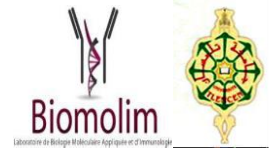


N° d'Ordre



UNIVERSITÉ DE TLEMCCEN – ABOU-BEKRBELKAÏD
FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE -
BIOMOLIM

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur 3ème Cycle LMD en Biologie
Spécialité Immunologie Appliquée

Présentée par :

Mouna NOUAR

Soutenue publiquement le

14 décembre 2023

Intitulé :

**Effet du sélénium sur l'activité du macrophage M1-like proinflammatoire, la
nécroinflammation et la dichotomie M1/M2 au début du diabète de type 1**

Sous la direction des Professeurs

Mourad ARIBI

SMAHI Mohammed Chem-Eddine

Devant les membres de jury

Pr. BOUCHERIT-Otmani Zahia	Présidente	Université de Tlemcen
Pr. TOUIL-BOUKOFFA Chafia	Examinatrice	USTHB, Alger
Pr. BOUMENDJEL Amel	Examinatrice	Université d'Annaba
Pr. MENNECHET Franck	Examineur	Université de Montpellier

Résumé

Résumé

Introduction : L'activation exacerbée des macrophages (M ϕ s) pro-inflammatoires "M1" peut favoriser l'inflammation locale chronique des îlots pancréatiques et le développement du DT1.

Objectif : Dans cette étude, nous avons examiné les effets en *ex vivo* du sélénite de sodium (Ss) sur la modulation immunitaire de l'activation globale des M ϕ s pro-inflammatoires humains de type M1.

Méthode : Des expériences ont été menées sur des M ϕ dérivées de monocytes primaires (MDM).

But : montrer que Ss aurait un effet immunomodulateur sur l'activité fonctionnelle des macrophages pro-inflammatoires (M ϕ s) lors de leur activation extracellulaire prolongée au début du diabète humain de type 1 (DT1).

Résultats : les taux d'IL-1 β , de TNF- α , de H₂O₂ et d'ions de calcium intracellulaires libres (i_c Ca²⁺), ainsi que les rapports IL-1 β -à-IL-10 et TNF- α -à-IL-10 ont significativement augmentés dans les M ϕ s de DT1 que dans M ϕ s de témoin sain. À l'inverse, la production d'IL-10 et l'activité de l'arginase 1 (ARG1) ont baissé dans M ϕ s de DT1. De plus, le traitement par Ss a induit une régulation négative significative du burst respiratoire, des niveaux d' i_c Ca²⁺, de l'activité de l'oxyde nitrique (NO), de NO inductible synthase (iNOS) associée au M ϕ de type M1, de la nécrose cellulaire et des biomarqueurs de nécroinflammation associés, y compris IL-1 β et TNF- α , et l'expression du CD14, et les rapports de iNOS-à-ARG1, IL-1 β -à-IL-10 et TNF- α -à-IL-10. Cependant, Ss a régulé positivement l'activité du M ϕ anti-inflammatoire « de type M2 », comme en témoignent l'activité ARG1 et la production d'IL-10, ainsi que la capacité de la phagocytose.

Conclusions : Ss exerce un puissant rôle immunomodulateur sur les activités fonctionnelles des M ϕ s de type M1 inflammatoires du DT1 humain, ainsi que sur la dichotomie de type M1/M2. De plus, l'étude actuelle fournit une nouvelle approche thérapeutique utilisant Ss pour promouvoir la fonction anti-inflammatoire de M ϕ s au début du DT1.

Mots-clés : spectre d'activation extracellulaire étendu, activités fonctionnelles des macrophages, immunomodulation, macrophages primaires humains de type M1 dérivés de monocytes, traitement au sélénite de sodium, diabète de type 1.

Abstract

Abstract

AIM: The aim of study is to show that sodium selenite (Ss) would have an immunomodulatory effect on the functional activity of proinflammatory macrophages (M ϕ s) during their extended extracellular activation at the onset of human type 1 diabetes (T1D).

Background: Exacerbated activation of proinflammatory “M1” macrophages (M ϕ s) can promote chronic local pancreatic islet inflammation and T1D development.

Objective: We investigated the *ex vivo* effects of Ss on the immune modulation of global activation of human proinflammatory M1-like M ϕ s.

Method: Experiments were carried out on primary monocytes-derived M ϕ s (MDMs).

Results: The levels of IL-1 β , TNF- α , H₂O₂ and intracellular free calcium ions ($_{i}Ca^{2+}$), and the ratios of IL-1 β -to-IL-10 and TNF- α -to-IL-10 were markedly increased in T1D M ϕ s than in healthy control M ϕ s. Conversely, both IL-10 production and arginase 1 (ARG1) activity were downregulated in T1D M ϕ s. Additionally, Ss treatment induced a marked downregulation of respiratory burst, $_{i}Ca^{2+}$ levels, M1-like M ϕ -associated inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) activity, cell necrosis and related necroinflammation biomarkers, including IL-1 β and TNF- α , CD14 expression, and the ratios of iNOS-to-ARG1, IL-1 β -to-IL-10, and TNF- α -to-IL-10. However, Ss upregulated anti-inflammatory “M2-like” M ϕ activity as demonstrated by ARG1 activity and IL-10 production, as well as phagocytosis capacity.

Conclusions: Ss exerts a potent immunomodulatory role on functional activities of human inflammatory T1D M1-like M ϕ s, as well as on the M1-like/M2-like dichotomy. Additionally, the current study provides a novel therapeutic approach using Ss to promote the anti-inflammatory function of M ϕ s at the onset of T1D.

Keywords: extended extracellular activation spectrum, macrophage functional activities, immunomodulation, primary human M1-like monocyte-derived macrophages, sodium selenite treatment, type 1 diabetes

ملخص

مقدمة: التنشيط المتفانم للخلايا البالعة "M1"، يمكن أن يعزز الالتهاب الموضعي المزمن لجزر البنكرياس و تطور داء السكري النوع الاول.

الهدف: في هذه الدراسة، قمنا بتقييم تأثير السيلينيت الصوديوم (Ss) على التعديل المناعي للخلايا البالعة البشرية "M1".

النتائج: أظهرت النتائج أن مستويات $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ ، H_2O_2 و ايونات الكالسيوم الخلوية الحرة (Ca^{2+}) و كذلك نسب $IL-1\beta$ -to- $IL-10$ و $TNF-\alpha$ to $IL-10$ ، زادت بشكل ملحوظ في داء السكري النوع الاول. على العكس من ذلك، انخفض انتاج $IL-10$ و نشاط الارجيناز 1 (ARG1) في الخلايا البالعة لداء السكري من النوع الاول. تسبب (Ss) في انخفاض burst respiratoire و مستويات Ca^{2+} و نشاط أكسيد النتريك (NO) و التنخر (Necrose) المرتبط ب "M1" و العلامات الحيوية المرتبطة بها، بما في ذلك $IL-1\beta$ و $TNF-\alpha$ و CD 14 و نسب $iNOS$ -to-Arg1 و $IL-1\beta$ -to- $IL-10$ و $TNF-\alpha$ -to- $IL-10$. علاوة على ذلك، فان (Ss) ينظم نشاط الخلايا البالعة المضادة للالتهاب "M2" كما يتضح من نشاط Arg 1 و انتاج $IL-10$ و كذلك قدرة البلعمة الخلوية.

الاستنتاجات: يمارس (Ss) دورا قويا في تعديل المناعة على الانشطة الوظيفية للخلايا البالعة "M1" في داء السكري البشري النوع الاول كذلك الانقسام من النوع "M1/M2" بالاضافة الى ذلك توفر الدراسة الحالة، نهجا علاجيا جديدا لاستخدام (Ss) لتعزيز الوظيفة المضادة للالتهاب في الخلايا البالعة، في وقت مبكر لداء السكري النوع الاول.

الكلمات المفتاحية: طيف التنشيط خارج الخلية، الأنشطة الوظيفية للبلاعم، تعديل المناعي، الخلايا البالعة البشرية "M1" المشتقة من الخلايا أحادية النواة، صوديوم سيلينيت، داء السكري من النوع الاول.

Avant-propos

Avant-propos

A l'issue de ce travail, il m'est agréable de remercier tous ceux qui, directement ou indirectement, ont contribué à son élaboration.

