, are decreased in T1D [67]. These data are in agreement with our results

showing that T1D PBMCs produced higher levels of combined PICs (IFN- γ + IL-17) and lower levels of combined AICs (IL-4 + IL-10). Interestingly, it has been reported that the loss of β -cell mass is not caused only by increased generation of proinflammatory cytokines, but it can also be provoked by a concomitant loss of anti-inflammatory cytokines [68]. Furthermore, additional data in NOD mice model have revealed that T1D can be delay with IL-4, IL-10 or IL-13 treatment [69], and its incidence can be reduced by adoptive transfer of anti-inflammatory M2 macrophages and Treg cells [70]. Since immunomodulation properties may vary depending on the overall patterns of cytokines, the evaluation of the 1,25(OH) $_2$ D $_3$ effect on the levels of combined cytokines and on the PICs/AICs balance would be much more informative than the assessment of its effect on PICs or AICs separately. In our study, we observed that 1,25(OH) $_2$ D $_3$ not only downregulated levels of PICs and upregulated those of AICs, but also decreased PICs-to-AICs ratio in T1D PBMCs.

5. Conclusions and future prospects

This is the first report exploring the role of vitamin D on the modulation of the production of cytokines by PBMCs and the activation of STAT4 and STAT6 in monocytes among human recent-onset T1D. Our results demonstrate that this hormone can differentially modulate proinflammatory *versus* anti-inflammatory cytokine production depending on immune conditions. It can reverse the activation of inflammatory pathways and promote the production of anti-inflammatory and regulatory cytokines, as well as the inhibition of NO production at the onset of T1D. Therefore, it may potentially be suggested as an immunological adjuvant in individuals at risk of the disease. Our results deserves additional investigations, and it would be interesting to: (i) explain why vitamin D may act differently on cytokines production depending on the change in physiological conditions, (ii) determine mechanistically the exact cause of the decreased production of NO after treatment with 1,25(OH) $_2$ D $_3$, (iii) investigate the effect of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ on antigen-specific activation of T cells using other stimulators like T1D-associated glutamic acid decarboxylase 65 (GAD(65)) peptide a.a. 247–279, and (iv) test the effect of some synthetic VDR ligands, like BXL-219, on pro- and anti-inflammatory cytokine balance, but also on the signaling pathways implicated in the polarization of monocytes/macrophages, knowing that the VDR is constitutively expressed by macrophages and its downstream targets are induced by its natural ligand, *i.e.* 1,25(OH) $_2$ D $_3$ [71].

Conflict of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

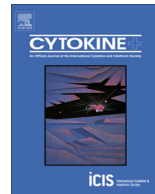
Acknowledgments

The authors would like to thank MSc Ahmed Belamri and all the staff of BIOMOLIM Laboratory (University of Tlemcen, Algeria), for their appreciated assistance. They also are grateful to Pr. Gérard Lefranc (Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, CNRS UPR 1142, and University of Montpellier, France) for his inestimable help and proofreading of the manuscript.

References

- [1] D. Dabelea, The accelerating epidemic of childhood diabetes, *Lancet Lond. Engl.* 373 (2009) 1999–2000, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60874-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60874-6).
- [2] J.-W. Yoon, H.-S. Jun, Autoimmune destruction of pancreatic beta cells, *Am. J. Ther.* 12 (2005) 580–591.
- [3] M. Aribi, Autoimmunity and immunotherapy of type 1 diabetes, in: D. Wagner (Ed.), *Type 1 Diabetes ? Pathog. Genet. Immunother. InTech*, 2011.
- [4] M. Hiroi, Y. Sakaeda, H. Yamaguchi, Y. Ohmori, Anti-inflammatory cytokine interleukin-4 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription, *Mediators Inflamm.* 2013 (2013) 369693, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/369693>.
- [5] J. Honkanen, J.K. Nieminen, R. Gao, K. Luopajarvi, H.M. Salo, J. Ilonen, et al., IL-17 immunity in human type 1 diabetes, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 185 (2010) 1959–1967, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000788>.
- [6] J. Ludvigsson, M. Faresjö, M. Hjorth, S. Axelsson, M. Chéramy, M. Pihl, et al., GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 1909–1920, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0804328>.
- [7] S.L. Thrower, L. James, W. Hall, K.M. Green, S. Arif, J.S. Allen, et al., Proinsulin peptide immunotherapy in type 1 diabetes: report of a first-in-man Phase I safety study, *Clin. Exp. Immunol.* 155 (2009) 156–165, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03814.x>.
- [8] J.A. Dromei, B.H. Lee, H. Yu, H.E. Young, D.J. Thearle, K.P. Jensen, et al., Generation and expansion of regulatory human CD4(+) T-cell clones specific for pancreatic islet autoantigens, *J. Autoimmun.* 36 (2011) 47–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2010.10.005>.
- [9] M.F. Holick, Vitamin D deficiency, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 266–281, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra070553>.
- [10] Y. Schoindre, B. Terrier, J.-E. Kahn, D. Saadoun, J.-C. Souberbielle, O. Benveniste, et al., [Vitamin D and autoimmunity first part: fundamental aspects], *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne* 33 (2012) 80–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2011.11.009>.
- [11] C. Rachez, L.P. Freedman, Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions, *Gene* 246 (2000) 9–21.
- [12] Y. Zhang, D.Y.M. Leung, B.N. Richers, Y. Liu, L.K. Remigio, D.W. Riches, et al., Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 188 (2012) 2127–2135, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1102412>.
- [13] W. Nouari, L. Ysmail-Dahlouk, M. Aribi, Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. Immunopharmacol.* 30 (2016) 94–101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>.
- [14] M.D. Griffin, N. Xing, R. Kumar, D. Vitamin, its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation, *Annu. Rev. Nutr.* 23 (2003) 117–145, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073114>.
- [15] H.F. Deluca, M.T. Cantorna, Vitamin D: its role and uses in immunology, *FASEB J.* 15 (2001) 2579–2585, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0433rev>.
- [16] C. Aranow, Vitamin D and the immune system, *J. Invest. Med.* 59 (2011) 881–886, <http://dx.doi.org/10.2311/JIM.0b013e31821b8755>.
- [17] L.C. Stene, J. Ulriksen, P. Magnus, G. Joner, Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type 1 diabetes in the offspring, *Diabetologia* 43 (2000) 1093–1098, <http://dx.doi.org/10.1007/s001250051499>.
- [18] E. Hyppönen, E. Läärä, A. Reunanen, M.R. Järvelin, S.M. Virtanen, Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study, *Lancet Lond. Engl.* 358 (2001) 1500–1503, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06580-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06580-1).
- [19] A. Richardson, S. Fedoroff, Quantification of cells in culture, in: S. Fedoroff, A. Richardson (Eds.), *Protoc. Neural Cell Cult.*, Humana Press, Totowa, NJ, 1997, pp. 219–233.
- [20] U. Prabhakar, E. Eirikis, M. Reddy, E. Silvestro, S. Spitz, C. Pendley, et al., Validation and comparative analysis of a multiplexed assay for the simultaneous quantitative measurement of Th1/Th2 cytokines in human serum and human peripheral blood mononuclear cell culture supernatants, *J. Immunol. Methods* 291 (2004) 27–38, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.04.018>.
- [21] L.E. Jeffery, F. Burke, M. Mura, Y. Zheng, O.S. Qureshi, M. Hewison, et al., 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 183 (2009) 5458–5467, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803217>.
- [22] I. Guevara, J. Iwanek, A. Dembińska-Kieć, J. Pankiewicz, A. Wanat, P. Anna, et al., Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 274 (1998) 177–188.
- [23] A. Rouzaut, M.L. Subirá, C. de Miguel, E. Domingo-de-Miguel, A. González, E. Santiago, et al., Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO, *Biochim. Biophys. Acta* 1451 (1999) 319–333.
- [24] M. Yang, Z. Shen, D. Chen, H. Gan, Q. Shen, B. Yang, et al., Effects of 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ (3) on the expressions of vitamin D receptor, STAT5 and cytoskeletal rearrangement in human monocytes incubated with sera from type 2 diabetes patients and diabetic nephropathy patients with uremia, *Inflamm. Res.* 61 (2012) 511–520, <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-012-0441-y>.
- [25] G. Laverna, G. Penna, S. Vetrano, C. Correale, M. Nebuloni, S. Danese, et al., Efficacy of a potent and safe vitamin D receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease, *Immunol. Lett.* 131 (2010) 49–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2010.03.006>.
- [26] D.M. Frucht, M. Aringer, J. Galon, C. Danning, M. Brown, S. Fan, et al., Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 164 (2000) 4659–4664.
- [27] A.L. Wurster, T. Tanaka, M.J. Grusby, The biology of stat4 and stat6, *Oncogene* 19 (2000) 2577–2584, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203485>.

- [28] H.L. Dickensheets, C. Venkataraman, U. Schindler, R.P. Donnelly, Interferons inhibit activation of STAT6 by interleukin 4 in human monocytes by inducing SOCS-1 gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 10800–10805.
- [29] D.G. Altman, *Practical Statistics for Medical Research*, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Fla, 1999.
- [30] E. Whitley, J. Ball, *Statistics review 6: nonparametric methods*, *Crit. Care Lond. Engl.* 6 (2002) 509–513.
- [31] D. Mathis, C. Benoist, Back to central tolerance, *Immunity* 20 (2004) 509–516.
- [32] M. Moser, K.M. Murphy, Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 199–205, <http://dx.doi.org/10.1038/79734>.
- [33] H.J. Hahn, B. Kuttler, C. Mathieu, R. Bouillon, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces MHC antigen expression on pancreatic beta-cells in vitro, *Transplant. Proc.* 29 (1997) 2156–2157.
- [34] R. Riachy, B. Vandewalle, E. Moerman, S. Belaich, B. Lukowiak, V. Gmyr, et al., 1,25-Dihydroxyvitamin D3 protects human pancreatic islets against cytokine-induced apoptosis via down-regulation of the Fas receptor, *Apoptosis Int. J. Program Cell Death* 11 (2006) 151–159, <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-006-3558-z>.
- [35] M. Pedullà, V. Desiderio, A. Graziano, R. d' Aquino, A. Puca, G. Papaccio, Effects of a vitamin D3 analog on diabetes in the bio breeding (BB) rat, *J. Cell. Biochem.* 100 (2007) 808–814, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21095>.
- [36] S. Gregori, N. Giarratana, S. Smiroldo, M. Uskokovic, L. Adorini, A 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice, *Diabetes* 51 (2002) 1367–1374.
- [37] N. Giarratana, G. Penna, S. Amuchastegui, R. Mariani, K.C. Daniel, L. Adorini, A vitamin D analog down-regulates proinflammatory chemokine production by pancreatic islets inhibiting T cell recruitment and type 1 diabetes development, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 173 (2004) 2280–2287.
- [38] M.G.E. Karlsson Faresjö, J. Ernerudh, J. Ludvigsson, Cytokine profile in children during the first 3 months after the diagnosis of type 1 diabetes, *Scand. J. Immunol.* 59 (2004) 517–526, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01420.x>.
- [39] A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes, *Cell Biochem. Biophys.* 48 (2007) 159–163.
- [40] M.J. Rapoport, T. Bistrizter, D. Aharoni, M. Weiss, Y. Ramot, A. Buchs, et al., TH1/TH2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients, *Cytokine* 30 (2005) 219–227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2005.01.012>.
- [41] H. Kolb, *Benign versus destructive insulinitis*, *Diabetes. Metab. Rev.* 13 (1997) 139–146.
- [42] K.W. Moore, A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, T.R. Mosmann, Interleukin-10, *Annu. Rev. Immunol.* 11 (1993) 165–190, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.001121>.
- [43] A.K. Marwaha, S.Q. Crome, C. Panagiotopoulos, K.B. Berg, H. Qin, Q. Ouyang, et al., Cutting edge: increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 185 (2010) 3814–3818, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1001860>.
- [44] K. Singh, E. Kadesjö, J. Lindroos, M. Hjort, M. Lundberg, D. Espes, et al., Interleukin-35 administration counteracts established murine type 1 diabetes? possible involvement of regulatory T cells, *Sci. Rep.* 5 (2015) 12633, <http://dx.doi.org/10.1038/srep12633>.
- [45] E.S. Chambers, C.M. Hawrylowicz, The impact of vitamin D on regulatory T cells, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 11 (2011) 29–36, <http://dx.doi.org/10.1007/s11882-010-0161-8>.
- [46] L. Adorini, G. Penna, Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4 (2008) 404–412, <http://dx.doi.org/10.1038/ncprheum0855>.
- [47] P. Kubes, D.M. McCafferty, Nitric oxide and intestinal inflammation, *Am. J. Med.* 109 (2000) 150–158.
- [48] M. Aribi, W. Meziane, S. Habu, Y. Boulatika, H. Marchandin, L. Aymeric J-, Macrophage bactericidal activities against staphylococcus aureus are enhanced in vivo by selenium supplementation in a dose-dependent manner, *PLoS One* 10 (2015) e0135515, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>.
- [49] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E.I. Closs, M. Munder, Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages, *Front. Immunol.* 5 (2014) 532, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>.
- [50] G. Wu, S.M. Morris, Arginine metabolism: nitric oxide and beyond, *Biochem. J.* 336 (Pt 1) (1998) 1–17.
- [51] N. Reiling, A.J. Ulmer, M. Duchrow, M. Ernst, H.D. Flad, S. Hauschildt, Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 1941–1944, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830240836>.
- [52] M.J. Morgan, Z. Liu, Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling, *Cell Res.* 21 (2011) 103–115, <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.178>.
- [53] V. Vila-del Sol, M.D. Diaz-Munoz, M. Fresno, Requirement of tumor necrosis factor and nuclear factor-κB in the induction by IFN-γ of inducible nitric oxide synthase in macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 81 (2006) 272–283, <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0905529>.
- [54] M. Munder, Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 638–651, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>.
- [55] X. Liu, S. Turban, R.N. Carter, S. Ahmad, L. Ramage, S.P. Webster, et al., β-Cell-Specific glucocorticoid reactivation attenuates inflammatory β-Cell destruction, *Front. Endocrinol.* 5 (2014) 165, <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.00165>.
- [56] A. Savino, P. Pelliccia, C. Schiavone, A. Primavera, S. Tumini, A. Mohn, et al., Serum and urinary nitrites and nitrates and Doppler sonography in children with diabetes, *Diabetes Care* 29 (2006) 2676–2681, <http://dx.doi.org/10.2337/dc06-0346>.
- [57] R.D. Hoeldtke, Nitrosative stress in early type 1 diabetes david H. P. streeten memorial lecture, *Clin. Auton Res.* 13 (2003) 406–421, <http://dx.doi.org/10.1007/s10286-003-0139-x>.
- [58] J. Yang, L. Zhang, C. Yu, X.-F. Yang, H. Wang, Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases, *Biomark Res.* 2 (2014) 1, <http://dx.doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>.
- [59] M. Benekli, M.R. Baer, H. Baumann, M. Wetzler, Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias, *Blood* 101 (2003) 2940–2954, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-04-1204>.
- [60] V. Calò, M. Migliavacca, V. Bazan, M. Macaluso, M. Buscemi, N. Gebbia, et al., STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis, *J. Cell. Physiol.* 197 (2003) 157–168, <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.10364>.
- [61] K. Ghoreschi, A. Laurence, J.J. O'shea, Janus kinases in immune cell signaling, *Immunol. Rev.* 228 (2009) 273–287, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x>.
- [62] M.H. Kaplan, U. Schindler, S.T. Smiley, M.J. Grusby, Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells, *Immunity* 4 (1996) 313–319.
- [63] P.O. Fiset, M.K. Tulic, P.S.A. Skrablin, S.M. Grover, S. Létuvé, B.D. Mazer, et al., Signal transducer and activator of transcription 6 down-regulates toll-like receptor-4 expression of a monocytic cell line, *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 36 (2006) 158–165, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02370.x>.
- [64] E.M. Bradshaw, K. Raddassi, W. Elyaman, T. Orban, P.A. Gottlieb, S.C. Kent, et al., Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 183 (2009) 4432–4439, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900576>.
- [65] D.L. Eizirik, M.L. Colli, F. Ortis, The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes, *Nat. Rev. Endocrinol.* 5 (2009) 219–226, <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2009.21>.
- [66] A.M. Gusdon, J.A. Corbett, C.E. Mathews, Type 1 diabetes: islet inflammation – the contribution of cytokines and beta cells, *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 3 (2006) 367–372, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmec.2006.09.010>.
- [67] A. Kretowski, J. Myśliwiec, I. Kinalska, In vitro interleukin-13 production by peripheral blood in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus and their first degree relatives, *Scand. J. Immunol.* 51 (2000) 321–325.
- [68] M.A. Russell, N.G. Morgan, The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic β-cell, *Islets* 6 (2014) e950547, <http://dx.doi.org/10.4161/19382014.2014.950547>.
- [69] G. Papaccio, F.A. Pisanti, R.D. Montefiano, A. Graziano, M.V.G. Latronico, Th1 and Th2 cytokines exert regulatory effects upon islet microvascular areas in the NOD mouse, *J. Cell. Biochem.* 86 (2002) 651–664, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.10250>.
- [70] R. Parsa, P. Andresen, A. Gillett, S. Mia, X.-M. Zhang, S. Mayans, et al., Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice, *Diabetes* 61 (2012) 2881–2892, <http://dx.doi.org/10.2337/db11-1635>.
- [71] H. Korf, M. Wenes, B. Stijlemans, T. Takiishi, S. Robert, M. Miani, et al., 1,25-Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism, *Immunobiology* 217 (2012) 1292–1300, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.07.018>.



High-density lipoprotein immunomodulates the functional activities of macrophage and cytokines produced during *ex vivo* macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes



Ibtissem Benghalem, Warda Meziane, Zeyneb Hadjij, Lamia Ysmail-Dahlouk, Ahmed Belamri, Kheira Mouhadjer, Mourad Aribi*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, PO Box: 262, Imama-Mansourah, 13000 Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2016

Received in revised form 8 February 2017

Accepted 1 March 2017

Keywords:

Autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells
HDL
Human type 1 diabetes
Macrophage functional activities
Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines
p-STAT4 and p-STAT6

ABSTRACT

Background: Both CD4⁺ T cells and macrophages are mainly involved in the autoimmune-mediated β -cells destruction in type 1 diabetes (T1D). The aim of this study was to examine the effect of HDL on functional activities of macrophage and its ability to regulate the production of cytokines in autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells at the recent-onset human type 1 diabetes.

Methods: Cell samples were isolated from volunteers with recent-onset T1D or healthy controls.

Results: The levels of the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , nitric oxide (NO), and hydrogen peroxide (H₂O₂) were significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls. Similarly, those of intracellular free calcium ions ($_{i}Ca^{2+}$) were slightly, but not significantly increased ($p > 0.05$). Conversely, macrophage exhibited significantly decreased levels of the relative tyrosine phosphorylation of STAT6 (p-STAT6, Tyr641) in culture of T1D cells than in that of cells from healthy controls; while those of p-STAT4 (Tyr693) were significantly increased. Likewise, the levels of IL-4 and IL-10 were significantly decreased in the co-culture of T1D cells compared to co-culture of cells from healthy controls. Additionally, HDL treatment significantly down-regulated the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , NO, H₂O₂, phagocytosis, bacterial killing, the relative tyrosine phosphorylation of macrophage-expressed STAT4 (p-STAT4, Tyr693), as well as the ratio of IL-1 β /IL-10, NO production/arginase activity, p-STAT4/p-STAT6, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, and the combined proinflammatory (PICs)/anti-inflammatory (AICs) cytokines. Moreover, HDL treatment significantly up-regulated the production of IL-4, IL-10, arginase activity, and p-STAT6 (Tyr641) (for all comparisons, $p < 0.001$).