Je remercie en premier lieu mon directeur de thèse et directeur du laboratoire de biologie moléculaire appliquée et immunologie, le **Professeur Mourad ARIBI** pour avoir supervisé mon travail pendant toutes ces années. Sa disponibilité sans fin, sa rigueur et son honnêteté scientifique, ses remises en question et doutes qui nous font avancer au jour le jour, ses inquiétudes quotidiennes sur mes résultats, sa confiance qu'il m'a accordée, ont rendu ces années de thèse particulièrement enrichissantes, tant du point de vue scientifique qu'humain. Qu'il trouve l'expression de ma profonde gratitude et reconnaissance.

Je remercie aussi Professeur SMAHI Mohammed Chems-Eddine d'avoir codirigé ce travail.

Je remercie madame le **Professeur BOUCHERIT-Otmani Zahia** qui m'a fait honneur de présider le jury.

J'exprime ma gratitude aux **Professeurs TOUIL-BOUKOFFA Chafia, BOUMENDJEL Amel** et **MENNECHET Franck** en acceptant de faire partie de ce jury.

Un merci tout particulier pour mes parents, qui ont toujours cru en moi et m'ont donné des ailes pour me permettre de voler toute seule et soutenu. Merci à ma sœur pour ses encouragements et ses conseils. Je remercie aussi mes proches spécialement ma petite cousine Khadidja Line qui grâce à sa présence et son sourire, j'ai pu surmonter les moments les plus difficiles.

Mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire BIOMOLIM, pour tous les moments passés ensemble notamment Maroua MILIANI, Imène BELHASSENA, Rabia MESSALI, Wafa NOUARI, Zeyneb HADJIDI, Warda MEZIANE, Sara DAHOU, Lamia YSMAIL-DAHLOUK, Aida MESSAOUD et Souad ZOUDJI.

Je tiens à remercier du fond du cœur toutes mes amies qui m'ont aidé et encouragé, je cite spécialement, Mounia, Asma ,bouchra ,Malika pour réaliser ce travail.

Enfin, je dédie ce travail à la mémoire de mes grand-parents.

Table des matières

Résumé.....	<i>i</i>
Abstract.....	<i>ii</i>
ملخص.....	<i>iii</i>
Avant-propos.....	<i>iv</i>
Table des matières.....	<i>v</i>
Liste des figures	<i>ix</i>
Liste des tableaux	<i>x</i>
Liste des abréviations.....	<i>xi</i>
Introduction.....	<i>1</i>
Chapitre 1. Revue de la littérature.....	<i>4</i>
1.1. Diabète de type 1	<i>4</i>
1.2. Classification du diabète de type 1.....	<i>4</i>
1.2.1. Le diabète de type 1A (DT1A).....	<i>4</i>
1.2.2. Le diabète de type 1B.....	<i>5</i>
1.3. Les facteurs de risque de la maladie.....	<i>5</i>
1.3.1. Facteurs génétiques	<i>5</i>
1.3.2. Facteurs immunologiques	<i>6</i>
1.3.3. Facteurs environnementaux	<i>6</i>
1.4. Immuno-pathogénèse du DT1.....	<i>7</i>
1.5. Monocytes et Macrophages.....	<i>8</i>
1.5.1. Monocyte et macrophages, cellules du système des phagocytes mononuclées	<i>8</i>
1.5.1.1. Origine et hétérogénéité des monocytes	<i>8</i>
1.5.1.2. Macrophages	<i>9</i>
1.5.1.3. Origine et différenciation des Macrophages	<i>10</i>
1.5.1.4. Fonction	<i>11</i>
1.5.2. Récepteurs et marqueurs membranaires des macrophages	<i>11</i>

Table des matières

1.5.3. Activation des macrophages	12
1.5.4. Polarisation des macrophages	13
1.5.4.1. Macrophages activés classiquement (CAMφs) M1.....	13
1.5.4.2. Macrophages activés alternativement (AAMφs) M2.....	13
1.5.5. Génération des macrophages M2	14
1.5.6.Sous-types de macrophages M2	14
1.5.6.1.Les macrophages M2a	14
1.5.6.2.Les macrophages M2b	15
1.5.6.3.Les macrophages M2c	15
1.5.6.4.Les macrophages M2d	15
1.5.7.Rôle dans l'immunité innée.....	16
1.5.7.1.Burst respiratoire	16
1.5.7.1.1. Monoxyde d'azote	16
1.5.7.1.2.Peroxyde d'hydrogène	16
1.5.7.1.3.Arginase	17
1.5.8. Balance arginase/iNOS	17
1.5.9. Molécules sécrétées par le macrophage.....	17
1.5.9.1. Cytokines et facteurs de croissance	18
1.5.9.2.Chemokines et eicosanoïdes.....	18
1.5.10. Phagocytose et action microbicide	19
1.5.11. Rôle des macrophages dans l'immunité adaptative	19
1.5.12. Rôle pathogène du macrophage dans le diabète de type 1.....	19
1.6. Sélénium et macrophages.....	20
1.6.1. Historique.....	20
1.6.2. Propriétés physico-chimiques de sélénium.....	20
1.6.3. Rôle antioxydant	20
1.6.4. Aliments riches en sélénium	21
1.6.5. Métabolisme du sélénium.....	21
1.7.Rôles biologiques du sélénium.....	22
1.8.Effets du sélénium.....	22
1.8.1.Effet du sélénium sur l'immunité	22
1.8.2.Effet du sélénium sur l'activation des macrophages.....	22
1.9.Problématique et objectifs	23
1.9.1.Problématique.....	23
1.9.2. Objectifs	23
1.9.3. But	23

Table des matières

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1.....	24
2.1. Matériels et méthodes	26
2.1.1. Modèles de cellules <i>ex vivo</i> et expériences indépendantes	26
2.1.2. Critères d'éligibilité pour la collecte d'échantillons de cellules primaires et déclaration d'éthique	27
2.2. Préparation et traitement des échantillons cellulaires	27
2.2.1. Isolement et purification des monocytes.....	27
2.2.2. Génération des Mφs M1-(classique-) like pro-inflammatoire, extension du spectre d'activation inflammatoire induite par le ligand TLR et traitement par le Ss.....	28
2.3. Lyse de Mφs.....	28
2.4. Dosage des protéines totales	28
2.5. Burst respiratoire	28
2.5.1. Mesure de NO	28
2.5.2. Mesure de H ₂ O ₂	29
2.6. Test de phagocytose et destruction bactéricide (pathogen killing)	29
2.7. Dosage des activités M1-like_(iNOS) et M2-like_(ARG1)	29
2.8. Mesure de nécroinflammation.....	29
2.8.1. Nécrose	30
2.8.2. Mφs non-nécrotiques restants.....	30
2.8.3. Dosage des cytokines	30
2.9. Mesure du calcium intracellulaire libre	30
2.10. Test d'immunofluorescence	30
2.11. Analyses statistiques des données	31
2.2. Résultats.....	32
2.2.1. Effet du sélénite de sodium sur la nécrose et la nécroinflammation associée et cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α associés aux macrophages M1-like au début du diabète de type 1.....	32
2.2.2. Effet du sélénite de sodium sur la production de la cytokine IL-10 anti-inflammatoire/régulatrice associée au macrophage M2-like	33
2.2.3. Effet du sélénite de sodium sur le burst respiratoire.....	34
2.2.4. Effet du sélénite de sodium sur la modulation de M1-like _(activité d'iNOS) et M2-like _(activité d'Arg1)	35

Table des matières

2.2.5. Effet du sélénite de sodium sur le taux du calcium intracellulaire libre	37
2.2.6. Effet du sélénite de sodium sur la phagocytose et la destruction bactérienne des agents pathogènes.....	38
2.2.7. Effet immuno-modulateur du sélénite de sodium sur la balance des M1-like pro-inflammatoire <i>versus</i> les M2-like anti-inflammatoire	39
2.2.8. Effet du sélénite de sodium sur l'activation du macrophage M1-like associé à l'expression du CD14 au cours du DT1	40
2.3. Discussion	42
2.3.1. Effet du sélénite de sodium sur la nécro-inflammation et la cytokine IL-10 de type M2-like régulatrice/anti-inflammatoire	42
2.3.2. Effet du sélénite de sodium sur le burst respiratoire	43
2.3.3. Effet du sélénite de sodium sur la phagocytose et la destruction bactérienne	43
2.3.4. Effet de sélénite de sodium sur les Mφs M1-like _(iNOS) et M2-like _(ARG1) , et la dichotomie de Mφs "M1-like" <i>versus</i> Mφs "M2-like"	44
2.3.5. Effet du sélénite de sodium sur le calcium intracellulaire libre	44
2.3.6. Effet du sélénite de sodium sur l'expression du CD14	45
2.4. Conclusions	45
Chapitre 3. Conclusions et perspectives.....	47
Chapitre 4. Bibliographie.....	49