Conclusions: We show for the first time that HDL may reverse both the functional activities of macrophages and immunoinflammatory response during reciprocal macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the beginning of T1D. These findings should open the way for therapeutic trials in the short- and medium-term.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the destruction of insulin-producing β -cells thereby affecting the control of blood glucose level [1,2]. T1D is caused by a loss of self-tolerance and can be initiated by the release of autoantigens within the pancreatic islet cells [3].

Many cells are involved in the destruction of β -cells, such as macrophages, dendritic cells, B cells, and T cells [4]. During the pathogenesis of T1D, pancreatic islets are infiltrated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Several evidences showed that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are crucial in T1D development [4,5]. It has been reported that autoreactive T cells differentiate into effectors by engaging β -cell antigens on local antigen-presenting cells (APCs) [6]. Multiple mechanisms have been invoked to elucidate how β -cells are destroyed. T cells can directly kill the β -cells by cell-to-cell contact, through a cytotoxic process [2], but they can also influence their destruction by the release of proinflammatory cytokines [7].

T cells, in particular, CD4⁺ T cells play a central role in the development of T1D [8]. Naive CD4⁺ T cells are activated after

* Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, Imama-Mansourah, Rocade # 2, Department of Biology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

E-mail addresses: m_aribi@mail.univ-tlemcen.dz, m_aribi@yahoo.fr (M. Aribi).

interaction with major histocompatibility complex (MHC) expressed by professional APCs, and differentiate to either the T helper 1 (Th1) or Th2 subtypes, depending on the exogenous cytokine environment [9]. It has been shown that proinflammatory cytokines, in particular interleukin 1 β (IL-1 β) [10] and IFN- γ secreting CD4⁺ T cells (Th1) are overproduced at the onset of the autoimmune response, which leads to the shift toward Th1-like phenotype [11,12].

Although T1D is considered as a T cell mediated disease, innate immune cells, including macrophages, are highly involved in disease induction. Macrophages are professional phagocytic cells, and can interact as professional APCs with CD4⁺ helper T cells through MHC class II molecules [13]. Macrophages are primary contributors to the creation of the immune environment for the development and activation of cytotoxic T cells that destroy pancreatic β -cells [14]. They can activate CD4⁺ T cells, and subsequently promote their production of IL-2 and IFN- γ , which may help with the maximal activation of CD8⁺ T cells. Additionally, the mechanism of β -cell destruction by macrophages could be also mediated through the release of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) [15,16].

High-density lipoproteins (HDLs) are one of the five groups of lipoproteins. These complex mixture of lipid and protein contain phospholipids, triglycerides, and various proteins, including apolipoproteins A-I (ApoA-I), ApoE and ApoC-II [17]. The most abundant HDL apolipoproteins are apoA-I and apoA-II. Apo A-I is the main structural and functional apoprotein of HDL and plays a key role in the induction of cholesterol efflux from cells. HDL particles can be sub-classified into small HDL particles that promote cholesterol efflux through the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) [18], large HDL₂ particles that interact with liver scavenger receptors class B type 1 (SR-B1), which ensures the delivery of cholesterol to the liver, and intermediate HDL₃ that induces cholesterol efflux through the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) [19].

Lipid rafts are dynamic microdomains within the plasma membrane, which contain high concentrations of cholesterol and sphingolipids [20]. An important function suggested for the lipid raft microdomain is to act as a platform for cell signaling. Of note, MHC class II is located in microdomains rich in lipids. Therefore, the decrease in cholesterol in lipid rafts may cause numerous changes in cell activation and immune responses [21,22].

Interestingly, recent evidence has shown that HDL can inhibit antigen presentation to T cells by reducing the lipid raft [23]. It may influence the action of macrophages and T cells by modulating cholesterol levels in lipid rafts by ApoA-I, which would block the expression of MHC class II molecules and differentiation of macrophages, and therefore cause the inactivation of CD4⁺ T cells [24]. Accumulating evidence suggests that in addition to reverse transport of cholesterol from the periphery to the liver, HDLs play a major role in vasodilation, as well as in the reduction of LDL oxidation, inflammation and apoptosis [25], and they have other important properties, including antioxidant and antithrombotic effects [26]. Additionally, it has been shown that HDLs inhibit toll-like receptor (TLR)-induced proinflammatory cytokine production by macrophages, and are able to induce the macrophage to the activated alternative anti-inflammatory M2 phenotype [27]. Moreover, others researches showed that HDLs and apoA-I inhibit antigen presentation capacity of macrophages and then IL-2 secretion by T cells [28].

In this first report, we have tried to show that HDL molecules could have an *ex vivo* effect on functional activities of macrophage and on the modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines production in co-culture system of macrophage and autologous CD4⁺ T cells at the recent-onset human type 1 diabetes.

2. Materials and methods

2.1. Study design

The effect of HDL was examined on macrophages and on autologous mixed macrophage and CD4⁺ T cells isolated from volunteers with recent-onset human T1D or healthy controls. Samples were divided into four groups, including cells from healthy controls and type 1 diabetics, treated or not (critical controls) with HDL. Assays were performed on the supernatants or on the whole cell lysates. The human monocytes and CD4⁺ T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by immunomagnetic negative selection. The levels of NO production, H₂O₂, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-10, interferon- γ (IFN- γ), protein, *if*Ca²⁺, and arginase activity assays were carried out on co-cultures containing monocyte-derived macrophages (MDMs) and CD4⁺ T cells, supplemented or not with purified HDL. The relative amounts of signal transducer and activator of transcription (STAT) phosphorylation at tyrosine 693 (p-STAT4) and tyrosine 641 (p-STAT6) were evaluated in macrophages stimulated by the respective Th1- and Th2-related cytokines. Phagocytosis and bacterial killing were performed on a mixture of macrophage, *Staphylococcus aureus* and HDL. Each experiment was repeated independently at least 4 times, each run in duplicate or triplicate (Fig. 1).

2.2. Preparation of human PBMCs

Blood samples were obtained from healthy donors and patient volunteers with recent-onset T1D, after obtaining informed consent and approval by the local Ethics Committee. Fresh venous blood was collected into EDTA or heparin tubes (BD, Belliver Industrial Estate, UK). PBMCs were isolated by using gradient density centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). After washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), PBMCs were suspended in 1 mL of RPMI 1640. Viability was assessed using Trypan Blue Exclusion Test (TBET).

2.3. Monocyte-derived macrophages isolation

Isolation of monocytes was performed from PBMCs by negative selection using the Human Enrichment EasySep Monocytes kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Monocytes purification was performed according to the manufacturer's instructions. The cell suspensions purity was 90–95% as assessed by flow cytometry. Monocytes were seeded in 24 or 96 well plates at 2.5–5 \times 10⁵ cells/mL and differentiated into macrophages in RPMI 1640 media with 2 mmol/L L-glutamine containing 10% autologous serum and 50 μ g/mL gentamycin in 5% CO₂ at 37 °C. After 48 h, non-adherent cells were removed; whilst macrophages remained attached to the bottom of the plate.

2.4. Isolation of CD4⁺ T cells

CD4⁺ T cells were highly purified (reaching up to 99%) by negative selection using Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Briefly, 2 mL of whole blood were mixed with 100 μ L of human CD4⁺ T cell enrichment cocktail and incubated for 20 min at room temperature, after dilution with PBS containing 2% FBS, then separated with Ficoll-Paque™ PLUS (Catalog # 07957) with an equal volume. Finally, CD4⁺ T cells were collected after centrifugation (1200 \times g for 20 min), and then maintained in RPMI 1640 medium with 10% autologous serum and IL-2 (20 UI/mL) until analyzed.

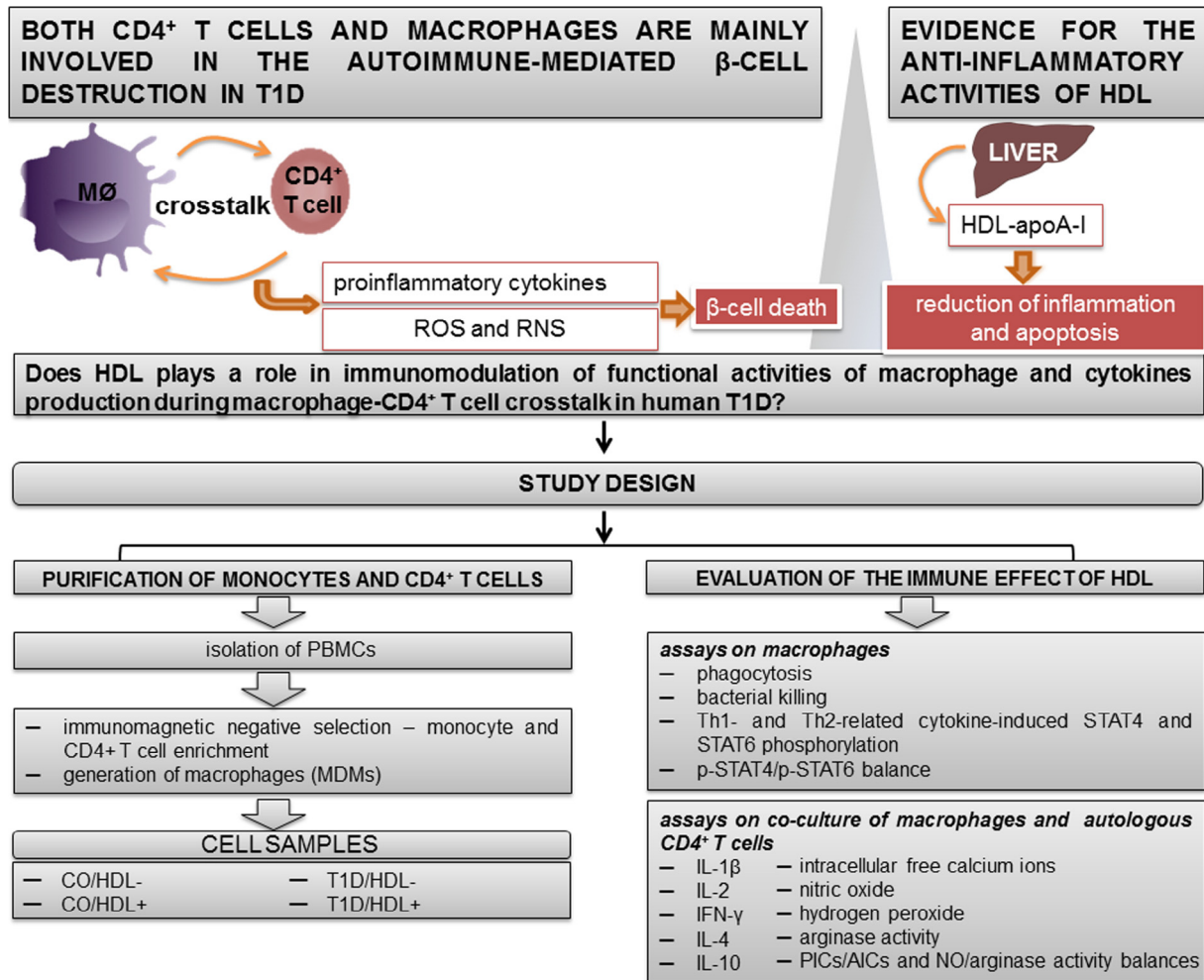


Fig. 1. Study flow-chart. In the current study, we evaluated the *ex vivo* effect of HDL on immunomodulation of functional activities of macrophage and the production of pro- and anti-inflammatory cytokines during *ex vivo* macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk in human early T1D. AICs: anti-inflammatory cytokines, apoA-I: apolipoprotein A-I, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, IFN- γ : interferon gamma, MDM: monocyte-derived macrophage, NO: nitric oxide, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, PICs: proinflammatory cytokines, p-STAT4 (Tyr693): STAT4 phosphorylation on tyrosine 693, p-STAT6 (Tyr641): STAT6 phosphorylation on tyrosine 641, ROS: reactive oxygen species, RNS: reactive nitrogen species, STAT: signal transducer and activator of transcription, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL, Th: T helper cells.

2.5. Isolation of HDL

Lipoproteins were isolated from human plasma by sequential ultracentrifugation from the same fasted donor as described [29,30]. Plasma was separated by centrifugation at $1500 \times g$ at 4 °C for 15 min. HDL were identified at the following between densities (1.063–1.210 g/mL), and isolated by ultracentrifugation too as described earlier [31]. Plasma density was adjusted to 1.346 g/mL with KBr, and normal saline (1.006 g/mL) was layered over the adjusted plasma to form a discontinuous density gradient of NaCl/KBr [32]. The sample loaded and the gradient tubes were centrifuged and spun at $350\,000 \times g$ for 3.5 h at 4 °C. HDL from each patient was then sterilized and stored at -20 °C until analysis within 6 months [33].

2.6. Co-culture system of macrophages and CD4⁺ T cells and HDL treatment

Cell samples from normal subjects and type 1 diabetic patients were prepared in the same way. First, purified MDMs were seeded into 96 or 24 well flat bottom plates at $1 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ per well, and were activated into APCs after incubation for 24 h with 20 ng/mL of

IFN- γ [34]. After removal of IFN- γ , activated MDMs were co-cultured with autologous CD4⁺ T cells at a concentration of $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ per well after stimulation with 20 $\mu\text{g/mL}$ phytohaemagglutinin (PHA-L, Calbiochem) [33]. Co-cultures were incubated for 24–48 h at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin and 10% autologous serum, in the presence or absence of HDL at a dose of 50 $\mu\text{g/mL}$ [35,36].

2.7. Cell lysis assay

For protein, $i\text{Ca}^{2+}$ and arginase activity assays, cells were lysed as described [37]. Briefly, cells were treated for 30 min with 500 μL of 0.1% Triton X 100. Reaction was stopped by the addition of a mixture containing Tris-HCl and MnCl₂.

2.8. Protein assay

Protein concentration was measured on the cell lysates at 540 nm using a commercial kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Middletown, USA).

2.9. Respiratory burst assay

Respiratory burst assay was carried out by the determination of the levels of NO production and H₂O₂ [37,38].

2.9.1. Nitric oxide assay

NO levels were assessed on supernatants by measuring the accumulation of stable oxidative metabolites (NO_x, nitrite and nitrate), with the sensitive colorimetric Griess reaction, using trichloroacetic acid (TCA), vanadium (III) and Griess reagent chloride, as described [39]. Absorbance was measured at 540 nm on the ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The amount of nitrite in the sample was achieved by reference to a standard curve constructed using sodium nitrite.

2.9.2. Hydrogen peroxide assay

H₂O₂ was measured by the adapted method of Pick and Keisari [40] with some modifications [41]. This method is based on the use of a buffered Phenol Red Solution (PRS), which contains a peroxide assay buffer (PAB) (5.0 mM K₂HPO₄, 1.0 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 0.5 mM glucose adjusted to pH 7.4), 0.28 mM (0.1 g/L) of phenol red (phenolsulfonphthalein) and 8.5 U/L (50 μg/mL) of horseradish peroxidase (HRPO, EC 1.11.1.7). The PRS solution was prepared immediately prior to the assay, by adding phenol red and HRPO to 2.1 mL of PAB at a final concentration of 0.46 mM and 0.046 U/mL, respectively. Supernatant were added to the assay mixture at a ratio of 1–4 and then incubated for 30 min at 37 °C [42]. To stop the reaction, 10 μL of 1 N NaOH was added. The H₂O₂ levels were measured spectrophotometrically at 610 nm against a blank containing buffered PRS and NaOH at the appropriate concentrations. A standard curve was prepared by the use of dilutions of 30% H₂O₂.

2.10. Intracellular free calcium ions assay

The levels of intracellular free calcium ions (*i*_rCa²⁺) were biochemically determined on cell lysates with the orthocresolphthalein (OCP) complexone method [43], based on the formation of a chromogenic complex resulting from the reaction of OCP with calcium ions in alkaline solution. The free calcium ions content were spectrophotometry determined at 560 nm against a blank using a commercial kit (BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain). The levels of *i*_rCa²⁺ were expressed as μg/mg proteins.

2.11. Staphylococcus aureus strain

S. aureus ATCC 6538 strain (American Type Culture Collection) was used for the phagocytosis and bacterial killing assays. Bacteria were grown overnight in trypticase soy broth (TSB) at 37 °C. The optical density (OD) of 0.5 McFarland turbidity as measured by a colorimeter at 600 nm and confirmed by bacterial count corresponded to 10⁸ CFU/mL [44].

2.12. Phagocytosis and bacterial killing assays

These assays were performed as described in detail [37,39]. Phagocytosis results were evaluated based on the percentage decrease in the number of viable extracellular bacteria. The percentage of intracellular bacterial killing was determined after the macrophage viability assay after infection using Trypan Blue counting test.

2.13. Arginase activity assay

The activity of arginase (EC 3.5.3.1) were achieved by a spectrophotometric assay based on measuring the concentration of urea in cell lysates after the addition of L-arginine [45–47]. 25 μL of cell lysates, activated by heating for 10 min at 56 °C, were added to 200 μL aliquot of arginine buffer (10 mM L-arginine, pH 6.4), and then incubated at 37 °C for 1 h. The reaction was terminated by adding 750 μL of acetic acid [48]. The concentration of urea generated after arginine catabolism by arginase was measured at 600 nm using a commercial kit (UREA/BUN-COLOR, BioSystems, S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain). The arginase activity was expressed as nanomoles of urea released per mg of proteins per 1 h.

2.14. Cytokine assays

Concentration levels of IL-1β, IL-2, IFN-γ, IL-4 and IL-10 were determined in co-culture system containing or not HDL. These cytokines were quantified in supernatants after 24 h by a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with respective commercial kits, according to the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). Optical densities were measured at 450 nm with an ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The limits of detection were 0.3 pg/mL for IL-1β, 4 pg/mL for IL-2, 8 pg/mL for IFN-gamma, 10 pg/mL for IL-4, and 1 pg/mL for IL-10.

2.15. STAT4 and STAT6 phosphorylation assays

The relative amounts of phosphorylated STAT4 and STAT6 assays were performed in adherent macrophages using STAT4 (Tyr693) and STAT6 (Tyr641) ELISA Kits (Abcam, Germany), according to the manufacturer's instructions. First, 5 × 10⁵ cell/mL were incubated in 96-well plate culture at 37 °C and 5% CO₂ during 4 h. Thereafter, MDMs were activated with 100 ng/mL lipopolysaccharides (LPS) (*Escherichia coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (instead of PHA) and treated with 50 μL HDL. STAT4 and STAT6 were activated with 10 ng/mL Th1 signature cytokine IFN-γ or Th2 signature cytokine IL-4, respectively. The absorbance was measured at 450 nm.

2.16. Statistical analyses

All data were expressed as the means ± standard error of mean (SEM). The assumption of normality of data distribution was examined prior to statistical procedures. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* non-parametric tests were used to search differences among all groups and between two groups, respectively [49,50].

3. Results

3.1. Effect of HDL on the production of IL-1β

As indicated in Fig. 2, the production levels of IL-1β were increased in the co-culture of T1D cells compared with that of cells from healthy controls (*p* = 0.029 by Mann-Whitney *U* test). Additionally, HDL treatment significantly down-regulated the production of IL-1β in the co-culture of T1D cells compared with not HDL treated-cells (*p* = 0.014 by Mann-Whitney *U* test). Whereas, treatment with HDL resulted in a significant increase in IL-1β levels in the co-culture of cells from healthy controls (*p* < 0.01 by Mann-Whitney *U* test). For all comparisons using Kruskal-Wallis test, *p*-value was < 0.01.

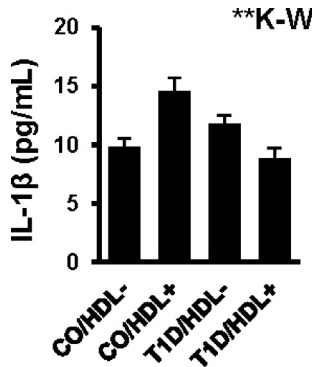


Fig. 2. Effect of HDL on the production of IL-1β in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. IL-1β levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. ***p* < 0.01 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: CO/HDL- vs. CO/HDL+, *p* < 0.01; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, *p* < 0.05; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, *p* < 0.05; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, *p* < 0.01; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, *p* < 0.05.

3.2. Effect of HDL on the production of IL-2

As depicted in Fig. 3, the IL-2 production levels were significantly increased in the co-culture of T1D cells as compared to that of cells from healthy controls (*p* = 0.001 by Mann-Whitney *U* test). In addition, HDL treatment induced a significant decrease in IL-2 production levels in the co-culture of both T1D and cells from healthy controls in comparison to co-cultures without HDL (*p* < 0.001 by Mann-Whitney *U* test). When using Kruskal-Wallis test, *p*-value was less than 0.001.

3.3. Effect of HDL on the production of anti-inflammatory/regulatory cytokine IL-10

As shown in Fig. 4, the production levels of IL-10 are significantly decreased in the co-culture of T1D cells in comparison to

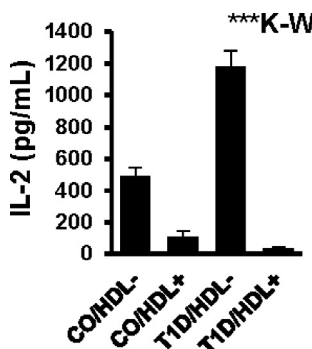


Fig. 3. Effect of HDL on the production of IL-2 in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. IL-2 levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. ****p* < 0.001 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: CO/HDL- vs. CO/HDL+, *p* < 0.001; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, *p* < 0.01; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, *p* < 0.001; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, *p* < 0.001; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, *p* < 0.01; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, *p* < 0.001.

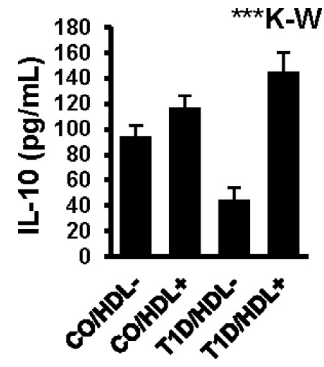


Fig. 4. Effect of HDL on the production of anti-inflammatory/regulatory cytokine IL-10 in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. IL-10 levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. ****p* < 0.001 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: CO/HDL- vs. CO/HDL+, *p* < 0.05; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, *p* < 0.01; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, *p* < 0.05; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, *p* < 0.001; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, *p* < 0.001.

that of cells from healthy controls (*p* = 0.004 by Mann-Whitney *U* test). When treated cells with HDL, the co-culture of T1D cells, but also of control, exhibited a significant increase of IL-10 production levels (respectively, *p* < 0.001 and *p* = 0.035 by Mann-Whitney *U* test). *P*-value was less than 0.001 using Kruskal-Wallis test.

3.4. Effect of HDL on the production of Th1- and Th2-related cytokines

We see in Fig. 5 that the production levels of IFN-γ were significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls; while those of IL-4 were significantly decreased (for both comparisons, *p* < 0.001 by

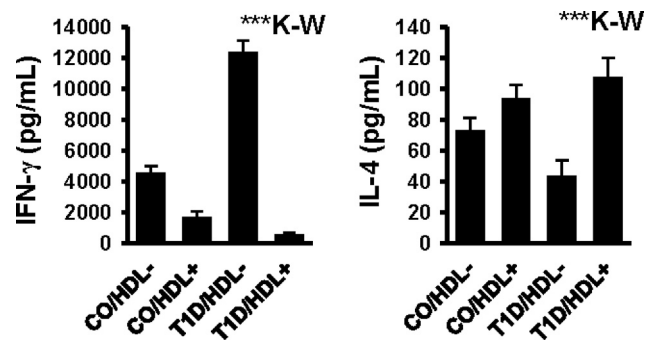


Fig. 5. Effect of HDL on the production of Th1- and Th2-related cytokines in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. IFN-γ and IL-4 were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as respective Th1 and Th2 cell-related cytokines. Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group for both IFN-γ and IL-4 assays. HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, IFN-γ: interferon gamma, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, Th: T helper, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. ****p* < 0.001 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: (i) IFN-γ; CO/HDL- vs. CO/HDL+, *p* < 0.001; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, *p* < 0.001; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, *p* < 0.001; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, *p* < 0.001; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, *p* < 0.001; (ii) IL-4; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, *p* < 0.001; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, *p* < 0.05; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, *p* < 0.001; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, *p* < 0.001.

Mann-Whitney *U* test). Additionally, the production of IFN- γ was substantially inhibited by treatment with HDL, either in the co-culture of T1D and cells from healthy controls ($p < 0.001$ by Mann-Whitney *U* test). However, HDL significantly up-regulated the production of IL-4 in the co-culture of cells from both T1D and healthy controls compared with that of not HDL-treated cells; nevertheless, the difference did not reach significant level for cells from healthy controls (respectively, $p < 0.001$ and $p = 0.070$ by Mann-Whitney *U* test). For the two cytokines, $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test.

3.5. Effect of HDL on intracellular free calcium ions

We see in Fig. 6 that the levels of $i\text{rCa}^{2+}$ were increased in the co-cultures of T1D compared to that of cells from healthy controls; while the difference did not reach a significant level ($p > 0.05$ by Mann-Whitney *U* test). Additionally, treatment with HDL induced a slight increase in the $i\text{rCa}^{2+}$ levels in T1D co-cultures; whereas the difference was not statistically significant ($p > 0.05$ by Mann-Whitney *U* test). *P*-value for multiple comparisons was equal to 0.003 by Kruskal-Wallis test.

3.6. Effect of HDL on functional activities of macrophage

The results in Fig. 7 shows that respiratory burst, as evaluated by NO production and H_2O_2 , was significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls (NO production; $p < 0.001$, H_2O_2 ; $p < 0.01$ by Mann-Whitney *U* test). We showed that HDL treatment significantly down-regulated the levels of NO production and H_2O_2 in the co-culture of T1D cells (for both variables, $p < 0.001$ by Mann-Whitney *U* test). Likewise, HDL treatment resulted in significant down-regulation of the two macrophage respiratory burst biomarkers in the co-culture of cells from healthy controls (NO production; $p < 0.001$, H_2O_2 ; $p = 0.003$ by Mann-Whitney *U* test). Additionally, the results of phagocytosis and bacterial killing assays show that there was no significant differences in both phagocytosis and bacterial killing levels between the co-cultures of T1D and cells from healthy controls (for the two assays, $p > 0.05$ by Mann-Whitney *U* test). However, HDL treatment induced a significant decrease in the levels of phagocytosis and bacterial killing in both co-cultures of T1D and controls cells

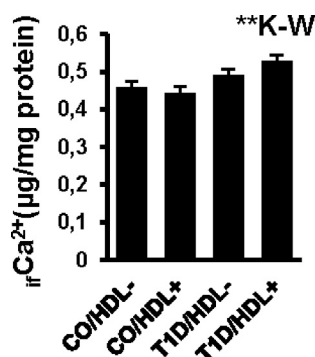


Fig. 6. Effect of HDL on intracellular free calcium ions in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4^+ T cells. Intracellular free calcium ions were biochemically measured by the ortho-cresolphthalein complexone method. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of five independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, $i\text{rCa}^{2+}$: intracellular free calcium ions, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. $**p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. No statistical difference was highlighted among different groups.

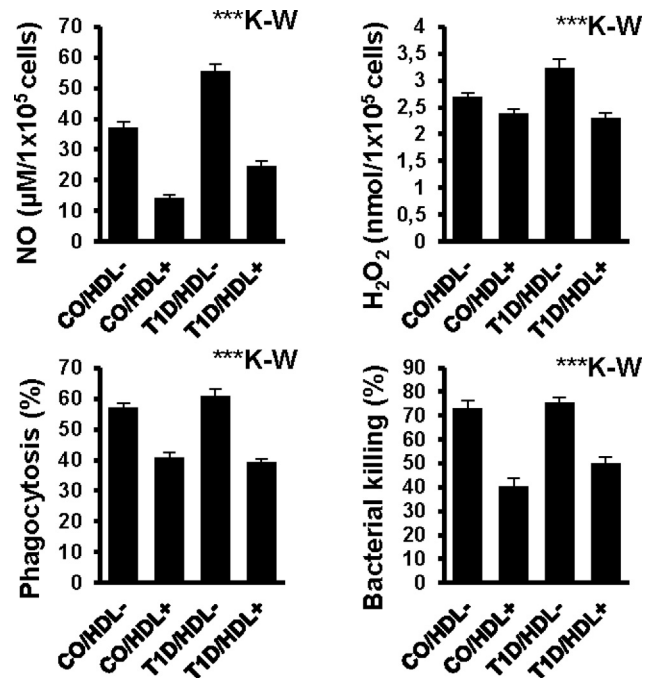


Fig. 7. Effect of HDL on functional activities of macrophage in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4^+ T cells. Functional activities of macrophage were determined by phagocytosis, bacterial killing and respiratory burst assays. The respiratory burst (also referred to as oxidative burst) was performed by measurements of nitric oxide and hydrogen peroxide production. The levels of nitric oxide production were measured by the sensitive Griess reaction. Hydrogen peroxide levels were measured by the adapted method of Pick and Keisari. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four (phagocytosis and bacterial killing assays) or five (NO production and H_2O_2 assays) independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, H_2O_2 : hydrogen peroxide, NO: nitric oxide, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. $***p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: (i) NO production; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (ii) H_2O_2 production; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (iii) Phagocytosis; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (iv) Bacterial killing; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

($p < 0.001$ for all comparisons by Mann-Whitney *U* test). When comparing the overall macrophage functional activities between all groups by Kruskal-Wallis test, *p*-values were less than 0.001 for all variables.

3.7. Effect of HDL on arginase activity

As shown in Fig. 8, the levels of arginase activity was decreased in the co-cultures of T1D when compared to that of cells from healthy controls; while the difference was not significant ($p > 0.05$ by Mann-Whitney *U* test). Additionally, treatment with HDL resulted in up-regulation of arginase activity in the co-culture of T1D cells compared with that of not HDL-treated T1D cells ($p < 0.001$ by Mann-Whitney *U* test); whereas HDL treatment did not result in a difference between the co-cultures of the two cells from healthy controls ($p > 0.05$ by Mann-Whitney *U* test). For all comparisons, $p = 0.005$ by Kruskal-Wallis test.

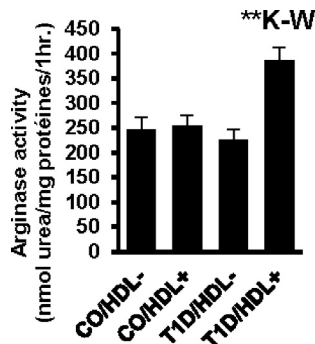


Fig. 8. Effect of HDL on arginase activity in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. Arginase activity levels were spectrophotometrically determined by measurement of the concentration of urea after the addition of L-arginine. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of five independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. $**p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.01$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

3.8. Effect of HDL on STAT4 and STAT6 phosphorylation in macrophage stimulated by the respective Th1- and Th2-related cytokines

We show in Fig. 9 that the relative levels of STAT4 tyrosine phosphorylation (p-STAT4, Tyr693) were significantly increased in macrophages of T1D when compared to that of healthy controls; while those of p-STAT6 (Tyr641) were significantly decreased (for the two comparisons, $p < 0.001$ by Mann-Whitney *U* test). Additionally, we observe that the relative levels of p-STAT4 were significantly down-regulated when macrophage cells from T1D were treated with HDL and, in contrast, those of STAT6 phosphorylation were up-regulated (for both comparisons, $p < 0.001$ by Mann-

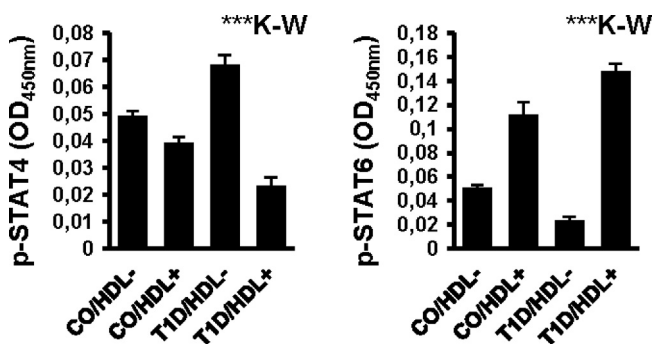


Fig. 9. Effect of HDL on STAT4 and STAT6 phosphorylation in macrophage stimulated by the respective Th1- and Th2-related cytokines. The relative amounts of phosphorylated STAT4 (Tyr693) and STAT6 (Tyr641) levels were measured in macrophage using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), after contact with Th1 or Th2 signature cytokine. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group, for both STAT4 and STAT6 phosphorylation assays. HDL: high density lipoprotein, K-W: Kruskal-Wallis test, p-STAT: phosphorylated signal transducer and activator of transcription, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. $***p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: (i) p-STAT4; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.01$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.01$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (ii) p-STAT6; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.01$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

Whitney *U* test). Similar results were seen when macrophages from healthy controls were treated with HDL (p-STAT4; $p = 0.006$, p-STAT6; $p = 0.001$ by Mann-Whitney *U* test). When comparing between all groups using Kruskal-Wallis test, *p*-value was less than 0.001 for both p-STAT4 and p-STAT6.

3.9. Effect of HDL on the balance of proinflammatory versus anti-inflammatory cytokines, NO production versus arginase activity and p-STAT4 versus p-STAT6

The results illustrated in Fig. 10 shows that the ratio of IL-1 β /IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, combined proinflammatory (PICs, IL-1 β + IL-2 + IFN- γ)/anti-inflammatory (AICs, IL-4 + IL-10) cytokines and NO production/arginase activity were significantly increased in the co-culture of T1D cells than in that of cells from healthy controls (IL-1 β /IL-10, $p < 0.01$; IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10 and PICs/AICs, $p < 0.001$; NO/arginase activity, $p < 0.05$ by Mann-Whitney *U* test). Similarly, p-STAT4/p-STAT6 ratio was significantly increased in macrophages of T1D than in macrophages of healthy controls ($p < 0.001$ by Mann-Whitney *U* test). Additionally, treatment of cells with HDL induced a significant decrease in the levels of the all evaluated ratios, whether in the cultures of T1D cells or in that of cells from healthy controls (T1D cells: IL-1 β /IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10 and NO/arginase activity, $p < 0.001$; PICs/AICs and p-STAT4/p-STAT6, $p < 0.01$. Healthy control cells: IL-1 β /IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, NO/arginase activity and p-STAT4/p-STAT6, $p < 0.001$; PICs/AICs, $p < 0.01$ by Mann-Whitney *U* test). Exceptionally, treatment with HDL resulted, in contrast, in a slight but not statistically significant increase in the level of IL-1 β /IL-10 ratio in the co-culture of cells from healthy controls ($p = 0.366$ by Mann-Whitney *U* test). For multiple comparisons using Kruskal-Wallis test, *p*-values were less than 0.001 for all the evaluated ratios.

4. Discussion

Various studies reported the specific properties of HDL such as anti-atherogenic, anti-inflammatory, antioxidant, and anti-apoptotic [51,52]. Additionally, some studies demonstrated that HDL treatment can inhibit the production of proinflammatory cytokines, including macrophage IL-1 β [53].

It has been reported that HDL can also exert multiple immunomodulation effects. Lipid rafts of the plasma membrane are the key structure responsible for such effects that result from the depletion of cholesterol from microdomains after their interaction with HDL [54]. HDL has also the ability to drive the macrophage to M2 anti-inflammatory state, modulates recruitment/adhesion of monocytes, and inhibits their inflammatory response [55]. Additionally, HDL can inhibit antigen presentation, T cell activation and proliferation [56]. These effects give an important aspect of the HDL action on both innate and adaptive immune responses [26].

Considering these new insights, we have evaluated for the first time the effect of HDL on functional activities of macrophage and on the modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines production during *ex vivo* macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes.