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1.1. Caractéristiques pathologiques du pancréas dans le DT1	4
Figure 1.2. Carte de la région du complexe HLA DR-DQ-DP sur le chromosome 6 humain, avec la région de classe II.	5
Figure 1.3. Facteurs de risque responsables du développement du DT1.....	7
Figure 1.4. Cross talk entre les cellules du système immunitaire et les ilots de Langerhans.	8
Figure 1.5. Origine des monocytes	9
Figure 1.6. Origine du macrophage	10
Figure 1.7. Différents stimuli, marqueurs de surface, cytokines sécrétées et fonctions biologiques entre les macrophages M1 et M2.	14
Figure 1.8. Caractéristiques des sous types des macrophages M2.	15
Figure 1.9. Réaction chimique de synthèse du NO par NOS.	16
Figure 1.10. Présence des enzymes iNOS et arginase dans le macrophage et régulation opposée.	17
Figure 1.11. Métabolisme de différentes formes du sélénium	21
Figure 2.1. Organigramme de l'étude	26
Figure 2.2. Effet du sélénite de sodium sur la nécroinflammation et la production associée au cytokines pro-inflammatoires de type M1 IL-1 β et TNF- α au début du diabète de type 1 humain.	32
Figure 2.3. Effet du sélénite de sodium sur la production de cytokine anti-inflammatoire/régulatrice de type M2 IL-10 par les M ϕ s humains au début du diabète de type 1.....	34
Figure 2.4. Effet du sélénite de sodium sur le burst respiratoire des M ϕ s au début du diabète de type 1.	35
Figure 2.5. Effet du sélénite de sodium sur les M ϕ s humains de type M1 (activité d' iNOs) et de type M2 (activité d'ARG 1) au début du diabète de type 1	36
Figure 2.6. Effet du sélénite de sodium sur l'ifCa ²⁺ dans le M ϕ humain au début du diabète de type 1.	37
Figure 2.7. Effet du sélénite de sodium sur la capacité phagocytaire et bactéricide du M ϕ au début du diabète de type 1.	38
Figure 2.8. Effet du sélénite de sodium sur la balance des M ϕ s « M1-like » pro-inflammatoire versus « M2-like » anti-inflammatoire au début de diabète de type 1.....	39
Figure 2.9. Effet du sélénite de sodium sur l'activation des M ϕ s de type M1 associée à l' expression de CD14 au début du diabète humain de type 1.....	40

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1.1. La répartition tissulaires des macrophages et leur dénomination.....	11
Tableau 1.2. Récepteurs et marqueurs membranaires du macrophage.....	12
Tableau 1.3. Caractéristiques physico-chimiques du Sélénium.....	20

Liste des abréviations

Liste des abréviations

15d-PGJ₂: prostaglandine D2 (15-désoxy-delta-12,14-prostaglandine J₂).

A

AAMφs : macrophages activés alternativement

Adgre1 / F4/80 : adhesion G protein-coupled receptor E1.

Arg1 : arginase 1.

C

CAMφs : macrophages activés classiquement

CCL18 C-C motif chemokine ligand 18.

Cellules β : cellules bêta.

CCL22 : C-C motif chemokine ligand 22.

CD: cluster of differentiation

CLR : *C-type Lectins Receptor*.

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

CMP : common myeloid progenitors.

C : cystéine

CC : cystéine-cystéine

CXCL9 : *C-X-C9 motif chemokine ligand 9*

CXCL10 : *C-X-C10 motif chemokine ligand 10*.

CX3CR1 : *C-X3-C motif chemokine receptor 1*.

COX : la cyclooxygénase.

D

DT1 : diabète de type 1.

E

EDTA : Ethylène diamine tétraacétique (*ethylenediaminetetraacetic acid*).

ELISA: dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Liste des abréviations

F

Fas : *Apoptosis-Stimulating Fragment*.

Fas-L: Fas-ligand.

Fizz1 : Resistin-like molecule alpha or found in inflammatory zone protein.

J

JMJD3 :Jumonji domain containing-3

H

HLA :Human- leukocyte- antigen.

HSCs : haematopoietic stem cells.

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

I

IA-2 orIA-2b: insulin, and tyrosine phosphatase–like protein.

ICA : auto-anticorps contre les cellules des îlots.

IFN- γ : interféron- γ .

IL : interleukine.

iNOS : inductible nitric oxide synthase.

IRF: interferon regulatory factor.

G

GAD65 : Glutamic acid decarboxylase 65

L

LPS : Lipopolysaccharide.

LT CD4+ : lymphocyte T CD4+.

L TCD8+ : lymphocyte TCD8+.

LB :lymphocyte B

M

MAPKs: mitogen–activated protein kinase .

M ϕ s : macrophages.

M1 : macrophage classiquement activé/proinflammatoire.

M2 : macrophage alternativement activé/réparateur.

Liste des abréviations

M-CSF: Macrophage-colony stimulating factor.

N

NADPH :nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate.

NLR :*NOD-Like receptors*.

NF- κ B : facteur nucléaire kappa-lightchain-enhancer des cellules B activées.

NK:natural killer

NKT: natural killer T

nNOS : NOS neuronale

NOS2: Nitric oxyde synthase 2.

NO : monoxyde d'azote.

P

PBMCs: cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*).

PBS : PBS: phosphate buffered saline.

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor .

PRR : *pattern recognition receptors*.

R

RLR : *RIG-I-like Receptors* .

RNS: *reactive nitric species*.

ROS: *reactive oxygen species*

S

SOCS3: *suppressor of cytokine signaling 3*.

Ss: sélénite de sodium.

STAT: Signal transducer and activator of transcription.

Staphylococcus aureus:*S.aureus*.

T

Th1: lymphocyte T helper.

TGF- β : Tumor Growth Factor- beta.

TLR: Toll-like receptor.

Liste des abréviations

TNF: tumor necrosis factor.

V

VEGF: vascular endothelial growth factor.

Z

ZnT8: Zinc transporteur-8

Introduction

Introduction

Les macrophages (M ϕ s) ont été identifiés comme l'un des effecteurs les plus critiques des cellules de l'immunité innée qui infiltrent les ganglions lymphatiques pancréatiques (PLN) et participe à la destruction des cellules β et au développement du DT1 (Espinoza-Jiménez et al., 2012). Les premières études démontrant la destruction des cellules des îlots par les M ϕ s ont été réalisées par une co-culture avec des monocouches de cellules d'îlots pancréatiques de souris (Schwizer et al., 1984) .

La classification actuelle des M ϕ s en deux sous-types principaux, appelés M ϕ s "classiquement" activés (M1) ou "alternativement" activé (M2), a conduit à montrer que le rôle néfaste sur les cellules β est attribué au sous-type M1 (tuer/combattre le « monoxyde d'azote [NO] ») en tant que phénotype pro-inflammatoire (Meares et al., 2013a; Van Gassen et al., 2015) . En revanche, le sous-type anti-inflammatoire M2 (cicatrisation/réparation des plaies « L-ornithine ») est connu pour réduire l'insulite et l'inflammation du pancréas en raison de la production de cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 (Southern et al., 1990). De plus, des preuves cumulatives suggèrent que les dommages causés par les M ϕ pro-inflammatoires aux cellules β peuvent être dus à leur activation exacerbée, chronique et incontrôlée, qui entraîne une persistance de l'inflammation du pancréas (Stoffels et al., 2004). Ainsi, des études, en *ex vivo* ou *in vitro*, ont montré que leur activation « continue » et « globale/étendue » serait d'un grand intérêt de mimer leur rôle fonctionnel au début du DT1.