4.1. Effect of HDL on the production of IL-1 β

Although IL-1 β could be generated by different cell lines, including polarized Th17 cells [57], it is considered as a specific signal 3 macrophage-derived cytokine required for CD4⁺ T cell activation [58], and as a signature cytokine for classically proinflammatory activated macrophage (CAM, M1) [37,59,60]. It is an

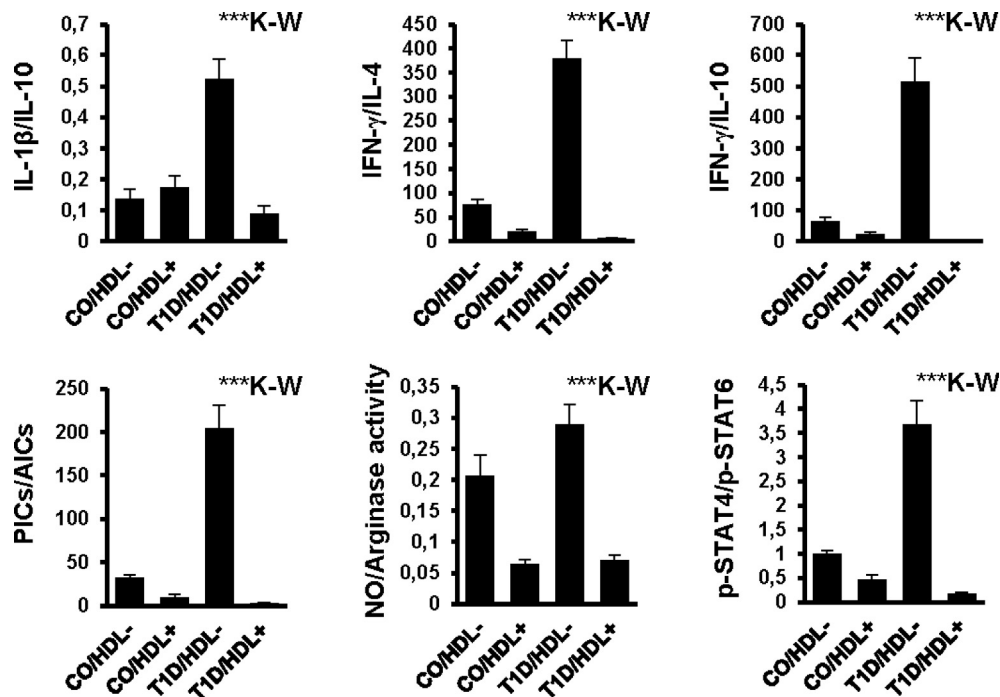


Fig. 10. Effect of HDL on the balance of proinflammatory versus anti-inflammatory cytokines, NO production versus arginase activity and p-STAT4 versus p-STAT6 in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. The PICs/AICs ratio was estimated from the [IL-1 β + IL-2 + IFN- γ]/[IL-4 + IL-10] ratio. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four (IL-1 β /IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, PICs/AICs, and p-STAT4/p-STAT6 ratios) or five (NO production/arginase activity ratio) independent experiments in each group. AICs: anti-inflammatory cytokines, HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, IFN- γ : interferon gamma, NO: nitric oxide, PICs: proinflammatory cytokines, p-STAT: phosphorylated signal transducer and activator of transcription, Th: T helper, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney *U* test: (i) IL-1 β /IL-10; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.01$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.01$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.01$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.01$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (ii) NO production/arginase activity; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.05$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (iii) p-STAT4/p-STAT6; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.01$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (iv) IFN- γ /IL-4; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (v) IFN- γ /IL-10; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (vi) PICs/AICs; CO/HDL- vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL- vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

important inflammatory mediator involved in a variety of cellular activities, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis. In our study, we observed that HDL treatment down-regulated the production of IL-1 β levels in the co-culture of T1D cells, but up-regulated the production of such cytokine in the co-culture of cells from healthy controls. Although a number of studies have shown the inhibitory effect of HDLs or their content on the production of proinflammatory cytokines [61,62], we cannot compare our results with other data because no studies have been done in the same context of our work. Additionally, conflicting results may reflect in part the differences in the type of disease studied and cell types used.

4.2. Effect of HDL on the production of IL-2

IL-2 has been characterized as a Th1-like cytokine [63] that plays a central role in the activation and proliferation of lymphocytes that have been primed by antigens. This cytokine has a pleiotropic role, which drives differentiation, survival and expansion of multiple cell types [64], by stimulating anti-apoptotic, cell cycle, and cytokine genes. It has been reported that IL-2 can override PD-1-mediated inhibition, and that PD-1 may inhibit T cell function and survival indirectly through IL-2 [65]. In our study we observed that HDL treatment resulted in decreased production of IL-2. In T1D, decreasing production of IL-2 could be a double-edged sword, because the activation of regulatory cells protecting

β -cells against autoreactive T cells requires necessarily the presence of such cytokine. So although IL-2 plays a key role in T cell activation and expansion, it serves as a negative regulator of autoimmunity [66]. This observation leads to raising the hypothesis as to whether or not HDLs could have an effect on the function of regulatory cells in human T1D.

4.3. Effect of HDL on the production of regulatory/anti-inflammatory cytokine IL-10

IL-10 is frequently referred to as Th2 cell-derived anti-inflammatory cytokine [67]. It is specifically produced as a regulatory cytokine by Foxp3⁻ type 1 CD4⁺ regulatory T (Tr1) cells [68], but also by alternatively anti-inflammatory activated macrophages (AAM, M2) [69–71]. Numerous other subtypes of CD4⁺ T cells have, however, been shown to produce IL-10 depending on environment cytokines and intrinsic factors [72]. Its main biological functions seem to limit and terminate the inflammatory responses and inhibits both antigen presentation by macrophage [73], as well as subsequent release of proinflammatory cytokines [74], including IFN- γ , IL-1, and IL-2 [75]. Additionally, IL-10 can also act on regulatory T cells to maintain transcription factor Foxp3 expression [76], which can lead to the development of anergy in specific T cells [77]. In view of that, IL-10 has been considered as a critical biomarker molecule for preventing inflammatory and autoimmune pathologies [78]. Of interest, decreasing in the number and/or

function of regulatory cells has been shown to be involved in T1D development. Here, we confirm recent findings regarding the decrease in the levels of IL-10 in T1D [79–81]. Additionally, the effect of HDLs on the increased expression of IL-10 could be demonstrated by the recent observation indicating that HDL and its major protein component apoA-I exert anti-inflammatory effects, inhibit monocyte chemotaxis/adhesion, and reduce vascular macrophage content in inflammatory conditions, as well as up-regulate LPS-induced IL-10 expression [82]. Nevertheless, the difficulty lies in the lack of similar studies on T1D allowing us to compare our results with others. Additionally, it would be of great interest to determine, using a mechanistic study, which cell type is the driver of the change in IL-10 levels.

4.4. Effect of HDL on the production of Th1- and Th2-related cytokines

It is well known that T1D results from the destruction of β -cells by autoreactive T cells, following the action of proinflammatory cytokines. Some research have suggested that IFN- γ , IL-1 β and IL-2 cytokines produced by T cells and macrophages, play an important role in T1D, and are considered to be mediators of stress and death of β -cells [8]. The immune activities of Th1 and Th2 cells are mutually counterregulated, defining a Th1/Th2 balance and homeostatic control. Cytokines that promote Th1 activity tend to down-regulate Th2 activity and in turn Th2 domination inhibits Th1 activity. The balance between T helper cell production of IFN- γ as opposed to IL-4 and IL-10 is particularly important since the Th2 cytokines IL-4 and IL-10 inhibit Th1 activity and the Th1 cytokine IFN- γ inhibits Th2 activity [83]. It has previously been reported that the imbalance in T helper cell polarization contributes to the gender difference in T1D development in NOD mice [84], in which the increased susceptibility of female mice to the development of T1D has been related to the enhancement of the Th1 immune response through the increase of IL-12-induced STAT4 activation by estrogen [85]. In our study, the increased levels of IFN- γ and/or the decreased of those of IL-4 corroborate numerous studies [79,81,86–88]. Levels of both cytokines were reversed after treatment with HDL, which induced down-regulation of IFN- γ and up-regulation of IL-4. Our results can agree with recent study conducted specifically on polarized M1 and M2 macrophages [35]. Nevertheless, it is not easy to discuss our results by comparing them with other findings because we investigate for the first time the effect of HDLs on the modulation of the expression of such cytokines in T1D.

4.5. Effect of HDL on intracellular free calcium ions

Although no effect was noticed in co-cultures of cells from healthy controls, we observed that the HDL treatment induces an increase in $_{i}Ca^{2+}$ levels in the co-culture of T1D cells. Hence, it is well known that HDL leads to an increase of the intracellular calcium concentration in various types of cells in culture, including endothelial cells [89] and macrophages [90]. The increase in $_{i}Ca^{2+}$ levels may be involved as a second messenger for early activation of CD4⁺ T cells [91], and can be able to drive IL-2 production [92]. In our study, although the levels of IL-1 β and IL-2, as well as other proinflammatory markers were decreased following the HDL treatment, those of $_{i}Ca^{2+}$ were increased, which can mainly explained by a crosstalk between calcium-dependent cell signaling pathways. Thus, it has been reported that the increased $_{i}Ca^{2+}$ levels could also serve as a signal for macrophage to modulate inflammation [93] and respiratory burst [94], and as an important mean for the regulation of T cell activation, tolerance of self-antigens, and homeostasis through crosstalk [95]. Finally, it remains to be seen whether the down-regulation effect of HDL on inflammation would be calcium-independent.

4.6. Effect of HDL on functional activities of macrophage

It has previously shown in mouse model of T1D that oxidative stress is one of the main factors involved in islets and vascular tissue damage [96]. Macrophages are able to increase oxidative stress during respiratory burst by producing ROS and RNS, including NO and H₂O₂ [97,98], and therefore participate in the β -cell death. Of note, the evaluation of macrophage role in the pathogenesis of T1D should consider all its functional activities, *i.e.* not only the oxidative burst, but also the activity of phagocytosis and intracellular bacterial killing. In our study, we observed that HDL treatment markedly induced decrease in the overall macrophage functional activities. Accordingly, recent study demonstrated that HDL plays a key role in the regulation of phagocytic cell activity by ApoA-I and apoA-II and stabilization of endogenous ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7) [99]. Additionally, our results can be considered consistent with previous report indicating that HDL are able to decrease oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils (PMN) [100].

4.7. Effect of HDL on arginase activity

The arginase is considered as one of the main anti-inflammatory mediators in the macrophage. It inhibits the NO production, but also T cell activation by decreasing levels of L-arginine [101], and this appears to be as an essential mechanism of inflammation-associated immunosuppression. Therefore, increased activity of arginase and/or the decreased levels of NO production could be used as a good marker of the efficacy of anti-inflammatory drugs, or to check the role and the efficacy of bioactive molecules that are suspected to have an anti-inflammatory or an immunomodulatory effect. So to the best of our knowledge, we show for the first time that HDL up-regulated the activity of arginase in T1D.

4.8. Effect of HDL on STAT4 and STAT6 phosphorylation in macrophage stimulated by the respective Th1- and Th2-related cytokines

STAT proteins are involved in the regulation of various cellular processes such as growth, differentiation, survival, and apoptosis, as well as immune response-induced cytokines. STAT are activated by Janus tyrosine kinases (JAK), which in turn are activated by cytokines. Of the STAT family, STAT4 is mainly activated after stimulation of T cells by IL-12, but can also be activated with Th1 cytokine-enriched microenvironment IFN- γ . In contrast, the Th2 cytokine-enriched IL-4 activates STAT6, which is in turn critical for the development of Th2 cells. Our results confirm those we recently demonstrated in monocytes of recent-onset T1D [79]. Additionally, new therapeutic approaches of HDL could be demonstrated in the current study by highlighting its potential anti-inflammatory property by up-regulation of the relative phosphorylation of STAT6 on tyrosine 641 (Y641) and down-regulation of that of STAT4 on tyrosine 693 (Y693) in macrophage at the recent-onset T1D.

4.9. Effect of HDL on the balance of proinflammatory versus anti-inflammatory cytokines, NO production versus arginase activity and p-STAT4 versus p-STAT6

Our results show increased inflammation-related immune dysregulation at the beginning of T1D, as evidenced by increased ratio of IL-1 β /IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, PICs/AICs, NO production/arginase activity and p-STAT4/p-STAT6. Of note, in addition to the phosphorylation levels of STAT4 and STAT6, the classically activated proinflammatory M1 macrophages and the alternatively activated anti-inflammatory M2 macrophages can be respectively

defined by NOS and arginase [102]. CD4⁺ T cell-related cytokines, including that derived from T helper sub-types and Treg cells, play a crucial role in the macrophage polarization. In turn, the macrophage has also the ability to promote inflammation and Th1 cells (M1 macrophages), or regulation/repair and Th2 cells (M2 macrophages). Therefore, this reciprocal relationship between macrophages and CD4⁺ T cells could be influenced in the same way by the cellular microenvironment. Additionally, it has been reported that, in T1D, the loss of β -cell mass is not caused only by increased production of proinflammatory cytokines, but it can also be induced by a concomitant loss of anti-inflammatory cytokines [79,103]. Consequently, ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production would be of great interest to determine the overall immunomodulatory efficacy of any drug. In support of this opinion, we observed that HDL treatment induced decreased not only in the individual ratio of proinflammatory/anti-inflammatory cytokines, but also in the ratio of combined proinflammatory/anti-inflammatory cytokines. These results more extensively demonstrate the anti-inflammatory and immunoregulatory effects of HDL at the beginning of T1D.

5. Conclusions and future prospects

HDL metabolism represents a major target for the development of therapies. This study supported the hypothesis that high density lipoproteins can modulate both the functional activities of macrophages and immunoinflammatory response during reciprocal macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the recent-onset human T1D. It would be interesting to try other approaches on the molecular mechanisms of HDL on individual populations of the two cells and its effects on antigen presentation and cell-cell contacts. Additionally, although it is now well-established that both CD4⁺ T cells and monocytes/macrophages isolated from type 1 diabetics exhibit an inflammatory feature and secrete increased levels of proinflammatory cytokines, it would be wise to determine the starting populations of both CD4⁺ T cell and macrophage subsets and baseline levels of cytokines produced by each of them. Additionally, it would be of great interest to check mechanistically the effect of HDL on Ca^{2+} in immune mononuclear cells at the recent-onset T1D. Finally, the clinical evaluation will always be necessary to determine the *in vivo* impact of HDL in newly-diagnosed type 1 diabetic patients to reverse the activation of inflammatory pathways.

Conflict of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like give full acknowledgment to Dr. Malik Hamaidia (GIGA-Cancer, Laboratory of Cellular and Molecular Epigenetics, University of Liège, Belgium) for his intellectual input, various suggestions and proofreading of the manuscript.

References

- [1] T.L. van Belle, K.T. Coppieters, M.G. von Herrath, Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 79–118, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00003.2010>.
- [2] M. Li, L.-J. Song, X.-Y. Qin, Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes, *J. Cell Mol. Med.* 18 (2014) 749–758, <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12270>.
- [3] B.O. Roep, M. Peakman, Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (2012) a007781, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a007781>.
- [4] H. Yagi, M. Matsumoto, K. Kunimoto, J. Kawaguchi, S. Makino, M. Harada, Analysis of the roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice, *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 2387–2393, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830220931>.
- [5] P.R. Hutchings, A. Cooke, The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males, *J. Autoimmun.* 3 (1990) 175–185.
- [6] A.E. Long, K.M. Gillespie, S. Rokni, P.J. Bingley, A.J.K. Williams, Rising incidence of type 1 diabetes is associated with altered immunophenotype at diagnosis, *Diabetes* 61 (2012) 683–686, <http://dx.doi.org/10.2337/db11-0962>.
- [7] A. Lehuen, J. Diana, P. Zaccane, A. Cooke, Immune cell crosstalk in type 1 diabetes, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 501–513, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2787>.
- [8] K.L. Graham, R.M. Sutherland, S.I. Mannering, Y. Zhao, J. Chee, B. Krishnamurthy, et al., Pathogenic mechanisms in type 1 diabetes: the islet is both target and driver of disease, *Rev. Diabet. Stud. RDS* 9 (2012) 148–168, <http://dx.doi.org/10.1900/RDS.2012.9.148>.
- [9] L. Steinman, A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage, *Nat. Med.* 13 (2007) 139–145, <http://dx.doi.org/10.1038/nm1551>.
- [10] M. Aribi, S. Moulessehoul, M. Kendouci-Tani, A.B. Benabadi, A. Hichami, N.A. Khan, Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients, *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 3 (2007) CR372–378.
- [11] A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes, *Cell Biochem. Biophys.* 48 (2007) 159–163.
- [12] M. Rachmiel, O. Bloch, T. Bitritzer, N. Weintrob, R. Ofan, N. Koren-Morag, et al., TH1/TH2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma, *Cytokine* 34 (2006) 170–176, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2006.04.012>.
- [13] H.L. Twigg, Macrophages in innate and acquired immunity, *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 25 (2004) 21–31, <http://dx.doi.org/10.1055/s-2004-822302>.
- [14] J.-W. Yoon, H.-S. Jun, Autoimmune destruction of pancreatic beta cells, *Am. J. Ther.* 12 (2005) 580–591.
- [15] H.S. Baek, J.W. Yoon, Direct involvement of macrophages in destruction of beta-cells leading to development of diabetes in virus-infected mice, *Diabetes* 40 (1991) 1586–1597.
- [16] Y.-S. Lee, N. Li, S. Shin, H.-S. Jun, Role of nitric oxide in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice, *J. Virol.* 83 (2009) 8004–8011, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00205-09>.
- [17] K.R. Feingold, C. Grunfeld, Introduction to Lipids and Lipoproteins, in: L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, et al. (Eds.), *Endotext*, MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000.
- [18] X. Zhu, J.S. Owen, M.D. Wilson, H. Li, G.L. Griffiths, M.J. Thomas, et al., Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 3196–3206, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M006486>.
- [19] K. Yin, D. Liao, C. Tang, ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport, *Mol. Med. Camb. Mass* 16 (2010) 438–449, <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2010.00004>.
- [20] M.G. Sorci-Thomas, M.J. Thomas, High density lipoprotein biogenesis, cholesterol efflux, and immune cell function, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 2561–2565, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300135>.
- [21] E.M. Hiltbold, N.J. Poloso, P.A. Roche, MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse, *J. Immunol. Baltim. Md.* 2003 (170) 1950 1329–1338.
- [22] N.J. Poloso, P.A. Roche, Association of MHC class II-peptide complexes with plasma membrane lipid microdomains, *Curr. Opin. Immunol.* 16 (2004) 103–107.
- [23] L. Gruaz, C. Delucinge-Vivier, P. Descombes, J.-M. Dayer, D. Burger, Blockade of T cell contact-activation of human monocytes by high-density lipoproteins reveals a new pattern of cytokine and inflammatory genes, *PLoS ONE* 5 (2010) e9418, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009418>.
- [24] S. Parra, A. Castro, L. Masana, The pleiotropic role of HDL in autoimmune diseases, *Clínica E Investig. En Arterioscler Publ. Soc. Esp. Arterioscler.* 27 (2015) 97–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2014.09.002>.
- [25] A.J. Murphy, J.P.F. Chin-Dusting, D. Sviridov, K.J. Woollard, The anti-inflammatory effects of high density lipoproteins, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 667–675.
- [26] A.L. Catapano, A. Pirillo, F. Bonacina, G.D. Norata, HDL in innate and adaptive immunity, *Cardiovasc. Res.* 103 (2014) 372–383, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvu150>.
- [27] D. De Nardo, L.I. Labzin, H. Kono, R. Seki, S.V. Schmidt, M. Beyer, et al., High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3, *Nat. Immunol.* 15 (2014) 152–160, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2784>.
- [28] I. Tiniakou, E. Drakos, V. Sinatkas, M. Van Eck, V.I. Zannis, D. Boumpas, et al., High-density lipoprotein attenuates Th1 and th17 autoimmune responses by modulating dendritic cell maturation and function, *J. Immunol. Baltim. Md.* 2015 (194) (1950) 4676–4687, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1402870>.
- [29] A.H. Hasty, M.R. Plummer, K.H. Weisgraber, M.F. Linton, S. Fazio, L.L. Swift, The recycling of apolipoprotein E in macrophages: influence of HDL and apolipoprotein A-I, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 1433–1439, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M400418-JLR200>.
- [30] P.A.C. McPherson, I.S. Young, B. McKibben, J. McEneny, High density lipoprotein subfractions: isolation, composition, and their duplicitous role in oxidation, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 86–95, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M600094-JLR200>.