La modulation du processus inflammatoire est l'une des principales approches actuelles en immunothérapie du DT1. Il convient de noter que des preuves récentes suggèrent que la supplémentation en sélénium, oligo-éléments, sous forme de sélénite de sodium (Ss, Na₂SeO₃), peut être très efficace dans la modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives (Hoffmann and Berry, 2008; Xia et al., 2021) .

Dans les M ϕ s, il a été démontré que Ss exerce son effet anti-inflammatoire en atténuant l'expression des gènes pro-inflammatoires et du métabolite de la prostaglandine D2 (15-désoxy-delta-12,14-prostaglandine J₂ [(15d-PGJ₂)] qui sont reconnus pour être induite lors de processus inflammatoires (Shibata et al., 2002; Vunta et al., 2008).

De plus, il a été montré que Ss a la capacité de réguler négativement l'inflammation et de favoriser le switch des M ϕ d'un phénotype classiquement activé pro-inflammatoire à un phénotype anti-inflammatoire pro-résolvant, dans lequel un rôle clé a été attribué aux prostaglandines cyclopenténones dépendantes de la cyclooxygénase (COX), Δ 12-PGJ₂ et 15d-PGJ₂, qui sont produites en présence de sélénoprotéines (Korwar et al., 2019; Nelson et al., 2016). Sa capacité à réguler négativement l'inflammation a été liée à son incorporation

Introduction

dans les sélénoprotéines, tout en activant les voies de pro-résolution *via* la régulation différentielle de deux facteurs de transcription, y compris l'inhibition du facteur nucléaire kappa-lightchain-enhancer des cellules B activées (NF- κ B) et l'activation du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ) d'une manière ligand-dépendante. Aussi, les sélénoprotéines également régule à la baisse l'expression des gènes inflammatoires par le biais de mécanismes épigénétiques en diminuant l'acétylation de l'histone H4 à K12 et K16 dans les promoteurs COX-2 et du facteur de nécrose tumorale (TNF) et de la sous-unité p65 du facteur de transcription sensible à l'oxydoréduction NF- κ B (Narayan et al., 2015).

L'objectif de ce travail est de souligner, le rôle majeur des M ϕ s dans le développement du DT1 et l'exploration en *ex vivo*, les propriétés immunomodulatrices du Ss sur les activités fonctionnelles de ses derniers, constituant ainsi, une nouvelle cible thérapeutique.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. Diabète de type 1.

1.5. Macrophages.

1.6. Sélénium.

1.9. Problématique et objectifs.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. Diabète de type 1

Définition

Le diabète de type 1 (également connu sous le nom de diabète sucré) est une maladie auto-immune caractérisée par l'infiltration des cellules immunitaires et l'inflammation des îlots de Langerhans pancréatiques appelée « insulite », dans laquelle les cellules β productrices d'insuline du pancréas sont détruites entraînant une carence partielle ou absolue en insuline (Figure 1.1) (Almahfoodh et al., 2017; Canivell and Gomis, 2014; Merger et al., 2013; von Herrath et al., 2007).

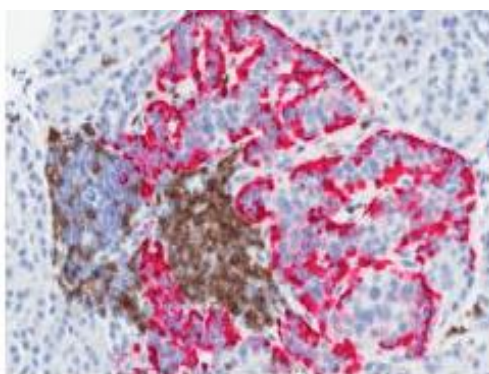


Figure 1.1. Caractéristiques pathologiques du pancréas dans le DT1 (Atkinson et al., 2014)

Infiltration d'îlots (insulite) observée chez un patient atteint de diabète de type 1 d'apparition récente. L'immunohistochimie montre la présence intra-îlots de cellules CD3 positives (marron) et de cellules alpha productrices de glucagon (rose). Image reproduite avec l'aimable autorisation de M Campbell Thompson, Université de Floride, Gainesville, Floride, États-Unis.

1.2. Classification du diabète de type 1

Deux formes de DT1 ont été identifiées selon les systèmes de classification actuels : le diabète de type 1A (DT1A) et le diabète de type 1B (DT1B) (Merger et al., 2013) .

1.2.1. Le diabète de type 1A (DT1A)

Le diabète de type 1A est une destruction auto-immune chronique des cellules β pancréatiques, avec à la fois une prédisposition génétique et la présence d'auto-anticorps dans le sérum contre les cellules des îlots (ICA), l'insuline (IAA, jusqu'à 90% de la première manifestation chez les très jeunes enfants), la glutamate décarboxylase 65 (anticorps GAD65), la tyrosine phosphatase (IA-2) ou transporteur de zinc 8 (ZnT8) (Bottazzo et al., 1974; Verge et al., 1994).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2.2. Le diabète de type 1B

Le diabète sucré de type 1B décrit des patients atteints de carence en insuline et absence de preuve d'auto-immunité à cellules β . Patients sans autre cause connue de destruction des cellules β , sont désignés comme idiopathiques ou atteints de diabète sucré de type 1B (Imagawa et al., 2000). Il est beaucoup moins fréquent, n'a pas de cause connue et survient principalement chez les personnes d'origine asiatique ou africaine, qui présentent divers degrés de carence en insuline entre les épisodes sporadiques d'acidocétose (Daneman, 2006).

1.3. Les facteurs de risque de la maladie

1.3.1. Facteurs génétiques

La maladie est un trouble polygénique dont de nombreux gènes contribuent à divers niveaux de risque génétique pour le développement de DT1. Les gènes conférant un risque de diabète sont généralement classés en tant que gènes HLA (Human-leukocyte-antigen) et non HLA. Le principal déterminant de la sensibilité génétique au DT1, contribuant à plus de 50% du risque génétique, est attribué aux allèles IDDM1 (diabète sucré insulino-dépendant) localisé sur le locus du complexe HLA (principalement la région DR-DQ de classe II) situé sur le chromosome 6 (Anjos and Polychronakos, 2004; Simmons, 2015). Parmi les gènes non HLA, l'insuline et la protéine tyrosine phosphatase non-récepteur de type 22 (PTPN22) confèrent un risque de développement du D1T mais à des degrés moindres que les gènes HLA (Polychronakos and Li, 2011). À l'instar des gènes HLA de classe II, les polymorphismes du gène de l'insuline peuvent conférer une sensibilité au développement du DT1 (Bradfield et al., 2011; Steck et al., 2009) (Figure 1.2).

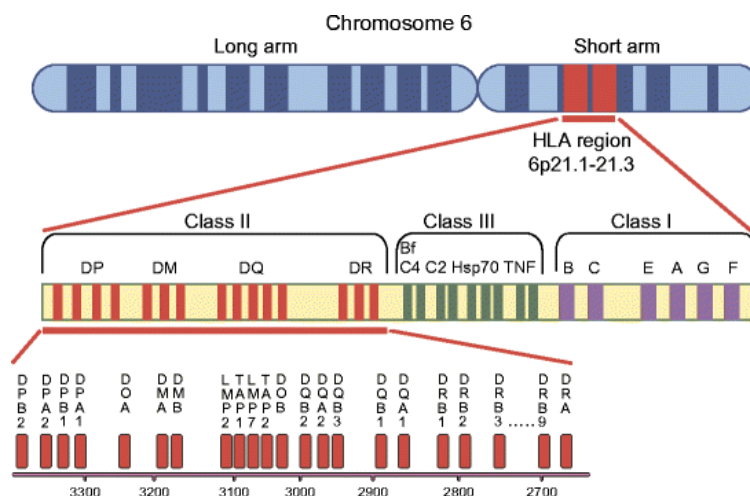


Figure 1.2. Carte de la région du complexe HLA DR-DQ-DP sur le chromosome 6 humain, avec la région de classe II (Regnell and Lernmark, 2017).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.3.2. Facteurs immunologiques

Parmi les facteurs immunologiques qui contribuent au développement de la maladie est l'apparition des auto-anticorps tel que glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65), insulín, et tyrosine phosphatase-like protein (IA-2 or IA-2b) et zinc transporter 8 (ZnT8) (Watkins et al., 2014).

1.3.3. Facteurs environnementaux

Des études sur l'étiologie du DT1 suggèrent que certains mécanismes immunogènes prédisposent à un risque accru de développer la maladie à partir de facteurs environnementaux (Hägglöf et al., 1991).

Les infections, principalement les infections virales sont considérées comme une cause potentielle du DT1, bien que les bactéries ne soient pas exclues comme cause de lésion pancréatique. De nombreuses études conduites sur des modèles animaux et chez les êtres humains, incriminant plusieurs virus, y compris les entérovirus. Ces virus ont un tropisme pour les îlots pancréatiques humains *in vivo* et *in vitro* (Rewers and Ludvigsson, 2016).

En outre, l'impact de l'alimentation dans le développement du DT1 a été mis en évidence depuis longtemps. Un lien entre l'introduction précoce du lait de vache et l'apparition du DT1 a fait l'objet de nombreux travaux opposés, certaines études n'ont montré aucun lien entre l'exposition précoce au lait de vache et le DT1 (Frederiksen et al., 2013), alors que d'autres travaux ont indiqué que l'introduction de ce dernier dans les premiers 6 à 8 mois de la vie présentaient un risque faible (Knip et al., 2010). Tandis que la consommation plus élevée de lait de vache pourrait favoriser la progression vers le DT1 chez les enfants (Lamb et al., 2015). De plus, l'exposition à un âge précoce aux céréales (contenant du gluten et sans gluten) ainsi qu'aux œufs étaient associées à un risque accru d'auto-immunité des îlots pancréatiques (Rewers and Ludvigsson, 2016).

Cependant, plusieurs travaux conduits sur les vaccins l'on mis hors de cause et ont conclues que ces derniers n'augmentent pas le risque de DT1 chez les enfants (Morgan et al., 2016), et aucune association n'a été détectée avec la destruction auto-immune des cellules β (Graves et al., 1999; Hummel et al., 2000) ou le DT1 (Jefferson and Demicheli, 1998; Offit and Hackett, 2003). Certains facteurs environnementaux potentiels pour le DT1 sont étroitement associés au développement et à la fonction du microbiote humain. Les microbes intestinaux influencent le métabolisme des lipides et du glucose, ainsi que l'immunité et l'inflammation systémique à l'extérieur de l'intestin (Maslowski and Mackay, 2011; Wen et al., 2008). Certains ont signalé une diversité microbienne plus faible chez les enfants atteints d'auto-immunité des îlots pancréatique avant la progression vers la maladie, par rapport aux témoins sains (Brown et al., 2011; de Goffau et al., 2013; Kostic et al., 2015). La figure ci-

Chapitre 1. Revue de la littérature

dessous résume les déclencheurs environnementaux et facteurs de l'auto-immunité des îlots pancréatiques et promoteurs de la progression vers le DT1 pour lesquels une association a été suggérée (Figure 1.3).

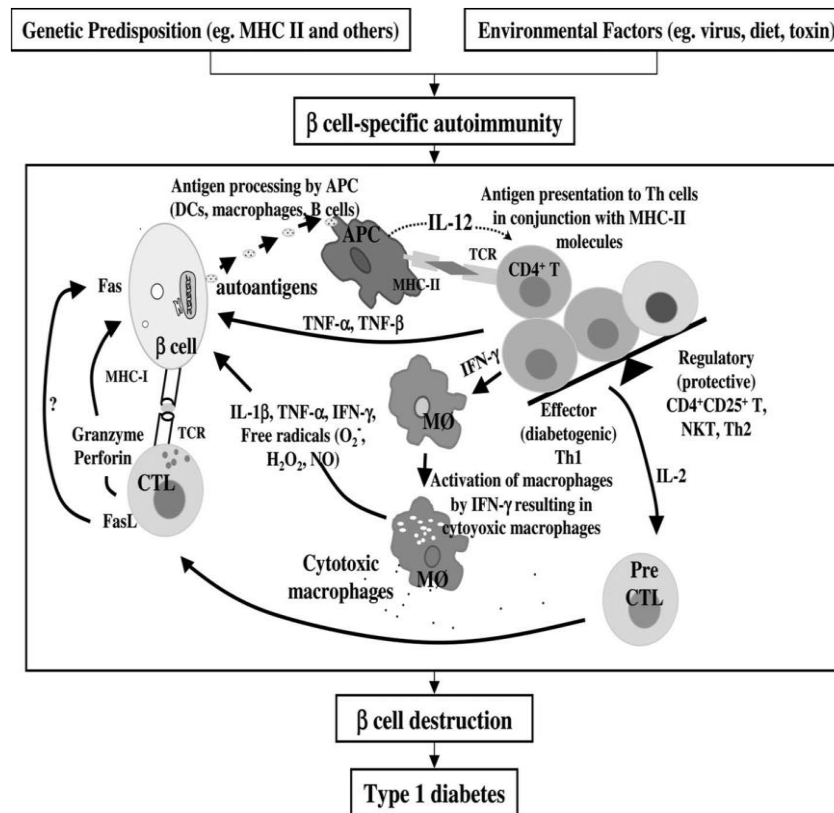


Figure 1.3. Facteurs de risque responsables du développement du DT1 (Yoon and Jun, 2005).

1.4. Immuno-pathogénèse du DT1

Nombreuses études montrent que l'immunité innée et adaptative contribuent dans la pathogénèse de la maladie, avec la participation non seulement des lymphocytes TCD4+, TCD8+ et les lymphocytes B mais aussi des cellules comme les Mφs, les cellules NK et NKT et les cellules dendritiques causant ainsi l'inflammation caractéristique des cellules β pancréatique appelée « insulite » (Baumann et al., 2012).

Les lymphocytes auto réactifs CD4⁺ et CD8⁺ et les Mφs sont les premières cellules infiltrant les îlots de Langerhans pour initier la maladie (Chentoufi et al., 2011). La production des cytokines interféron-γ (IFN-γ), interleukine-2 (IL-2) et le facteur de necrose -β (TNF-β) par les lymphocytes T auxiliaires (helper) (Th1) induit une cascade de processus immunitaire /inflammatoire dans les îlots de Langerhans, aboutissant à la destruction des cellules β. Cependant, le rôle de ces cytokines dans la pathogénèse du DT1 est complexe. Par exemple, l'IFN-γ joue un rôle dans la destruction des cellules β *via* un signal transducteur et activateur de la voie de transcription-1 (STAT-1). De plus, l'interaction spécifique des lymphocytes TCD8+ avec les cellules β pour les détruire s'accomplit par contact cellulaire, par

Chapitre 1. Revue de la littérature

un processus cytotoxique, ou par d'autres facteurs y compris la libération de cytokines pro-inflammatoires, de granzyme β ou de perforine, et peut-être par la signalisation et les voies de la mort cellulaire programmée (apoptose). L'expression des molécules de CMH de classe I par les cellule pancréatique β les rendent plus susceptible à la destruction directe par les lymphocyte TCD8+ cytotoxique (CTL), suite à la reconnaissance du complexe peptide-CMH de classe 1. Alors que la sécrétion de certaines cytokines est nécessaire telle que IL-21, pour activer les lymphocyte TCD8+ auto-réactifs qui pourraient détruire rapidement les cellules β et donc contribuer au développement de DT1. D'autre facteurs clés pouvant entraîner la mort des cellules β sont les lymphocytes CD8 + cytotoxiques sécrétant la perforine, l'action directe des cytokines telles que IFN- γ , TNF- α et IL-1 β , les interactions Fas-Fas-L (Li et al., 2014).

En outre, les lymphocytes B et leurs produits peuvent promouvoir l'auto-immunité par plusieurs mécanismes, notamment la production d'auto-anticorps avec la génération conséquente de complexes immuns, la présentation de l'antigène pour générer des réponses primaires auto-réactives des lymphocytes T et la contribution au maintien de la mémoire des lymphocytes T CD4+ ou production de cytokines pro-inflammatoires (Cox and Silveira, 2009; O'Neill et al., 2009). (Figure 1.4).