- [31] D. Liu, L. Ji, D. Zhang, X. Tong, B. Pan, P. Liu, et al., Nonenzymatic glycation of high-density lipoprotein impairs its anti-inflammatory effects in innate immunity, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 28 (2012) 186–195, <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.1297>.
- [32] D. Liu, L. Ji, X. Tong, B. Pan, J.-Y. Han, Y. Huang, et al., Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301 (2011) C739–748, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00055.2011>.
- [33] C. Schebesch, V. Kodelja, C. Müller, N. Hakij, S. Bisson, C.E. Orfanos, et al., Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro, *Immunology* 92 (1997) 478–486.
- [34] C.E. Arnold, P. Gordon, R.N. Barker, H.M. Wilson, The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses, *Immunobiology* 220 (2015) 10–19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.09.022>.
- [35] M. Sanson, E. Distel, E.A. Fisher, HDL induces the expression of the M2 macrophage markers arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-dependent process, *PLoS ONE* 8 (2013) e74676, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074676>.
- [36] L. Perrin-Cocon, O. Diaz, M. Carreras, S. Dollet, A. Guirionnet-Paquet, P. André, et al., High-density lipoprotein phospholipids interfere with dendritic cell Th1 functional maturation, *Immunobiology* 217 (2012) 91–99, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.030>.
- [37] W. Nouari, L. Ysmail-Dahlouk, M. Aribi, Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. Immunopharmacol.* 30 (2016) 94–101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>.
- [38] K.E. Iles, D.A. Dickinson, N. Watanabe, T. Iwamoto, H.J. Forman, AP-1 activation through endogenous H₂O₂ generation by alveolar macrophages, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 1304–1313.
- [39] M. Aribi, W. Meziane, S. Habi, Y. Boulatika, H. Marchandin, J.-L. Aymeric, Macrophage bactericidal activities against *Staphylococcus aureus* are enhanced in vivo by selenium supplementation in a dose-dependent manner, *PLoS ONE* 10 (2015) e0135515, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>.
- [40] E. Pick, Y. Keisari, A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J. Immunol. Methods* 38 (1980) 161–170.
- [41] P.G. Duane, J.B. Rubins, H.R. Weisel, E.N. Janoff, Identification of hydrogen peroxide as a streptococcus pneumoniae toxin for rat alveolar epithelial cells, *Infect. Immun.* 61 (1993) 4392–4397.
- [42] C.D. Pericone, K. Overweg, P.W. Hermans, J.N. Weiser, Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract, *Infect. Immun.* 68 (2000) 3990–3997.
- [43] H.J. Gitelman, An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens, *Anal. Biochem.* 18 (1967) 521–531, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90110-8](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(67)90110-8).
- [44] J.P. Rasigade, A. Moulay, Y. Lhoste, A. Tristan, M. Bes, F. Vandenesch, et al., Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*, *BMC Microbiol.* 11 (2011) 263, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-263>.
- [45] T.A. Wynn, L. Barron, R.W. Thompson, S.K. Madala, M.S. Wilson, A.W. Cheever, et al., Quantitative assessment of macrophage functions in repair and fibrosis, *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan Al. (2011), <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im1422s93> (Chapter 14:Unit14.22).
- [46] I.M. Corraliza, M.L. Campo, G. Soler, M. Modolell, Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod, *J. Immunol. Methods* 174 (1994) 231–235.
- [47] J.W. Geyer, D. Dabich, Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates, *Anal. Biochem.* 39 (1971) 412–417.
- [48] X. Zhang, J. Zhang, R. Zhang, Y. Guo, C. Wu, X. Mao, et al., Structural, enzymatic and biochemical studies on helicobacter pylori arginase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 995–1002, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.008>.
- [49] D.G. Altman, *Practical Statistics for Medical Research*, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Fla, 1999.
- [50] E. Whitley, J. Ball, *Statistics review 6: nonparametric methods*, *Crit. Care Lond. Engl.* 6 (2002) 509–513.
- [51] T. Kameda, R. Ohkawa, K. Yano, Y. Usami, A. Miyazaki, K. Matsuda, et al., Effects of myeloperoxidase-induced oxidation on antiatherogenic functions of high-density lipoprotein, *J. Lipids*. 2015 (2015) 592594, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/592594>.
- [52] C. Mineo, H. Deguchi, J.H. Griffin, P.W. Shaul, Endothelial and antithrombotic actions of HDL, *Circ. Res.* 98 (2006) 1352–1364, <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000225982.01988.93>.
- [53] A. Negre-Salvayre, N. Dussset, G. Ferretti, T. Bacchetti, G. Curatola, R. Salvayre, Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 1031–1040, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.006>.
- [54] A. Larbi, C. Fortin, G. Dupuis, H. Berrougui, A. Khalil, T. Fulop, Immunomodulatory role of high-density lipoproteins: impact on immunosenescence, *Age Dordr. Neth.* 36 (2014) 9712, <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-014-9712-6>.
- [55] J.E. Feig, J.X. Rong, R. Shamir, M. Sanson, Y. Vengrenyuk, J. Liu, et al., HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 7166–7171, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1016086108>.
- [56] S.-H. Wang, S.-G. Yuan, D.-Q. Peng, S.-P. Zhao, HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells, *Atheroscler.* 225 (2012) 105–114, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.029>.
- [57] B.N. Martin, C. Wang, C. Zhang, Z. Kang, M.F. Gulen, J.A. Zepp, et al., T cell-intrinsic ASC critically promotes T(H)17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis, *Nat. Immunol.* 17 (2016) 583–592, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3389>.
- [58] J.M. Curtisinger, M.F. Mescher, Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation, *Curr. Opin. Immunol.* 22 (2010) 333–340, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.013>.
- [59] M.M. Alvarez, J.C. Liu, G. Trujillo-de Santiago, B.-H. Cha, A. Vishwakarma, A.M. Ghaemmaghami, et al., Delivery strategies to control inflammatory response: modulating M1–M2 polarization in tissue engineering applications, *J. Control Release Off. J. Control Release Soc.* 240 (2016) 349–363, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.026>.
- [60] Ł. Bułdak, G. Machnik, R.J. Bułdak, K. Łabuzek, A. Bójdys, D. Belowski, et al., Exenatide (a GLP-1 agonist) expresses anti-inflammatory properties in cultured human monocytes/macrophages in a protein kinase A and B/Akt manner, *Pharmacol. Rep. PR* 68 (2016) 329–337, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2015.10.008>.
- [61] R. Carpintero, L. Gruaz, K.J. Brandt, A. Scanu, D. Faille, V. Combes, et al., HDL interfere with the binding of T cell microparticles to human monocytes to inhibit pro-inflammatory cytokine production, *PLoS ONE* 5 (2010) e11869, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011869>.
- [62] N. Hyka, J.M. Dayer, C. Modoux, T. Kohno, C.K. Edwards, P. Roux-Lombard, et al., Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes, *Blood* 97 (2001) 2381–2389.
- [63] E.S. Hwang, J.-H. Hong, L.H. Glimcher, IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1289–1300, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051044>.
- [64] S.A. Long, J.H. Buckner, C.J. Greenbaum, IL-2 therapy in type 1 diabetes: “Trials” and tribulations, *Clin. Immunol. Orlando, Fla* 149 (2013) 324–331, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2013.02.005>.
- [65] L.M. Francisco, P.T. Sage, A.H. Sharpe, The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity, *Immunol. Rev.* 236 (2010) 219–242, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>.
- [66] R. Sharma, S.M. Fu, S.-T. Ju, IL-2: a two-faced master regulator of autoimmunity, *J. Autoimmun.* 36 (2011) 91–97, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2011.01.001>.
- [67] K. Asadullah, W. Sterry, H.D. Volk, Interleukin-10 therapy—review of a new approach, *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 241–269, <http://dx.doi.org/10.1124/pr.55.2.4>.
- [68] Y. Yao, J. Vent-Schmidt, M.D. McGeough, M. Wong, H.M. Hoffman, T.S. Steiner, et al., Tr1 Cells, but Not Foxp3+ regulatory T cells, suppress NLRP3 inflammasome activation via an IL-10-dependent mechanism, *J. Immunol. Baltim. Md.* 2015 (195) (1950) 488–497, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1403225>.
- [69] S. Oishi, R. Takano, S. Tamura, S. Tani, M. Iwazumi, Y. Hamaya, et al., M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation, *Immunology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12647>.
- [70] K. Nakamura, I. Ito, M. Kobayashi, D.N. Herndon, F. Suzuki, Orosomucoid 1 drives opportunistic infections through the polarization of monocytes to the M2b phenotype, *Cytokine* 73 (2015) 8–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.017>.
- [71] C.M.W. van Stijn, J. Kim, A.J. Lusis, G.D. Barish, R.K. Tangirala, Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29 (2015) 636–649, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.14-253831>.
- [72] M. Saraiva, A. O’Garra, The regulation of IL-10 production by immune cells, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 170–181, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2711>.
- [73] S.K. Mittal, K.-J. Cho, S. Ishido, P.A. Roche, Interleukin 10 (IL-10)-mediated immunosuppression: MARCH-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 27158–27167, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.682708>.
- [74] M.-C. Li, S.-H. He, IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 620–625.
- [75] J.C. Cykter, J. Turner, Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens, *Infect. Immun.* 79 (2011) 2964–2973, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00047-11>.
- [76] S. Wang, X. Gao, G. Shen, W. Wang, J. Li, J. Zhao, et al., Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24249, <http://dx.doi.org/10.1038/srep24249>.
- [77] C.A. Akdis, K. Blaser, IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 13 (1999) 603–609.

- [78] R. Sabat, G. Grütz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, et al., Biology of interleukin-10, *Cytokine Growth Factor Rev.* 21 (2010) 331–344, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>.
- [79] L. Ysmail-Dahlouk, W. Nouari, M. Aribi, 1,25-dihydroxyvitamin D3 downmodulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes, *Immunol. Lett.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.002>.
- [80] M. Cetkovic-Cvrilje, M. Olson, B. Schindler, H.K. Gong, Exposure to DDT metabolite p, p'-DDE increases autoimmune type 1 diabetes incidence in NOD mouse model, *J. Immunotoxicol.* 13 (2016) 108–118, <http://dx.doi.org/10.3109/1547691X.2015.1017060>.
- [81] N. Kikodze, I. Pantsulaia, K. Rekhviashvili, M. Iobadze, N. Dzhakhutashvili, N. Pantsulaia, et al., Cytokines and T regulatory cells in the pathogenesis of type 1 diabetes, *Georgian Med. News* (2013) 29–35.
- [82] L.E. Smythies, C.R. White, A. Maheshwari, M.N. Palgunachari, G.M. Anantharamaiah, M. Chaddha, et al., Apolipoprotein A-I mimetic 4F alters the function of human monocyte-derived macrophages, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 (2010) C1538–1548, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00467.2009>.
- [83] A. Clow, F. Hucklebridge (Eds.), *Neurobiology of the Immune System*, Acad. Press, Amsterdam, 2002.
- [84] C. Sia, Imbalance in Th cell polarization and its relevance in type 1 diabetes mellitus, *Rev. Diabet. Stud. RDS* 2 (2005) 182–186, <http://dx.doi.org/10.1900/RDS.2005.2.182>.
- [85] M. Bao, Y. Yang, H.-S. Jun, J.-W. Yoon, Molecular mechanisms for gender differences in susceptibility to T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice, *J. Immunol. Baltim. Md.* 2002 (168) (1950) 5369–5375.
- [86] K. Singh, E. Kadesjö, J. Lindroos, M. Hjort, M. Lundberg, D. Espes, et al., Interleukin-35 administration counteracts established murine type 1 diabetes—possible involvement of regulatory T cells, *Sci. Rep.* 5 (2015) 12633, <http://dx.doi.org/10.1038/srep12633>.
- [87] M.H. Mahmoud, G. Badr, B.M. Badr, A.U. Kassem, M.S. Mohamed, Elevated IFN- α / β levels in a streptozotocin-induced type 1 diabetic mouse model promote oxidative stress and mediate depletion of spleen-homing CD8 + T cells by apoptosis through impaired CCL21/CCR7 axis and IL-7/CD127 signaling, *Cell. Signal.* 27 (2015) 2110–2119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.07.005>.
- [88] J.A. Bluestone, K. Herold, G. Eisenbarth, Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes, *Nature* 464 (2010) 1293–1300.
- [89] C. Mineo, P.W. Shaul, Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol, *Circ. Res.* 111 (2012) 1079–1090, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258673>.
- [90] A. Al-Jarallah, X. Chen, L. González, B.L. Trigatti, High density lipoprotein stimulated migration of macrophages depends on the scavenger receptor class B, type I, PDZK1 and Akt1 and is blocked by sphingosine 1 phosphate receptor antagonists, *PLoS ONE* 9 (2014) e106487, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106487>.
- [91] P. Gardner, Calcium and T lymphocyte activation, *Cell* 59 (1989) 15–20.
- [92] B.B. Au-Yeung, J. Zikherman, J.L. Mueller, J.F. Ashouri, M. Matloubian, D.A. Cheng, et al., A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014) E3679–3688, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1413726111>.
- [93] S. Beceiro, J.N. Radin, R. Chatuvedi, M.B. Piazuelo, D.J. Horvarth, H. Cortado, et al., TRPM2 ion channels regulate macrophage polarization and gastric inflammation during helicobacter pylori infection, *Mucosal Immunol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2016.60>.
- [94] C.R. Hoyal, A.P. Thomas, H.J. Forman, Hydroperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 29205–29210.
- [95] K.M. Fracchia, C.Y. Pai, C.M. Walsh, Modulation of T cell metabolism and function through calcium signaling, *Front. Immunol.* 4 (2013) 324, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00324>.
- [96] K. Haskins, B. Bradley, K. Powers, V. Fadok, S. Flores, X. Ling, et al., Oxidative stress in type 1 diabetes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1005 (2003) 43–54.
- [97] H.J. Forman, M. Torres, Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) S4–8, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.2206007>.
- [98] T. Serez, R.G. Knickelbein, J.B. Warshaw, R.B. Johnston, The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione, *J. Immunol. Baltim. Md.* 2000 (165) (1950) 3333–3340.
- [99] N. Tanaka, S. Abe-Dohmae, N. Iwamoto, M.L. Fitzgerald, S. Yokoyama, Helical apolipoproteins of high-density lipoprotein enhance phagocytosis by stabilizing ATP-binding cassette transporter A7, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 2591–2599, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M006049>.
- [100] S. Kopprasch, J. Pietzsch, J. Graessler, The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL, *Mol. Cell. Biochem.* 258 (2004) 121–127.
- [101] C. Najac, M.M. Chaumeil, G. Kohanbash, C. Guglielmetti, J.W. Gordon, H. Okada, et al., Detection of inflammatory cell function using ¹³C magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized [6-(¹³C)]-arginine, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31397, <http://dx.doi.org/10.1038/srep31397>.
- [102] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E.I. Closs, M. Munder, Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages, *Front. Immunol.* 5 (2014) 532, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>.
- [103] M.A. Russell, N.G. Morgan, The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic β -cell, *Islets* 6 (2014) e950547, <http://dx.doi.org/10.4161/19382014.2014.950547>.



Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*



Wafa Nouari, Lamia Ysmail-Dahlouk, Mourad Aribi*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2015

Received in revised form 7 November 2015

Accepted 25 November 2015

Available online xxxx

Keywords:

1,25(OH)₂D₃

Monocyte-derived macrophages

Pseudomonas aeruginosa

ABSTRACT

Background: The bioactive form of vitamin D₃, i.e. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) vitamin D has been shown to modulate monocytes/macrophages physiology and their response against bacterial infections. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is an opportunistic bacterial pathogen that can most frequently be fatal in immunocompromised infected people.

Methods: We investigated the *ex vivo* effect of 1,25(OH)₂D₃ on monocyte-derived macrophages function against *P. aeruginosa* infection.

Results: Relative vitamin D receptor (VDR) mRNA expression was significantly increased in infected and 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages compared to controls ($p < 0.01$). Treatment with 1,25(OH)₂D₃ markedly resulted in up-regulation of nitric oxide (NO) and IL-1 β production and down-regulation of IL-10 levels (respectively, $p = 0.029$, $p = 0.048$ and $p = 0.008$). Additionally, 1,25(OH)₂D₃ significantly increased M1/M2 macrophage ratio ($p < 0.05$) and slightly reduced intracellular bacterial development. Furthermore, the arginase activity, *P. aeruginosa* phagocytosis and killing were significantly increased in cells that were both infected and 1,25(OH)₂D₃-treated compared to the infected, but not 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages (respectively, $p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$).

Conclusions: We show in this study that bioactive form of vitamin D [1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25D₃)] can enhance M1 macrophage polarization and their bactericidal protective activity against *P. aeruginosa*. Future works would involve improving the treatment response through dose-dependent effect studies, both in *ex vivo* and *in vivo* models.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

P. aeruginosa is a pathogenic and opportunistic Gram-negative bacterium responsible for a range of acute and chronic diseases [1,2]. *P. aeruginosa* is well known for its ability to rapidly adapt to varying environmental conditions, but also for its resistance to innate antimicrobial immune defense [3,4]. *P. aeruginosa* can exhibit a battery of virulence factors, including lipopolysaccharide (LPS) that mediate both bacterial pathogenesis and host responses [5].

Vitamin D or calcitriol is a steroid hormone, which is obtained via diet or synthesized from 7-dihydrocholesterol in the skin upon ultraviolet rays exposure. B cells, T cells and antigen-presenting cells (APCs) are able to synthesize bioactive vitamin D metabolites by two subsequent hydroxylation steps [6,7]: 1) Vitamin D₃ is converted by hepatic 25-hydroxylase into biologically inactive circulating metabolite 25 OH vitamin D₃ (25(OH)D₃). 2) The inactive form of vitamin D, vitamin D₂ (C₂₈H₄₄O) or ergosterol is metabolized in the kidney to the active

form 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) by 1- α -hydroxylase encoded by the gene CYP27B1 [8], which is also expressed by extrarenal tissues (including those of the immune system) [9]. 1,25(OH)₂D₃ binds to the vitamin D receptor (VDR) in the nucleus of target cells. The VDR forms a complex with the retinoid X receptor (RXR) and modulates multiple gene expression by binding to the vitamin D response element (VDRE) [10].

In addition to its classical function in homeostasis and bone metabolism, vitamin D can modulate the innate and adaptive immune responses [7]. It has been shown that 1,25(OH)₂D₃ decreases the risk of *Mycobacterium tuberculosis* infections and boosts the innate immune response through various mechanisms including antimicrobial peptides production and cytokines response [11–13].

Furthermore, *in vitro* studies have demonstrated that 1,25(OH)₂D₃ can reduce the production of pro-inflammatory cytokines/chemokines, such as IL-6 and CXCL8 after infection by *P. aeruginosa* [14]. Moreover, vitamin D supplementation decreases reactive oxygen species (ROS) levels in monocytes [15] and modulates the phagocytic ability of macrophages [11], as well as increases expression and secretion of antimicrobial peptides against *P. aeruginosa* [16].

Macrophages are heterogeneous cells of innate immunity that, depending to the microenvironment signals, can be divided into two

* Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, Imama-Mansourah, Rocade # 2, Department of Biology, University of Tlemcen, PO Box: 262, Imama-Mansourah, Tlemcen 13000, Algeria.