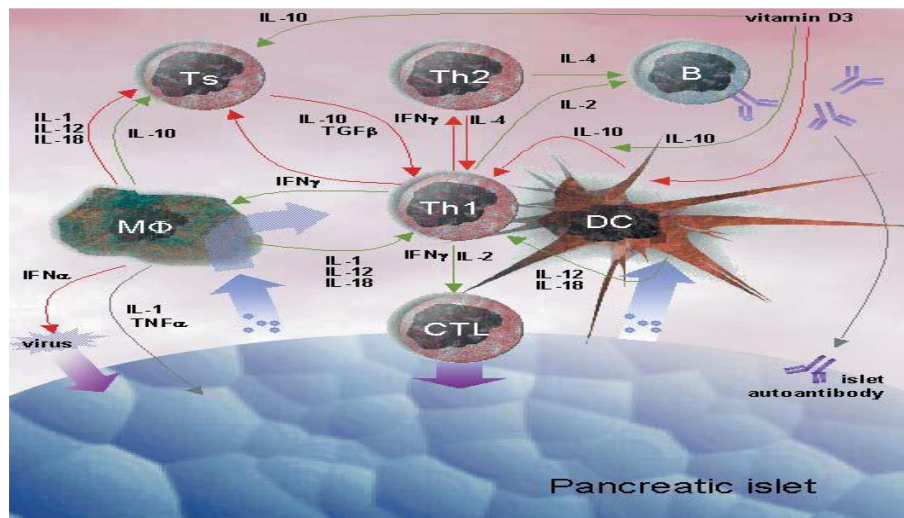


Figure 1.4. Cross talk entre les cellules du système immunitaire et les îlots de Langerhans (Roep, 2003).

1.5. Monocytes et Macrophages

1.5.1. Monocyte et macrophages, cellules du système des phagocytes mononucléés

1.5.1.1. Origine et hétérogénéité des monocytes

Les monocytes sont des cellules phagocytaires issu des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (HSCs : haematopoietic stem cells) dans la moelle osseuse et la rate, qui se différencient en des précurseurs myéloïde. Les précurseurs myéloïdes

Chapitre 1. Revue de la littérature

communs à partir de HSC (CMP, *common myeloid progenitors*) (Yang et al., 2014), le précurseur myéloïde est commun aux granulocytes et aux monocytes. Les étapes de différenciation des monocytes sont essentiellement dépendantes du facteur de croissance M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor ou CSF-1). Les monocytes, M ϕ s, cellules dendritiques et leurs précurseurs partagent d'ailleurs le récepteur au M-CSF (CSF-1R) comme caractéristique (Auffray et al., 2009). Les monocytes migrent de la moelle osseuse pour aller dans la circulation sanguine (Auffray et al., 2009). Avant de migrer dans les tissus par diapédèse et de se différencier en M ϕ s tissulaires (Guilliams et al., 2018). Les monocytes représentent environ 10% des leucocytes du sang circulant de l'Homme (Geissmann et al., 2010) (Figure 1.5). Les monocytes circulants sont les précurseurs des cellules phagocytaires et présentatrices d'antigène dans les tissus, que sont les cellules dendritiques et les M ϕ s (Guilliams et al., 2018). Les monocytes sanguins humains sont morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes, cette hétérogénéité est basée sur l'analyse de l'expression des molécules de surface spécifiques notamment le CD14 et le CD16 (Fc γ R-III) (Yang et al., 2014). Les monocytes sont ainsi divisés en 3 sous-ensembles: la population majoritaire (plus de 80-85% des monocytes), n'exprimant pas le CD16 (CD14 $^{++}$,CD16 $^{-}$), appelée monocytes « classiques »; est très phagocytaire et pro-inflammatoires se caractérisent par la production de cytokines telles que le TNF- α , IL-1 β (Belge *et al*, 2002), les monocytes « intermédiaires » CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ et les monocytes « non-classiques » CD14 $^{+}$ CD16 $^{++}$, représentant, respectivement, 4 à 5% et 7 à 10% des monocytes (Kapellos et al., 2019). Ces sous-types de monocytes expriment différemment des molécules d'adhésion et des récepteurs aux chimiokines impliqués dans l'adhésion et le recrutement de monocytes (Wong et al., 2011).

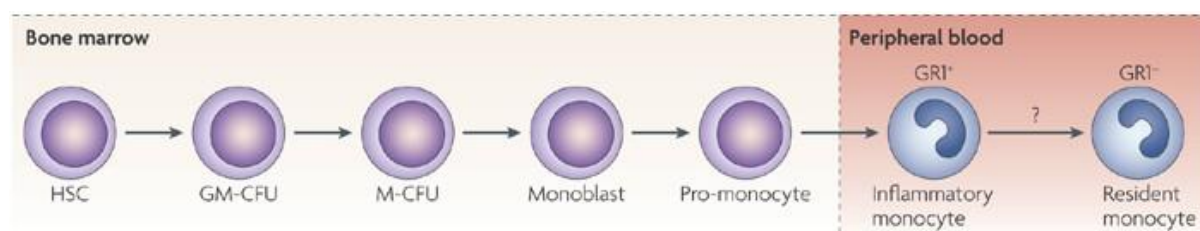


Figure 1.5. Origine des monocytes (Mosser et al, 2008)

1.5.1.2. Macrophages

Les M ϕ s sont des phagocytes mononucléaires qui sont largement distribués dans tout l'organisme (Sumiya et al., 2015). Les monocytes constituent la principale source de M ϕ s tissulaires nouvellement recrutés dans plusieurs maladies (Gordon and Martinez, 2010). Leur différenciation et leur activation dépendent de plusieurs facteurs tels que les facteurs de croissance et de différenciation spécifiques, leurs récepteurs, les voies de signalisation et les facteurs de transcription (Mosser and Edwards, 2008). Ces cellules se caractérisent par une plasticité importante (Wynn et al., 2013). Ils sont équipés d'une large gamme de récepteurs

Chapitre 1. Revue de la littérature

de reconnaissance des pathogènes qui les rendent efficaces à la phagocytose et induisent la production des cytokines inflammatoires (Geissmann et al., 2010).

De plus, ils ont une double fonction, dans la promotion et la régulation de l'inflammation et jouent un rôle d'intermédiaire entre les réponses immunitaires innée et adaptative pour maintenir l'homéostasie immunologique (Gordon and Martinez, 2010; Wynn et al., 2013) et contribuent au remodelage des tissus et à la cicatrisation des plaies (Zhang et al., 2008).

1.5.1.3. Origine et différenciation des Macrophages

Ils se développent principalement à partir des cellules souches hématopoïétiques *via* des progéniteurs de la moelle osseuse et des monocytes sanguins. Cependant, il a été récemment démontré que les principales populations de Mφs peuvent être dérivées de progéniteurs embryonnaires dans le sac vitellin (Fan et al., 2016; Sieweke and Allen, 2013) (Figure 1.6).

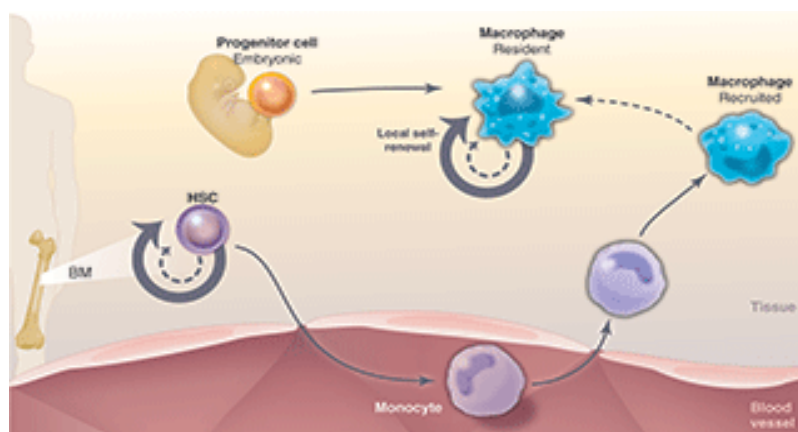


Figure 1.6. Origine du macrophage (Sieweke and Allen, 2013).

Les monocytes, provenant des tissus hématopoïétiques, pénètrent dans la circulation au terme d'une succession d'étapes de prolifération et de différenciation. Les monocytes quittent ensuite rapidement le pool circulant, pour se répartir dans les compartiments tissulaires. Dans une dernière étape de maturation, ils acquièrent, sur place les caractéristiques morphologiques, cytochimiques et fonctionnelles du Mφ. La maturation est un processus irréversible. Les Mφs tissulaires sont répartis aux points stratégiques de l'organisme, susceptibles d'être une porte d'entrée pour les micro-organismes. Les Mφs tissulaires ne regagnent pas la circulation générale, et semblent donc mourir sur place. Le renouvellement des Mφs tissulaires est assuré pour 95% par l'afflux de monocytes du sang périphérique, les 5% restant, résultent de la multiplication locale de Mφs fraîchement recrutés de la moelle osseuse dans les 24 heures précédentes. Ce turn-over est augmenté lors de réaction inflammatoire (van Dissel et al., 1987).

La répartition des Mφs tissulaires et leur dénomination sont répertoriées dans le tableau

Chapitre 1. Revue de la littérature

suivant.

Tableau 1.1. La répartition tissulaires des macrophages et leur dénomination
(Italiani and Boraschi, 2015).

Organe	Dénomination
Poumons	Macrophages alvéolaires
Séreuses	macrophages pleuraux,
rate	macrophages spléniques,
organes lymphoïdes	macrophages, cellules
reins	macrophages glomérulaires
foie	cellule de Kupffer
peau	cellules de Langerhans
système nerveux central	cellules de la microglie

1.5.1.4. Fonction

Bien que les M ϕ s dans les tissus acquièrent des phénotypes morphologiques et fonctionnels spécifiques selon le microenvironnement dans lequel ils résident, d'après Italiani and Boraschi, (2015), certaines de leurs fonctions sont les mêmes dans les tissus telles que :

- La surveillance qui maintient l'homéostasie tissulaire (reconnaissance et élimination des cellules apoptotiques et les cellules sénescents).
- La fonction protectrice et la régulation de l'inflammation (réaction à l'infection et aux lésions tissulaires en initiant, développant, résolvant une réponse inflammatoire).
- La détoxification de substances exogènes.
- La destruction de micro-organismes et de cellules tumorales.

1.5.2. Récepteurs et marqueurs membranaires des macrophages

Les M ϕ s sont des cellules extrêmement versatiles qui adoptent des phénotypes cellulaires distincts en réponse aux changements du microenvironnement. Cette diversité phénotypique est associée à l'expression de nombreux récepteurs et marqueurs membranaires reconnaissant des signaux qui ne se produisent pas dans les tissus sains (Juhas et al., 2015). Ces derniers contribuent dans la diversité fonctionnelle de ces cellules et facilitent la phagocytose, l'endocytose et la détection des molécules virales, bactériennes et parasitaires (Ocaña-Guzman et al., 2018). Les M ϕ s reçoivent des signaux de danger, envoyés par des substances étrangères, de cellules mortes ou mourantes et signaux liés à des agent pathogènes envahissant *via* les récepteurs de type PRR (*pattern recognition receptors*) y compris les TLRs (Toll-like receptors), les CLR, les récepteurs scavengers, les récepteurs de l'hélicase (RLR) de type gène 1 inductible par l'acide rétinolique (RIG1) et les NLR(NOD-Like receptors) (Nazimek and Bryniarski, 2012). De même, pour le CD14 (cluster of différenciation

Chapitre 1. Revue de la littérature

14) qui est décrit comme un antigène de différenciation et exprimé à la surface de nombreuses cellules de la lignée myéloïde comme les Mφs. Cette molécule serait un récepteur pour le LPS, composant de la paroi des bactéries Gram-négatives et est connue dans la clairance phagocytaire des cellules apoptotiques (Zamani et al., 2013). Le tableau ci-dessous récapitule la majorité des marqueurs membranaires du Mφ .

Tableau 1.2. Récepteurs et marqueurs membranaires du macrophage

Grassin-Delyle et al., 2020; Kozloski, 2019).

Récepteurs/marqueurs	Protéines
NOS2	Nitric oxyde synthase 2
Adgre1 / F4/80	adhesion G protein-coupled receptor E1
CCL22	C-C motif chemokine ligand 22
CD1A	CD1a
CD1C	CD1c
CD11B / ITGAM	integrin subunit alpha M
CD14	CD14
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1
CXCL10	C-X-C10 motif chemokine ligand 10
HLA-DRA	Major complex histocompatibility class II,DR alpha 1
HLA-DRB1	Major complex histocompatibility class II,DR beta1
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
TLR1	Toll like receptor 1
TLR2	Toll like receptor 2
TLR4	Toll like receptor 4
TLR5	Toll like receptor 5
TLR6	Toll like receptor 6

1.5.3. Activation des macrophages

Les nombreuses fonctions acquises par les Mφs résultent de l'activation de multiples voies de signalisation après que ces cellules ayant reçu de divers signaux de dangers (Langston et al., 2017) .

Bien que, les voies de signalisation puissent différer considérablement les unes des autres, elles déclenchent toutes une signalisation inflammatoire de base qui est essentielle pour l'inflammation aigue. L'activation des voies MAPKs (mitogen-activated protein kinase), NF-κB (nucleor factor -κB), et des IRF (inteferon regulatory Factor), mènent toutes à l'expression transitoire des chemokines, des cytokines et des médiateurs inflammatoire (Juhás et al., 2015).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.5.4. Polarisation des macrophages

Les M ϕ s sont une population hétérogène de différents sous-types cellulaires ayant des fonctions différentes parfois opposées. Ces derniers représentent une large gamme de cellules qui selon, le tissu et les signaux qu'ils reçoivent dans le microenvironnement dans l'homéostasie et la maladie, peuvent changer leur phénotype et leur propriété fonctionnelle (Horwood, 2016). Ainsi, la polarisation des M ϕ s est déterminée par les cytokines et autres médiateurs qu'ils rencontrent. Différents sous-types de M ϕ s exercent des rôles pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (Fan et al., 2016). Deux principaux phénotypes de M ϕ s ont été décrits, les M ϕ s activés classiquement (CAM ϕ s) et macrophages activés alternativement (AAM ϕ s) (Espinoza-Jiménez et al., 2012; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

1.5.4.1. Macrophages activés classiquement (CAM ϕ s) M1

Leurs activation est induite principalement par les cytokines de type Th1, essentiellement l'IFN- γ , ainsi qu'en réponse à des produits microbiens, tels que les LPS bactériens. Par ailleurs, ils jouent un rôle important dans la défense de l'hôte (Mosser and Edwards, 2008). Morphologiquement, ils sont caractérisés par la présence de nombreux récepteurs comme les TLRs (TLR-2, TLR-4), CD80, CD86, l'expression d'iNOS et phénotypes de surface du CMH de classe II. Ils libèrent diverses cytokines et chimiokines (par exemple, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL9 et CXCL10) qui exercent une rétroaction positive sur les M ϕ s non polarisés.

En termes moléculaires, la panoplie de gènes qui est déclenchée lors de l'activation des M1 est induite par une combinaison de facteurs de transcription. Ceux-ci incluent le transducteur de signal et l'activateur des molécules de transcription (STAT1), qui sont activées après la ligature des récepteurs IFN γ , et le facteur nucléaire κ B (NF κ B) et les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), qui sont activées à leur tour en réponse à la ligature des récepteurs TLR ou TNF. Autrement dit, ces facteurs attirent davantage de M ϕ s non polarisés vers l'état M1. Il a été démontré que des facteurs de transcription clés, tels que NF- κ B, STAT1, STAT5, IRF3 et IRF5, régulent l'expression des gènes M1 (Yao et al., 2019)(Figure 1.7).