E-mail addresses: m_aribi@mail.univ-tlemcen.dz, m_aribi@yahoo.fr (M. Aribi).

major subpopulations, classically activated macrophages (M1) and alternatively activated macrophages (M2) [17]. The polarized macrophages toward the M1 and M2 phenotypes play an important role for host's defense during bacterial infection. M1 macrophages induce secretion of pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL) 1 β , tumor necrosis factor alpha, (TNF α), IL-12, and IL-18 and increase bactericidal properties [18,19], while M2 macrophages produce anti-inflammatory mediators, like IL-10, which participate in the resolution of inflammation [20,21].

In the current study, we investigated the impact of the bioactive from of vitamin D3 on M1/M2 ratio and bactericidal activities of human monocyte-derived macrophages (MDMs) against *P. aeruginosa* infection.

2. Materials and methods

2.1. Ethical statement

This study was approved by the local ethics committee of Tlemcen University. Volunteer's healthy donors provided their written informed consent in accordance with the Helsinki Declaration.

2.2. Study design

Experiments were performed on MDMs, whole cell lysates, and total RNA. Firstly, macrophages were generated from monocytes enriched from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by negative selection. VDR mRNA expression was examined on total RNA isolated from infected or not infected MDMs with *P. aeruginosa*. The effect of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ on the levels of macrophage nitric oxide (NO) production, hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$), IL-1 β , IL-10, M1/M2 macrophage ratio, bacterial growth, phagocytosis and bacterial killing were carried out on a mixture of MDMs and *P. aeruginosa*. The oxidative burst assay was performed using the NO production and H $_2$ O $_2$ assays. MDM lysates were used to measure the effect of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ on the macrophage arginase activity. Each experiment was repeated at least four times (Fig. 1).

2.3. Bacterial strains

Assays were performed using the referent strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853 provided from the American Type Culture Collection (Manassas, Va). Bacteria were grown over night at 37 °C in tryptic soy broth

(TSB) (Fluka Analytical, Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). Number of bacteria was determined spectrophotometrically at 600 nm [3].

2.4. Cells preparation

Venous blood samples was collected from healthy volunteers into heparinated *vacutainer* tubes (BD, Belliver Industrial Estate, UK) and PBMCs were isolated using gradient density centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). Monocytes were enriched from PBMCs by negative selection using the EasySep Human Monocyte Enrichment Kit (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada), according to the manufacturer's instructions. Briefly, PBMCs (7×10^7) were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) with 1 mM ethylenediamineteraacetic acid (EDTA) and 2% fetal bovine serum (FBS) and were incubated with enrichment antibody cocktail (50 μ L per mL) at 2–8 °C for 10 min. Magnetic Particles (50 μ L per mL) were added for an additional 5 min. Finally, monocytes were collected from the negative fraction by washing (400 \times g for 10 min), and cells viability was evaluated by Trypan bleu counting as described [22].

2.5. Ex vivo generation of monocyte-derived macrophages and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ treatment

To generate MDMs, monocytes were seeded in RPMI 1640 media (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 μ g/mL gentamycin and 10% autologous serum at a concentration of 5×10^5 cells/mL in 24-well culture plate at 37 °C and 5% CO $_2$ for 48 h. After incubation, the MDMs were infected with *P. aeruginosa* at a MOI (multiplicity of infection) of 30, i.e. 30 bacteria for one macrophage. After incubation for 3 h at 37 °C, cells were washed three times with PBS to remove uningested bacteria. Thereafter, the MDMs were cultured at 37 °C and 5% CO $_2$ for 24 h in RPMI 1640 medium with 10% autologous serum, in both presence and absence of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), at a dose of 10^{-7} M [12]. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ was dissolved in 95% ethanol. The final concentration of ethanol did not exceed 0.5% (v/v) in the culture medium.

2.6. Vitamin D receptor mRNA expression

Total RNA was isolated from 1,25(OH) $_2$ D $_3$ treated and untreated *P. aeruginosa*-infected or not infected MDMs using Trisol reagent (life

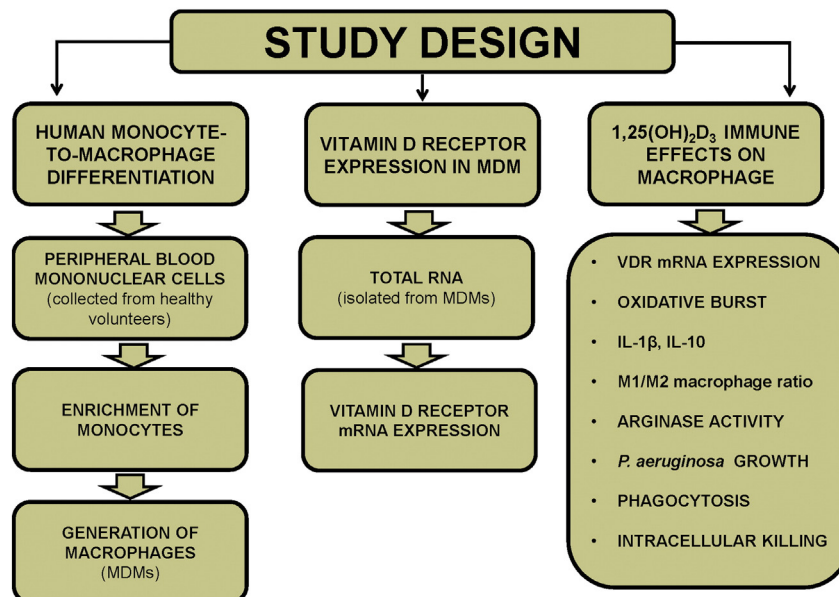


Fig. 1. Study flow-chart. MDM: monocyte-derived macrophages, VDR: vitamin D receptor, IL: interleukin, M1: classically activated macrophages, M2: alternatively activated macrophages.

technologies, New Zealand, USA), according to the manufacturer's recommendations. The reverse transcription was carried out using RT Master Mix (5 × first-stand Buffer, dTT, M-MLV, random primers, dNTPs, RNase OUT) prepared by reagents obtained from Invitrogen (Life technologies, USA). The polymerase chain reaction (PCR) was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Singapore) in StepOnePlus Real-Time PCR (RT-PCR) systems (Applied Biosystems). Reactions were expressed as mean ± standard error of mean (SEM) ΔCt values, after normalization using 18S RNA primers. The primers (Invitrogen, Life technologies, USA) employed in this study are: VDR sense 5'-ACCAAGGACAACCGACGCCA-3', anti-sense 5'-GGCAATGATGCGTCTGCT-3' and 18S RNA sense 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3', anti-sense 5'-CCTCCAATGGATCTCGTTA-3'. Such assays were performed in the INSERM UMR 866 (University of Burgundy, France).

2.7. Oxidative burst assay

Oxidative/respiratory burst assay was carried out by measurement of NO production (NOx, nitrite and nitrate) and H₂O₂ levels. NO production levels in cell culture supernatants were measured spectrophotometrically using the sensitive colorimetric Griess method at 540 nm as previously described [23]. The concentration of NO was determined from linear standard curve established by 0–150 μmol/L sodium nitrite. Levels of H₂O₂ in cell lysates were measured by spectrophotometer using a commercial kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), according to instructions of the manufacturers.

2.8. Cytokines assays and M1/M2 ratio

On the basis of the respective M1 and M2 macrophage signature cytokines, the M1/M2 ratio was estimated from the IL-1β/IL-10 ratio. IL-1β and IL-10 levels were measured in the cell culture supernatants using the quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with respective commercial kits, as per the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). Limits of detection were 0.3 pg/mL for IL-1β and 1 pg/mL for IL-10.

2.9. Arginase activity assay

Arginase activity was measured in MDM cell lysates. The assay was performed using a spectrophotometric technique based on the determination of the production of urea as previously described [24]. Briefly, cells were lysed in 500 μL of 0.1% Triton X 100 for 30 min. A mixture of Tris-HCl and MnCl₂ was added and after activation by heating for 10 min, a volume of activated lysates was incubated with the same volume of arginine (0.5 M) (1 h at 37 °C). Four hundred μL of an acidic mixture were added to stop the reaction. Finally, after addition of 9% isonitrosopropiophenone (dissolved in 100% ethanol) followed by heating at 100 °C, the urea was measured at 540 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of urea/min.

2.10. Phagocytosis assay

Phagocytosis assay was studied as described in detail with minor modifications [25,26]. Assays were made at 0 (t₀) and 1 h (t₁) on a mixture of macrophages and *P. aeruginosa* cells at a MOI of 30 or bacterial cells alone as controls. Briefly, 5 × 10⁵ of MDMs were cultured in 24-well culture plates, infected by bacteria and incubated with or without 10⁻⁷ M of 1,25(OH)₂D₃ for 1 h at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, supernatants were taken and serial dilutions were prepared in order to determine the number of viable extracellular bacteria by counting bacterial colony forming units (CFUs) on Cetrinide agar. The results were determined using the percentage decrease in the number of extracellular bacteria [27] as follows:

$$\% \text{Phagocytosis} = M_{t_0} - 100 \times \frac{\left(\frac{NEC}{M_{t_0}}\right)}{\left(\frac{NC_1}{NC_0}\right)} \quad [28,29],$$

in which M_{t₀} is the number of bacteria in the mixture assay sample at t₀, NEC is the number of extracellular bacteria in the mixture assay sample at t₁, NC₀ and NC₁ correspond to control sample at t₀ and t₁, respectively.

2.11. Bacterial killing assay

To kill extracellular bacteria, *P. aeruginosa*-infected phagocytic cells were washed 3 times with 1 × PBS and cultured in media supplemented with 100 μg/mL gentamicin. After incubation for 1 h and washing, 1% Triton X-100 in PBS was added in some wells to lyse macrophage cells and determine the number of intracellular bacteria at time 0 (t₀). Others were incubated for 1 h (t₁) [30] in antibiotic-free medium. The lysis was stopped at the indicating times by addition of TSB. Intracellular and extracellular bacteria were counted after plating serial dilutions on Cetrinide agar and incubated overnight at 37 °C. The next day, CFUs count was related to the original bacterial suspension. Controls including wells of uninfected macrophages or inoculated with bacteria only were required for all assays. Two conditions were taken into consideration: (i) total absence of bacterial colonies in uninfected macrophage lysates, (ii) death of all bacteria incubated alone for one hour with gentamycin (<10 CFUs left). Trypan blue counting test was performed to check the viability of macrophages after infection [25,26]. The percentage of intracellular bacterial killing was calculated as follows: %bacterial killing = 100 × (N_{t₀} - N_{t₁}) / N_{t₀} [27–29], in which N_{t₀} and N_{t₁} correspond to the number of viable intracellular bacteria at t₀ and t₁, respectively.

2.12. Statistical analysis

All experiments were repeated at least four times and the data are presented as mean ± SEM. Differences in mean values between groups were performed by Kruskal–Wallis test for comparison of four groups or Mann–Whitney U test for comparison of two groups. Statistical analyses were performed with SPSS software version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

In the present study, we examined the *ex vivo* effect of vitamin D on the modulation of macrophage activation against *P. aeruginosa*. Human MDMs were stimulated with live *P. aeruginosa* for 3 h, followed by treatment with the active vitamin D [1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25D₃)] for 24 h at a concentration of 10⁻⁷ M.

3.1. VDR mRNA expression

Knowing that the presence of VDR is necessary for 1,25(OH)₂D₃ to exert its effects on gene expression [31], we first performed a Real-Time quantitative PCR to confirm whether or not *P. aeruginosa* would have no adverse effect on the expression of VDR in macrophage. Thus, relative quantification of mRNA revealed that *P. aeruginosa* had no substantial effect on the expression of VDR mRNA. Additionally, relative VDR expression was significantly increased in infected and 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages compared to the infected and non-treated cells (*p* = 0.008 by Mann–Whitney U test. For all comparisons, *p* < 0.01 by Kruskal–Wallis test) (Fig. 2).

3.2. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on macrophage oxidative burst

The NO production and H₂O₂ were evaluated as macrophage oxidative burst biomarkers. The NO production was measured in culture supernatants by the sensitive Griess reaction. The H₂O₂ levels were measured spectrophotometrically in the macrophage cell lysates.

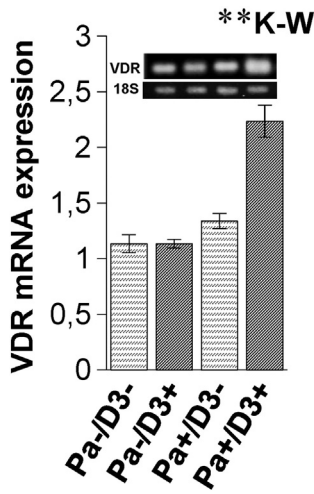


Fig. 2. Relative expression of vitamin D receptor mRNA in macrophages cultures. A real-time PCR was performed to check whether *P. aeruginosa* would have no adverse effect on the expression of VDR in macrophage. To this end, total RNA was isolated from macrophages, infected or not by *P. aeruginosa*, and treated or not with 1,25(OH)₂D₃, using Trisol reagent. The reverse transcription was carried out using RT Master Mix. Reactions were expressed as mean ± SEM ΔCt values, after normalization using 18S RNA primers. PCR: polymerase chain reaction, SEM: standard error of mean, VDR: vitamin D receptor, K-W: Kruskal–Wallis test, Pa–/D3–: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* and not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa–/D3+: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* but treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa+/D3–: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* but not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa+/D3+: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* and treated with 1,25(OH)₂D₃. ***p* < 0.01 by Kruskal–Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are defined as follows: Pa–/D3– vs. Pa+/D3+ or Pa–/D3+ vs. Pa+/D3+ or Pa+/D3– vs. Pa+/D3+, *p* < 0.01 by Mann–Whitney U test.

As shown in Fig. 3, 1,25(OH)₂D₃ significantly increased NO production concentration in treated *P. aeruginosa*-infected macrophages compared to the untreated and infected condition (*p* < 0.05 by Mann–Whitney U test). The treated and uninfected macrophage cells showed also increased NO production when compared to the untreated and uninfected macrophage cells, but the difference did not reach statistical significance level (*p* > 0.05 by Mann–Whitney U test). Additionally, the H₂O₂ levels were significantly increased in uninfected and 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages compared to the uninfected and untreated cells (*p* = 0.011 by Mann–Whitney U test). Whereas, the H₂O₂ levels were not different between the two groups of *P. aeruginosa*-infected macrophages. The Kruskal–Wallis test gave *p*-value = 0.001 for NO production and *p*-value = 0.008 for H₂O₂.

3.3. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on macrophage IL-1β and IL-10 production and M1/M2 ratio

We observe in Fig. 4 that in the absence of *P. aeruginosa*, the active vitamin D induced a significant increase in IL-10 levels and a significant decrease in those of IL-1β (respectively, *p* = 0.002 and *p* = 0.020 by Mann–Whitney U test). Similarly, the presence of *P. aeruginosa* without active vitamin D leads to a highly significant increase in IL-10 levels compared to uninfected macrophages, supplemented or not with active vitamin D (For the two comparisons, *p* = 0.000 by Mann–Whitney U test). Conversely, the active vitamin D induced a highly significant decrease of IL-10 levels and a significant increase of IL-1β levels in infected macrophages compared to infected but not 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages (respectively, *p* = 0.006 and *p* = 0.048 by Mann–Whitney U test). For the two cytokines using Kruskal–Wallis test, *p*-value was 0.006 for IL-1β and *p*-value was 0.000 for IL-10.

As shown in Fig. 5, M1/M2 ratio was significantly decreased in uninfected and 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages when compared with uninfected and not 1,25(OH)₂D₃-treated cells (*p* = 0.000 by Mann–Whitney U test). Additionally, *P. aeruginosa* in the absence of 1,25(OH)

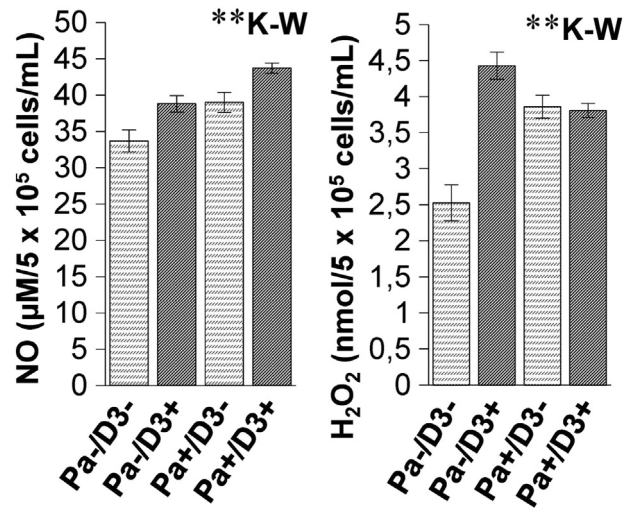


Fig. 3. Effect of 1 alpha,25(OH)₂D₃ on macrophage respiratory burst activation against *Pseudomonas aeruginosa*. The assay was quarried out by means of spectrophotometric determination of NO production and H₂O₂ levels. H₂O₂: hydrogen peroxide, NO: nitric oxide [NOx, nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻)], K-W: Kruskal–Wallis test, Pa–/D3–: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* and not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa–/D3+: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* but treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa+/D3–: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* but not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa+/D3+: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* and treated with 1,25(OH)₂D₃. ***p* < 0.01 by Kruskal–Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann–Whitney U test: (i) NO; Pa–/D3– vs. Pa+/D3+, *p* < 0.05, Pa–/D3+ vs. Pa+/D3+, *p* < 0.01, Pa+/D3– vs. Pa+/D3+, *p* < 0.05, (ii) H₂O₂; Pa–/D3– vs. Pa–/D3+ or Pa–/D3– vs. Pa+/D3– or Pa–/D3– vs. Pa+/D3+, *p* < 0.05.

2D₃ decrease the M1/M2 ratio. Inversely, treatment of *P. aeruginosa*-infected macrophages with 1,25(OH)₂D₃ induced an increase in the M1/M2 ratio when compared to *P. aeruginosa*-infected and not treated cells (*p* < 0.05 by Mann–Whitney U test). For all comparisons using Kruskal–Wallis test, *p*-value was 0.000.

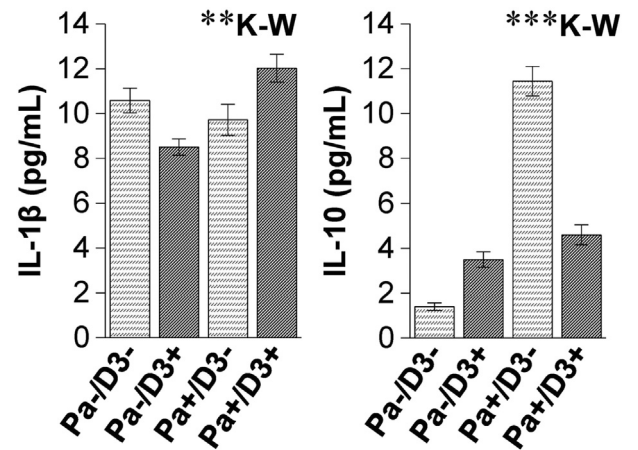


Fig. 4. Effect of 1 alpha,25(OH)₂D₃ on macrophage IL-1β and IL-10 in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. The two macrophage cytokines levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). K-W: Kruskal–Wallis test, Pa–/D3–: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* and not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa–/D3+: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* but treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa+/D3–: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* but not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa+/D3+: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* and treated with 1,25(OH)₂D₃. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 by Kruskal–Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann–Whitney U test: (i) IL-1β; Pa–/D3– vs. Pa–/D3+, *p* < 0.05, Pa–/D3+ vs. Pa+/D3+, *p* < 0.01, Pa+/D3– vs. Pa+/D3+, *p* < 0.05, (ii) IL-10; Pa–/D3– vs. Pa–/D3+, *p* < 0.01, Pa–/D3– vs. Pa+/D3–, *p* < 0.001, Pa–/D3+ vs. Pa+/D3+, *p* < 0.01, Pa–/D3+ vs. Pa+/D3–, *p* < 0.001, Pa–/D3+ vs. Pa+/D3+, *p* < 0.01.

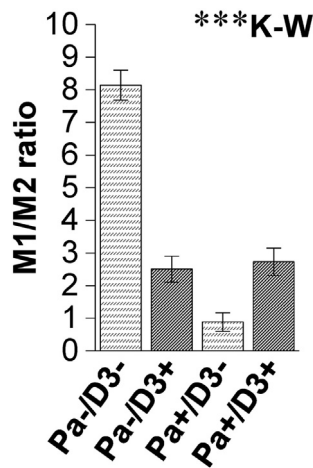


Fig. 5. Effect of 1 alpha,25(OH)₂D₃ on M1/M2 macrophage ratio in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. The M1/M2 ratio was estimated from the interleukin 1 β (IL-1 β)/IL-10 ratio. M1: classically activated macrophages, M2: alternatively activated macrophages, K-W: Kruskal–Wallis test, Pa –/D3 –: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* and not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa –/D3 +: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* but treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa +/D3 –: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* but not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa +/D3 +: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* and treated with 1,25(OH)₂D₃. *** $p < 0.001$ by Kruskal–Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are defined as follows by Mann–Whitney U test: Pa –/D3 – vs. Pa –/D3 +, $p < 0.001$, Pa –/D3 – vs. Pa +/D3 –, $p < 0.001$, Pa –/D3 – vs. Pa +/D3 +, $p < 0.001$, Pa –/D3 + vs. Pa +/D3 –, $p < 0.05$, Pa +/D3 – vs. Pa +/D3 +, $p < 0.05$.

3.4. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on arginase activity

There were no significant difference in arginase activity levels between uninfected and 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages compared to the uninfected but not treated cells; while arginase activity was significantly increased in infected and 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages compared to the infected and not treated cells ($p = 0.000$ by Mann–Whitney U test. For all comparisons, $p = 0.016$ by Kruskal–Wallis test) (Fig. 6). Additionally, we observed that the arginase activity seems to be up-regulated in untreated *P. aeruginosa*-infected macrophages compared to that in uninfected macrophages, treated or not with 1,25(OH)₂D₃, but the difference did not reach statistical significance.

3.5. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on macrophage intracellular growth of *P. aeruginosa*

We see in Fig. 7 that treatment with 1,25(OH)₂D₃ induced a decrease in the intracellular growth of *P. aeruginosa* within macrophages compared to the untreated macrophages. Nevertheless, the difference was not statistically significant ($p = 0.259$ by Mann–Whitney U test).

3.6. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on *Pseudomonas aeruginosa* phagocytosis and killing

Macrophages are considered as the first line of defense against infections and the major phagocytic cells [26]. The number of extracellular bacteria was determined after 1 h of incubation with *P. aeruginosa*. After infection, intracellular live bacteria were counted at two time points after infection, i.e. at 0 (t_0) and 1 h (t_1).

As shown in Fig. 8, both phagocytosis and *P. aeruginosa* killing were significantly increased in 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages than in not 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages (respectively, $p = 0.009$ and $p = 0.000$ by Mann–Whitney U test).

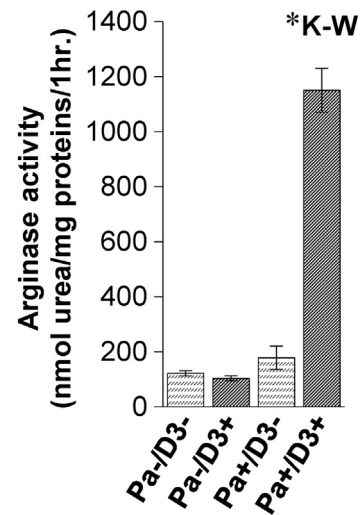


Fig. 6. Effect of 1 alpha, 25(OH)₂D₃ on macrophage arginase activity in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. Arginase activity was measured in macrophage cell lysates using a spectrophotometric technique based on the determination of the production of urea. K-W: Kruskal–Wallis test, Pa –/D3 –: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* and not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa –/D3 +: macrophages not cultured with *P. aeruginosa* but treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa +/D3 –: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* but not treated with 1,25(OH)₂D₃, Pa +/D3 +: macrophages cultured in the presence of *P. aeruginosa* and treated with 1,25(OH)₂D₃. * $p < 0.05$ by Kruskal–Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are defined as follows: Pa –/D3 – vs. Pa +/D3 + or Pa –/D3 + vs. Pa +/D3 + or Pa +/D3 – vs. Pa +/D3 +, $p < 0.001$ by Mann–Whitney U test.

4. Discussion

Formerly known as *Bacillus pyocyaneus*, *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen that could be dangerous and difficult to treat, especially in cystic fibrosis patients. Usually considered as an extracellular organism, but could also invade specific cells during infection course [32]. *P. aeruginosa* has also the ability to evade the host immune response and to persist during chronic infections. Therefore, the strengthening of the innate immune response against this bacterium may then be able to eradicate it in a more efficient manner.

In addition to its crucial role in physiology and in maintaining bone homeostasis, vitamin D can have various beneficial effects on both innate and adaptive immune responses regarding the fight against

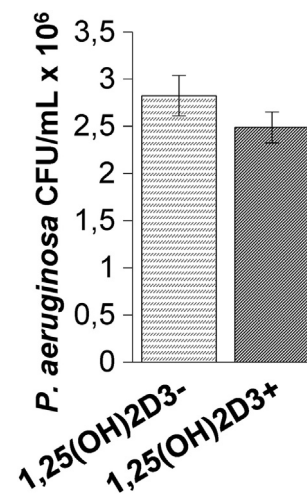


Fig. 7. Effect of 1 alpha, 25(OH)₂D₃ on intracellular *P. aeruginosa* growth within macrophage. The effect of 1,25(OH)₂D₃ on MDMs to control *P. aeruginosa* growth was examined to complete assays on phagocytosis and bacterial killing. No asterisk mark indicates that the difference did not quite achieve significance ($p > 0.05$ by Mann–Whitney U test).

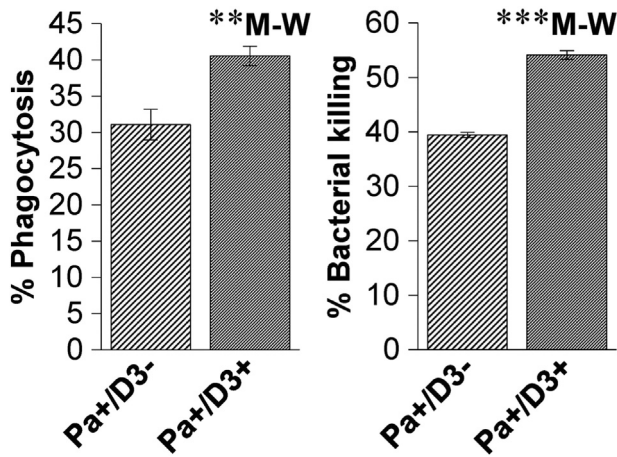


Fig. 8. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on macrophage phagocytosis and killing of *Pseudomonas aeruginosa*. The bactericidal activity of macrophages was assayed using the antibiotic protection method. After infection, intracellular live bacteria were analyzed by the colony forming unit (CFU) method at two time points after infection, i.e. at 0 (t0) and 1 h (t1). M-W: Mann–Whitney U test. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 by Mann–Whitney U test.

bacterial infections. Its antibacterial activity can be maintained only following the final converting step in the kidney of precursor 25-hydroxyvitamin D (25OHD) to active 1,25(OH)₂D₃ [33]. It also can boost innate immunity by modulating expression of potent antimicrobial peptides (AMPs) and cytokine response [34]. Thus, we for our part, highlighted for the first time the *ex vivo* effects of the active form of vitamin D on the stimulation of macrophage against infection with *P. aeruginosa*. In order to properly evaluate its effects, the VDR expression analysis was a prerequisite for subsequent experiments.

M1 macrophages exhibit powerful microbicidal activity as well as proinflammatory cytokines, including IL-1β, which release through activation of the caspase-1/nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat receptor containing pyrin domain 3 (NLRP3) inflammasome [35]. In contrast, M2 macrophages appear to be involved in the resolution of inflammation by upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-10, and tissue repair [36]. They are poorly microbicidal [20] and may promote the production of arginase [37]. In this context, we tested the effect of active vitamin D on M1/M2 ratio in the presence of *P. aeruginosa*.

4.1. VDR mRNA expression

Numerous *in vitro* experiments have largely studied the anti-infective roles of vitamin D on the modulation of host immune responses in different infectious diseases. These roles are exerted through VDR. In this study, expression of VDR mRNA was evaluated in macrophage under different culture conditions using real-time PCR. Our results revealed that *P. aeruginosa*-infected macrophages were with no adverse effect on VDR expression. Additionally, VDR expression was significantly increased in infected and 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages. Therefore, infection with *P. aeruginosa* and vitamin D supplementation may provide a synergistic effect on the VDR expression. Hence, such effect has been recently observed with toll-like receptor agonists, like LPS, which may be present on *P. aeruginosa* [38]. Moreover, our results are consistent with previous data showing that 1,25(OH)₂D₃ can upregulate VDR expression [39]. In the same context, it has recently been demonstrated [40] that 1,25(OH)₂D₃ induces intracellular redistribution and stabilization of the VDR in human CD4+ T cells by protecting it from proteasomal degradation cells.

4.2. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on macrophage oxidative burst

The oxidative burst, an important mechanism of host cells against pathogens, is produced by the NADPH oxidase complex [41].

Through activation of NADPH oxidase, activated macrophages produce various reactive oxygen or nitrogen species, including NO and H₂O₂, all of which have strong cytotoxic activities against microorganisms [42].

To the best of our knowledge, this is the first study that shows NO and H₂O₂ responses to 1,25(OH)₂D₃ in *P. aeruginosa*-infected macrophages. We found that vitamin D increased significantly NO production, but it had no significant effect on H₂O₂ production in the presence of *P. aeruginosa*. Therefore, previous reports suggest that NO can decrease H₂O₂ production by formation of catalase and helps macrophages to survive in environment rich with oxidants [43].

4.3. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on macrophage IL-1β and IL-10 production and M1/M2 ratio

Activated macrophages and monocytes secrete IL-1β, a pro-inflammatory cytokine that exerts multiple biological activities in controlling host immune responses. The precursor molecule of IL-1β (proIL-1β) has to be cleaved to generate the active form of IL-1β [44, 45]. IL-10, a most important anti-inflammatory cytokine, can be produced by B cells, macrophages, dendritic cells, and CD4+ T cells, including forkhead box P3 (FOXP3)+ CD4+ T cells, antigen-induced type 1 regulatory T cells (Tr1), and T helper 1 (Th1) and Th2 cells. This cytokine has regulatory functions in controlling inflammation by inhibition of costimulatory molecules CD80 and CD86 expression on monocytes and macrophages and limiting pro-inflammatory cytokines/chemokines production [46]. Both IL-1β and IL-10 can play an important antimicrobial activities in corneal response to *P. aeruginosa* infection [47,48].

In our study, we observed that in the absence of *P. aeruginosa*, 1,25(OH)₂D₃ decreased levels of IL-1β and M1/M2 ratio but in contrast increased IL-10. Conversely, in the presence of *P. aeruginosa*, vitamin D increased levels of IL-1β and M1/M2 macrophage ratio but decreased IL-10. These results clearly demonstrate the immunomodulatory effect of vitamin D during *P. aeruginosa* infection. Our results corroborate recent data showing that vitamin D enhances IL-1β secretion by human MDMs during infection with *Mycobacterium tuberculosis* [49,50]. However, previous data reported that 1,25(OH)₂D₃ down-regulates the levels of pro-inflammatory cytokines including IL-1β in a dose-dependent manner in human corneal epithelial cells colonized with *P. aeruginosa* [51]. These contradictory results may in part reflect the differences in the dose of vitamin D3 and cell types used. Knowing that no study has been undertaken in the same context of our work, the comparison with other data is not yet possible. So discussion of our observations will require further investigations.

4.4. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on arginase activity

NO can be synthesised directly by the enzymatic conversion of L-arginine by type II inducible NO synthase (iNOS). iNOS and arginase are coinduced in activated macrophages. They compete for their common substrate, L-arginine. The enzymatic action of arginase on L-arginine results in the generation of L-ornithine and urea. Hence increased levels of arginase activity might limit the amount of arginine for NO synthesis [52].

It has been reported that the predominance of M2 macrophage phenotype can promote the production of arginase [37]. In our study, despite the predominance of M1 phenotype in *P. aeruginosa*-infected and 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages compared with *P. aeruginosa*-infected and not 1,25(OH)₂D₃-treated macrophages, we observed a significant increase in arginase activity. Conversely, in the absence of *P. aeruginosa*, 1,25(OH)₂D₃ has no significant effect on the activity of arginase. Therefore, vitamin D may predispose to an overproduction of arginase activity in infection caused by *P. aeruginosa*. Nevertheless, these data are still relatively uncommon and their importance should be checked as early as possible with dose-dependent effect studies. Finally,

our results support previous works suggesting that arginase expression and activity are increased in *P. aeruginosa* lung infection [53,54].

4.5. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on macrophage intracellular growth of *P. aeruginosa*

In order to identify its antibacterial properties, the active vitamin D3 form was screened for its ability to inhibit bacterial growth. Our results show that 1,25(OH)₂D₃ may somehow have an effect on macrophages to control *P. aeruginosa* growth. Accordingly, it has recently been demonstrated that 1,25(OH)₂D₃ significantly reduced *Mycobacterium tuberculosis* growth in human MDMs from patients with current tuberculosis ($p < 0.05$) [50]. Additionally, other results show that co-treatment of the human bronchial epithelial cell line (VA10) with vitamin D3 and phenylbutyrate may inhibit growth of *P. aeruginosa* [55]. Our preliminary findings should pay close attention to this issue, but may need to be detailed by additional *ex vivo* and *in vivo* immunopharmacological studies. To this end, various concentrations of 1,25(OH)₂D₃ should be used to identify the optimum useful dose required for the maximum level of *P. aeruginosa* growth control in macrophage cells without any obvious adverse effect.

4.6. *Pseudomonas aeruginosa* phagocytosis and killing

In addition to the results on the control of bacterial growth, we highlighted the potent immunotherapeutic effects of active vitamin D3 on *P. aeruginosa* phagocytosis and intracellular killing by human MDMs. Although currently there has, to our knowledge, been no study conducted on *P. aeruginosa* in exactly the same way, and the most assays have been performed on *Mycobacterium tuberculosis*, our results agree with recent report [56] suggesting that 1,25(OH)₂D₃ enhances the ability of macrophages to phagocytose and kill of pathogens. Among the main molecular mechanisms involved in enhancing such activities should be the upregulation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) expression, which is considered as a pivotal amplifier of the innate immune response in macrophages [57].

4.7. Conclusions and future prospects

In conclusion, our findings supported the hypothesis that vitamin D3 may modulate innate immune response and prevent host against *P. aeruginosa* infection. This study deserves further investigations, and among others, it would be interesting to: i) evaluate protein levels of VDR to confirm the quantitative RT-PCR-based analysis results, ii) try other approaches such as flow cytometry or immunofluorescence staining to identify molecular determinants of polarized M1-M2 macrophages as well as phagocytic and microbicidal capacity, and iii) study of molecular mechanisms of action of vitamin D and its main immunological effects on macrophage antimicrobial peptides production. Finally, future works would involve improving the treatment response through the use of animal models and various concentrations of 1,25(OH)₂D₃ to identify the optimum useful dose required for the effective eradication of *P. aeruginosa* by boosting an adequate number of macrophages with high phagocytic and bactericidal potential in the context of translational medicine and therapeutics.

Conflict of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Research staff of the INSERM UMR 866 (University of Burgundy, France), and the BIOMOLIM Laboratory Team (University of Tlemcen, Algeria), especially MSc Zineb Hadjadj for their appreciated assistance and valuable technical support. They also are

grateful to Pr. Gérard Lefranc (Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, CNRS UPR 1142, and University of Montpellier, France), Dr. Cédric Raoul (The Neuroscience Institute of Montpellier, INSERM UMR1051, Saint Eloi Hospital, France), and Dr. Antoine Gross (CPBS CNRS, UMR 5236, University of Montpellier, France) for their inestimable help and providing active vitamin D (1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,25D₃).

References

- [1] E.G. Lavoie, T. Wangdi, B.I. Kazmierczak, Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Microbes Infect.* 13 (2011) 1133–1145, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.
- [2] E. Amiel, R.R. Lovewell, G.A. O'Toole, D.A. Hogan, B. Berwin, *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression, *Infect. Immun.* 78 (2010) 2937–2945, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00144-10>.
- [3] J.W. Chung, Z.H. Piao, S.R. Yoon, M.S. Kim, M. Jeong, S.H. Lee, et al., *Pseudomonas aeruginosa* eliminates natural killer cells via phagocytosis-induced apoptosis, *PLoS Pathog.* 5 (8) (2009), e1000561 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000561>.
- [4] L.D. Thomas, A.W. Cripps, J.M. Kyd, Immune response mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa* associated with mucosal immunization with protein antigens in a rat model of acute lung infection, *Vaccine* 27 (2009) 3324–3330, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.085>.
- [5] G.B. Pier, *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity, *Inter. J. Med. Microbiol.* 297 (2007) 277–295.
- [6] T.L. Van Belle, C. Gysemans, C. Mathieu, Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: a vital player? *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25 (2011) 617–632, <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2011.04.009>.
- [7] C. Aranow, Vitamin D and the immune system, *J. Invest. Med.* 59 (2011) 881–886, <http://dx.doi.org/10.2311/JIM.0b013e31821b8755>.
- [8] F. Baeke, C. Gysemans, H. Korf, C. Mathieu, Vitamin D insufficiency: implications for the immune system, *Pediatr. Nephrol.* 25 (2010) 1597–1606, <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-010-1452-y>.
- [9] M. Djukic, M.L. Onken, S. Schütze, S. Redlich, A. Götz, U.K. Hanisch, et al., Vitamin D deficiency reduces the immune response, phagocytosis rate, and intracellular killing rate of microglial cells, *Infect. Immun.* 82 (6) (2014) 2585–2594, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01814-14>.
- [10] S.V. Ramagopalan, A. Heger, A.J. Berlanga, L.M.R. Maugerin, A. Burrell, et al., A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution, *Genome Res.* 20 (2010) 1352–1360, <http://dx.doi.org/10.1101/gr.107920.110>.
- [11] G. Chandra, P. Selvaraj, M.S. Jawahar, V.V. Banurekha, P.R. Narayanan, Effect of vitamin D3 on phagocytic potential of macrophages with live *Mycobacterium tuberculosis* and lymphoproliferative response in pulmonary tuberculosis, *J. Clin. Immunol.* 24 (2004) 249–257.
- [12] P. Selvaraj, P. Anand, M. Harishankar, K. Alagarasu, Plasma 1,25 dihydroxy vitamin D3 level and expression of vitamin D receptor and cathelicidin in pulmonary tuberculosis, *J. Clin. Immunol.* 29 (2009) 470–478, <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-009-9277-9>.
- [13] L. Larcombe, P. Orr, E. Turner-Brannen, C.R. Slivinski, P.W. Nickerson, N. Mookherjee, Effect of vitamin D supplementation on *Mycobacterium tuberculosis*-induced innate immune responses in a Canadian Dené First Nations cohort, *PLoS ONE* 7 (2012), e40692 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040692>.
- [14] P. McNally, C. Coughlan, G. Bergsson, M. Doyle, C. Taggart, L. Adorini, et al., Vitamin D receptor agonists inhibit pro-inflammatory cytokine production from the respiratory epithelium in cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros.* 10 (2011) 428–434.
- [15] S.K. Jain, D. Micsinski, Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437 (2013) 7–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.004>.
- [16] T.T. Wang, F.P. Nestel, V. Bourdeau, Y. Nagai, Q. Wang, J. Liao, et al., Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression, *J. Immunol.* 173 (5) (2004) 2909–2912.
- [17] N. Wang, H. Liang, K. Zen, Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance, *Front. Immunol.* 5 (2014) 614, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>. eCollection 2014.
- [18] Z. Huang, Q. Luo, Y. Guo, J. Chen, G. Xiong, Y. Peng, et al., *Mycobacterium tuberculosis*-induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas *in vitro*, *PLoS One* 10 (6) (2015), e0129744 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0129744>.
- [19] J. Khan, P.K. Sharma, A. Mukhopadhyaya, *Vibrio cholera* porin OmpU mediates M1-polarization of macrophages/monocytes via TLR1/TLR2 activation, *Immunobiology* (2015) pii S0171-2985(15)30006-1. doi: 10.1016/j.imbio.2015.06.009.
- [20] M. Benoit, B. Desnues, J.L. Mege, Macrophage polarization in bacterial infections, *J. Immunol.* 181 (2008) 3733–3739.
- [21] S.E. Jang, M.J. Han, S.Y. Kim, D.H. Kim, *Lactobacillus plantarum* CLP-0611 ameliorates colitis in mice by polarizing M1 to M2-like macrophages, *Int. Immunopharmacol.* 21 (2014) 186–192, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.04.021>.
- [22] A. Richardson, S. Fedoroff, Quantification of cells in culture, in: A. Richardson, S. Fedoroff (Eds.), *Protocols for Neural Cell Culture*, Springer Science & Business Media, New York 1997, pp. 219–233.

- [23] I. Guevara, J. Iwanejko, A. Dembińska-Kieć, J. Pankiewicz, A. Wanat, P. Anna, et al., Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, *Clin. Chim. Acta* 274 (1998) 177–188.
- [24] A. Rouzaut, M.L. Subirà, C. Miguel, E. Domingo-de-Miguel, A. González, E. Santiago, et al., Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO, *Biochim. Biophys. Acta* 1451 (1999) 319–333.
- [25] D. Porto, N. Cifani, S. Guarnieri, E.G. Di Domenico, M.A. Mariggio, F. Spadro, et al., Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One* 6 (5) (2012), e19970 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019970>.
- [26] Z.H. Piao, M.S. Kim, M. Jeong, S. Yun, S.H. Lee, H.N. Sun, et al., VDUP1 exacerbates bacteremic shock in mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*, *Cell. Immunol.* 280 (2012) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.j>
- [27] Nibbering PH, Broug-Holub E, Bezemer AC, Jansen R, van de Winkel JG, Geertsma MF. Phagocytosis and intracellular killing of serum-opsonized *Staphylococcus aureus* by mouse fibroblasts expressing human Fcγ receptor type IIa (CD32). *Front Biosci* 1996; 1:a25–33.
- [28] M. Aribi, W. Meziane, S. Habu, Y. Boulatika, H. Marchand, J.L. Aymeric, Macrophage bactericidal activities against *Staphylococcus aureus* are enhanced *in vivo* by selenium supplementation in a dose-dependent manner, *PLoS One* 10 (9) (2015), e0135515 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>.
- [29] J. Mehrzad, L. Duchateau, C. Burvenich, Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation, *Vet. Microbiol.* 134 (1–2) (2009) 106–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.001>.
- [30] M.L. Manni, L.P. Tomai, C.A. Norris, L.M. Thomas, E.E. Kelley, R.D. Salter, J.D. Crapo, et al., Extracellular superoxide dismutase in macrophages augments bacterial killing by promoting phagocytosis, *Am. J. Pathol.* 178 (6) (2011) 2752–2759, <http://dx.doi.org/10.1016/j>
- [31] C.D. Nelson, T.A. Reinhardt, D.C. Beitz, J.D. Lippolis, *In vivo* activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection, *PLoS One* 5 (2010), e15469 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015469>.
- [32] R.D. Junkins, A. Shen, K. Rosen, C. McCormick, T.J. Lin, Autophagy enhances bacterial clearance during *P. aeruginosa* lung infection, *PLoS One* 8 (2013), e72263 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072263>.
- [33] M. Hewison, Vitamin D and innate and adaptive immunity, *Vitam. Horm.* 86 (2011) 23–62, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386960-9.00002-2>.
- [34] D.A. Youssef, C.W. Miller, A.M. El-Abbassi, D.C. Cutchins, C. Cutchins, W.B. Grant, et al., Antimicrobial implications of vitamin D, *Dermato. Endocrinol.* 4 (2011) 220–229, <http://dx.doi.org/10.4161/derm.3.4.15027>.
- [35] P. Pelegrin, A. Surprenant, Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1β release through pyrophosphates, *EMBO J.* 28 (2009) 2114–2127, <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.163>.
- [36] A. Covarrubias, V. Byles, T. Horng, ROS sets the stage for macrophage differentiation, *Cell Res.* 23 (2013) 984–985, <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.88>.
- [37] A.P. Ralph, G. Waramori, G.J. Pontororing, E. Kenangalem, A. Wiguna, E. Tjitra, et al., L-arginine and vitamin D adjunctive therapies in pulmonary tuberculosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *PLoS One* 8 (2013), e70032 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070032>.
- [38] A. Brosbøl-Ravnborg, B. Bundgaard, P. Höllsberg, Synergy between vitamin D(3) and Toll-like receptor agonists regulates human dendritic cell response during maturation, *Clin. Dev. Immunol.* 2013 (2013) 807971, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/807971>.
- [39] D. Tiosano, G. Wildbaum, V. Gepstein, O. Verbitsky, Y. Weisman, et al., The role of vitamin D receptor in innate and adaptive immunity: a study in hereditary vitamin D-resistant rickets patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (2013) 1685–1693, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2012-3858>.
- [40] M. Kongsbak, M.R. von Essen, L. Boding, T.B. Levring, P. Schjerling, Vitamin D up-regulates the vitamin D receptor by protecting it from proteasomal degradation in human CD4+ T cells, *PLoS One* 9 (2014), e96695 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096695>.
- [41] L. Ausseil, W. Zhao, M. Hébrard, A.A. Guilhon, J.P. Viala, S. Henri, et al., Salmonella detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst, *Mol. Microbiol.* 80 (2011) 628–640, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07611.x>.
- [42] R.A. Miller, B.E. Britigan, Role of oxidants in microbial pathophysiology, *Clin. Microbiol. Rev.* 1 (1997) 1–18.
- [43] Y. Yoshioka, T. Kitao, T. Kishino, A. Yamamoto, S. Maeda, Nitric oxide protects macrophages from hydrogen peroxide-induced apoptosis by inducing the formation of catalase, *J. Immunol.* 176 (2006) 4675–4681.
- [44] C.A. Dinarello, Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856 (1998) 1–11.
- [45] M.J. Nicklin, J.L. Barton, M. Nguyen, M.G. FitzGerald, G.W. Duff, K. Kornman, A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster, *Genomics* 79 (2002) 718–725.
- [46] K.W. Moore, M.R. de Waal, R.L. Coffman, A. O'Garra, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 683–765.
- [47] N. Cole, M. Krockenberger, F. Stapleton, S. Khan, E. Hume, A.J. Husband, M. Willcox, Experimental *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in interleukin-10 gene knockout mice, *Infect. Immun.* 71 (2003) 1328–1336.
- [48] X.L. Rudner, K.A. Kernacki, P.B. Ronald, L.D. Hazlett, Prolonged elevation of IL-1 in *Pseudomonas aeruginosa* ocular infection regulates macrophage-inflammatory protein-2 production, polymorphonuclear neutrophil persistence, and corneal perforation, *J. Immunol.* 164 (2000) 6576–6582.
- [49] M. Verway, M. Bouttier, T.T. Wang, M. Carrier, M. Calderon, B.S. An, et al., Vitamin D induces interleukin-1β expression: paracrine macrophage epithelial signaling controls *M. tuberculosis* infection, *PLoS Pathog.* 9 (2013), e1003407 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003407>.
- [50] D. Eklund, L.H. Persson, M. Larsson, A. Welin, J. Idh, J. Paues, et al., Vitamin D enhances IL-1β secretion and restricts growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages from TB patients, *Int. J. Mycobacteriol.* 2 (2013) 18–25.
- [51] M.L. Xue, H. Zhu, A. Thakur, M. Willcox, 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*, *Immunol. Cell Biol.* 80 (2002) 340–345.
- [52] R.S. Koti, J. Tsui, E. Lobos, W. Yang, A.M. Seifalian, B.R. Davidson, Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver, *FASEB J.* 19 (2005) 1155–1157.
- [53] L.E. Sousse, C.C. Jonkam, D.L. Traber, H.K. Hawkins, T.L.D. RehbergSW, et al., *Pseudomonas aeruginosa* associated with increased lung cytokines and asymmetric dimethylarginine compared to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Shock* 36 (2011) 466–470, <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e3182336b45>.
- [54] A. Mehl, P. Ghorbani, D. Douada, H. Huang, N. Palaniyar, F. Ratjen, et al., Effect of arginase inhibition on pulmonary L-arginine metabolism in murine *Pseudomonas pneumonia*, *PLoS ONE* 9 (2014), e90232 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090232>.
- [55] Y.Z. Kulkarni, C. Huehnken, B. Agerberth, G.H. Gudmundsson, Phenylbutyrate induces cathelicidin expression via the vitamin D receptor: linkage to inflammatory and growth factor cytokines pathways, *Mol. Immunol.* 63 (2015) 530–539.
- [56] T.H. Kim, B. Lee, E. Kwon, S.J. Choi, Y.H. Lee, G.G. Song, et al., Regulation of TREM-1 expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human monocytes/macrophages, *Immunol. Lett.* 154 (2013) 80–85, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.08.012>.
- [57] L. McMahon, K. Schwartz, O. Yilmaz, E. Brown, L.K. Ryan, G. Diamond, Vitamin D-mediated induction of innate immunity in gingival epithelial cells, *Infect. Immun.* 79 (2011) 2250–2256, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00099-11>.

Résumé

Introduction : Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune associée à un déséquilibre de la balance inflammation/réparation. Par ailleurs, la forme bioactive de la vitamine D₃, la 1,25(OH)₂D₃, a des effets immunomodulateurs sur les cellules immunitaires, innées et adaptatives, ainsi que sur la production de leurs cytokines spécifiques. Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune associée à un déséquilibre de la balance inflammation/réparation. Par ailleurs, la forme bioactive de la vitamine D₃, la 1,25(OH)₂D₃, a des effets immunomodulateurs sur les cellules immunitaires, innées et adaptatives, et sur la production de leurs cytokines respectives. Les objectifs de ce projet de thèse ont été d'évaluer l'effet *ex vivo* de la 1,25(OH)₂D₃ sur la production des cytokines pro-inflammatoires Th1/Th17 et anti-inflammatoires Th2/Treg, la production du monoxyde d'azote et l'activité de l'arginase, d'une part, et sur les niveaux d'activation STAT4 (STAT4-p, Tyr693) et STAT6 (STAT6-p, Tyr641), au sein du monocyte, d'autre part, au début du DT1.

Matériels et méthodes : Les essais ont été réalisés sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*), et des monocytes isolés à partir du sang de patients volontaires atteints du DT1 récent, et de sujets contrôles.

Résultats: Les taux de la production de l'IFN- γ , de l'IL-17 et du NO ont été significativement élevés au niveau des PBMCs des patients par rapport aux contrôles. Pareillement, les concentrations relatives de STAT4-p ont été significativement élevées au niveau des monocytes de patients comparés aux contrôles. A l'inverse, les taux de la production de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'expression de STAT6-p ont été significativement diminués au niveau des cellules de patients par rapport aux contrôles. Par ailleurs, le traitement par la 1,25(OH)₂D₃ a induit, d'une part, une augmentation significative des taux de la production de l'IL-4 et de l'IL-10, ainsi que de l'activité de l'arginase et des niveaux de phosphorylation de STAT6, et, d'autre part, une diminution des taux de la production de l'IFN- γ , de l'IL-17 et du NO, ainsi que des niveaux de phosphorylation de STAT4. Enfin, la 1,25(OH)₂D₃ a induit une augmentation de la balance Treg *versus* Th17, et une diminution des balances Th1 *versus* Th2, production du NO *versus* activité de l'arginase et STAT4-p *versus* STAT6-p.

Conclusions : Les travaux de cette thèse suggèrent que la forme bioactive de la vitamine D₃ peut contrer l'activation des voies inflammatoires au début du DT1. Aussi, ses propriétés immunomodulatrices pourraient varier en fonction du profil cytokinique. D'un point de vue thérapeutique, la vitamine D₃ peut éventuellement être proposée comme un adjuvant immunologique et anti-inflammatoire potentiels chez les sujets à risque de développer un DT1.

Mots clés : 1,25(OH)₂D₃, cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, PBMCs, monocytes, STAT4-p et STAT6-p, diabète de type 1.

Abstract

Background. Type 1 diabetes (T1D) is associated with an imbalance between inflammation and repair. Recently, the biologically active form of vitamin D₃, i.e. 1,25(OH)₂D₃, has been reported to have potent immunomodulatory effects on both innate and adaptive immune cells, as well as on the production of their specific cytokines.

Methods. We examined the effect of 1,25(OH)₂D₃ on the production of proinflammatory Th1/Th17 and anti-inflammatory Th2/Treg related cytokines, as well as on the phosphorylation of monocyte-expressed STAT4 and STAT6 at the recent-onset human T1D.

Results. The levels of IFN- γ , IL-17 and nitric oxide (NO) production were significantly increased in PBMCs from patients compared to controls. Similarly, STAT4 tyrosine phosphorylation (p-STAT4, Tyr693) levels were significantly increased in monocytes from patients when compared to controls. Conversely, the levels of IL-4, IL-10 and p-STAT6 (Tyr641) were significantly decreased in type 1 diabetic patients than in controls. Treatment with 1,25(OH)₂D₃ resulted in significant up-regulation of IL-4, IL-10, arginase activity, and pSTAT6 and down-regulation of IFN- γ , IL-17 and NO production levels, as well as p-STAT4. Additionally, 1,25(OH)₂D₃ significantly enhanced Treg-to-Th17 ratio, and induced a significant decrease in Th1-to-Th2, NO production-to-arginase activity and p-STAT4-to-p-STAT6 ratios.

Conclusions. Our study suggests that the biologically active form of vitamin D can reverse the activation of inflammatory pathways at the onset of T1D. Additionally, its immunomodulation properties may vary depending on the overall patterns of cytokines. From a therapeutic point of view, vitamin D may potentially be suggested as an immunological adjuvant and a potential anti-inflammatory agent in individuals at risk of T1D.

Keywords. 1,25(OH)₂D₃, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, PBMCs, monocytes, p-STAT4 and p-STAT6, type 1 diabetes.

ملخص

المقدمة: داء السكري من النوع الأول هو أحد أمراض المناعة الذاتية، وهو مرتبط بعدم التوازن بين الإلتهاب والإصلاح. من جهة أخرى، لفيتامين D₃ (1,25(OH)₂D₃) قدرة على تعديل فيزيولوجية الخلايا المناعية الفطرية والتكيفية، وكذلك على نوعية السيتوكينات التي تنتج. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير الفيتامين 1,25(OH)₂D₃ على إنتاج السيتوكينات الموالية للإلتهابات Th1/Th17 والمضادة للإلتهابات TH2/Treg، على إنتاج أكسيد النيتريك ونشاط الأرجيناز من جهة، وعلى مستويات تفعيل STAT4 (STAT4-p, Tyr693) و STAT6 (STAT6-p, Tyr641) على مستوى الخلايا الأحادية النواة من جهة أخرى، في بداية الداء السكري من النوع الأول.

الوسائل و الطرق: أجريت التجارب على الخلايا الأحادية للدم المحيطي وخلايا أحادية النواة بعد أن تم عزلها من الدم المحيطي لمريض مصابين بداء السكري من النوع الأول و لمترعين معافين.

النتائج: ارتفاع معدل إنتاج كل من الإنترفيرون غاما (IFN- γ) و إنترلوكين-17 (IL-17) و أكسيد النيتريك في الخلايا الأحادية للدم المحيطي للمرضى الذين يعانون من داء السكري من النوع الأول مقارنة مع الشواهد. وكذلك التركيز النسبي ل STAT4 المتفسرة على مستوى خلايا وحيدة النواة للمرضى مقارنة مع الشواهد. بينما معدل إنتاج إنترلوكين-4 و IL-10 وكذلك التركيز النسبي ل STAT6 المتفسرة كانت منخفضة عند المرضى مقارنة مع الشواهد. العلاج بالفيتامين 1,25(OH)₂D₃ أدى إلى ارتفاع في إنتاج IL-4، IL-10، STAT6 المتفسرة و في نشاط الأرجيناز و إلى انخفاض في معدلات إنتاج IFN- γ ، IL-17 و أكسيد النيتريك، بالإضافة إلى STAT4 المتفسرة. علاوة على ذلك، فإن 1,25(OH)₂D₃ أدت إلى ارتفاع في نسبة Treg/Th17 وإلى انخفاض في نسبة كل من Th1/Th2، إنتاج أكسيد النيتريك/نشاط الأرجيناز و - STAT4 متفسرة/STAT6 متفسرة.

الاستنتاجات: بينا لأول مرة في هذه الدراسة أنه بإمكان الفيتامين 1,25(OH)₂D₃ أن يمنع تفعيل الإستجابات الإلتهابية في بداية الداء السكري من النوع الأول. من جهة نظر علاجية، يمكن اقتراح الفيتامين D₃ كمساعد مناعي و كعامل مضاد للإلتهابات لدى الأشخاص الذين لديهم خطر الإصابة بداء السكري من النوع الأول.

الكلمات المفتاحية: فيتامين D₃، الخلايا الأحادية للدم المحيطي، خلايا وحيدة النواة، السيتوكينات الموالية للإلتهابات و المضادة للإلتهابات، STAT4 و STAT6، داء السكري من النوع الأول