1.5.4.2. Macrophages activés alternativement (AAM ϕ s) M2

La polarisation M2 se produit en réponse à des signaux de cytokines tels que (IL-4, IL-13, IL-10, IL-33 et TGF- β). Seules IL-4 et IL-13 induisent directement l'activation des M2, tandis que d'autres cytokines comme IL-33 amplifie l'activation de ces cellules en produisant des cytokines de type Th2. Ils peuvent, en outre, être identifiés par l'expression de marqueurs de surface, comme le récepteur du mannitol, CD206, CD163, CD209, *Fizz1* et *Ym1/2*. Il a été démontré que des facteurs de transcription clés, tels que STAT6, IRF4, JMJD3, PPAR δ et PPAR γ régulent l'expression des gènes M2. Jusqu'à présent, la voie STAT6 a été considérée

Chapitre 1. Revue de la littérature

comme la voie pour activer les M ϕ s M2 (Yao et al., 2019). De plus, les AAM ϕ produisent de l'urée, des polyamines et de la L-ornithine, en raison de la forte expression de l'enzyme arginase-1 (ARG-1), qui entre en compétition avec l'iNOS, pour son substrat commun, la L-arginin, réduisant ainsi les niveaux de sécrétion du NO. Ils sécrètent des niveaux modérés d'IL-10 et de TGF- β et niveaux faibles ou nuls des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les CAM ϕ s (Espinoza-Jiménez et al., 2012) (Figure 1.7).

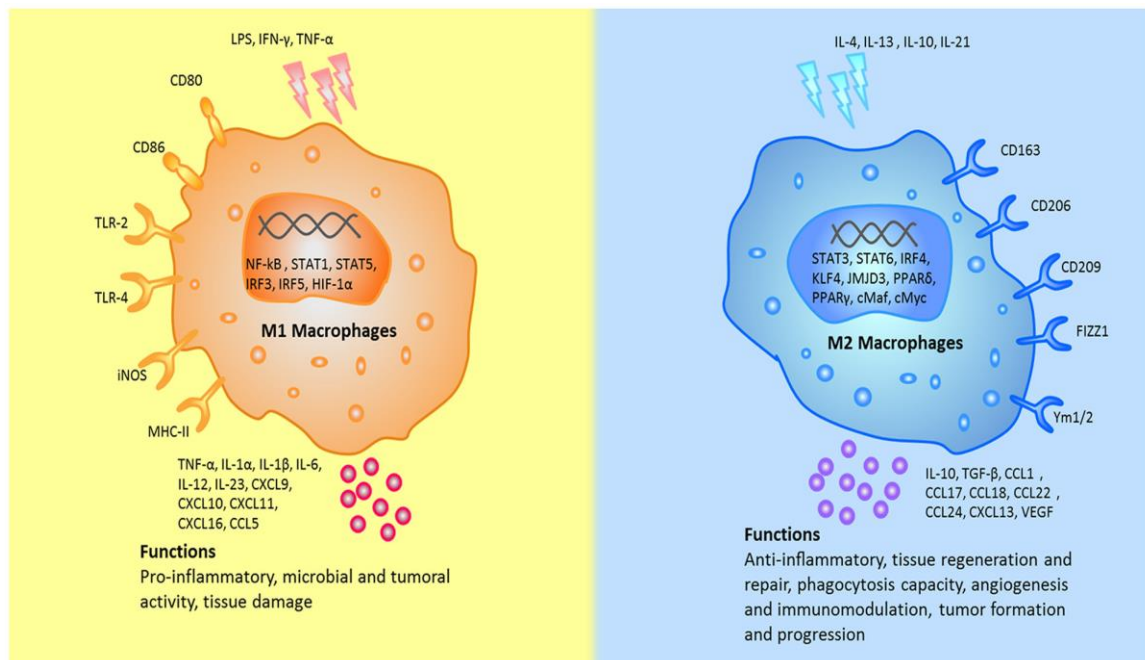


Figure 1.7. Différents stimuli, marqueurs de surface, cytokines sécrétées et fonctions biologiques entre les macrophages M1 et M2 (Yao et al., 2019).

1.5.5. Génération des macrophages M2

Il existe différents types de polarisation des M ϕ s M2 en réponse à des facteurs de stimulation, notamment les cytokines (IL-4, IL10 et IL13), les glucocorticoïdes, les complexes immuns (CI) et Le LPS et en fonction des signaux inducteurs (Wang et al., 2019). Cette classification distingue M2a, M2b, M2c et M2d. Ces M ϕ s diffèrent par leurs marqueurs de surface cellulaire, leurs cytokines sécrétées, et leurs fonctions biologiques (Yao et al., 2019), Figure 1.8.

1.5.6. Sous-types de macrophages M2

Les sous-types des M ϕ s M2 regroupent les M ϕ s M2a, M2b, M2c et M2d (Yao et al., 2019).

1.5.6.1. Les macrophages M2a

L'activation du M ϕ M2a est induite en réponse aux IL-4 et IL-13. Ces cellules entraînent une forte expression de l'IL-10, du TGF- β , CCL17, CCL18 et du CCL22, de plus, ils renforcent

Chapitre 1. Revue de la littérature

l'activité endocyttaire, favorisent la croissance cellulaire et la réparation tissulaire (Yao et al., 2019).

1.5.6.2. Les macrophages M2b

Pour la génération des Mφs M2b, deux signaux principaux doivent être requis. Le premier signal est induit par différentes molécules, telle que la fixation des complexes immuns, corps apoptotique ou de l'IL-1. Le second signal peut être fourni par la reconnaissance de récepteurs de type Toll (TLR). Ces Mφs libèrent des cytokines pro et anti-inflammatoires, comme TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-10. Ces cellules régulent l'étendue et la profondeur des réponses immunitaires et les réactions inflammatoires (Wang et al., 2019).

1.5.6.3. Les macrophages M2c

Les Mφs M2c, également appelés Mφs inactivés, sont induits par les glucocorticoïdes, IL-10 et TGF-β. Ces cellules sécrètent essentiellement IL-10, TGF-β, les chemokines CCL16 et CCL18 (Zizzo et al., 2012) qui jouent un rôle dans le recrutement des éosinophiles et les lymphocytes T naïfs (Mantovani et al., 2004). Ils sont impliqués dans la phagocytose des cellules apoptotiques (Yao et al., 2019).

1.5.6.4. Les macrophages M2d

Ils sont induits par les antagonistes des TLRs, les Mφs M2d sont essentiellement producteurs d'IL-10 et vascular endothelial growth factor (VEGF). Ces derniers favorisent l'angiogenèse et la progression tumorale (Ferrante et al., 2013). La figure ci-dessous résume les caractéristiques des sous-types des Mφs M2.

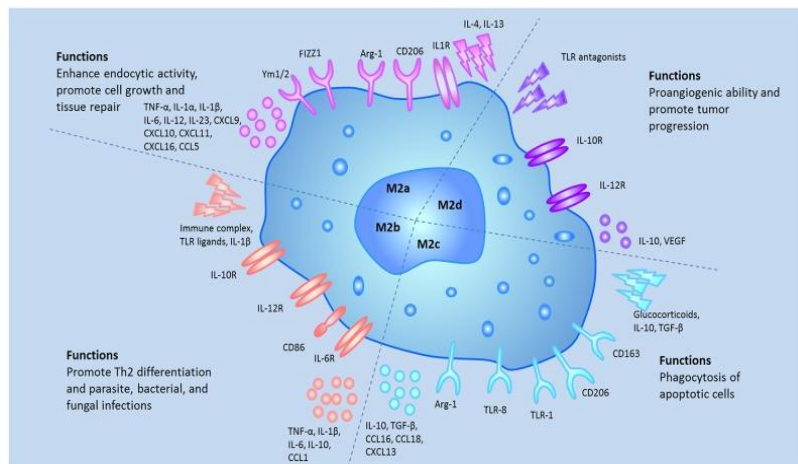


Figure 1.8. Caractéristiques des sous-types des macrophages M2 (Yao et al., 2019).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.5.7. Rôle dans l'immunité innée

1.5.7.1. Burst respiratoire

Le burst respiratoire, également appelé stress oxydatif est défini par une libération rapide des espèces réactives de l'oxygène à partir de différents types de cellules, y compris les cellules immunitaires comme les Mφs (Yang et al., 2016).

1.5.7.1.1. Monoxyde d'azote

Le NO est une biomolécule importante du système immunitaire qui joue un rôle dans la signalisation cellulaire et possède de nombreuses fonctions biologiques, notamment l'immuno-modulation, l'inflammation, l'élimination des microbes et des parasites ainsi que les cellules tumorales (Shreshtha et al., 2018). La synthèse du NO est catalysée par un groupe d'enzyme appelé la NO synthase (NOS), par une succession de réaction redox, par conversion de la L-arginine en NO et L-citrulline *via* le métabolite intermédiaire n-hydroxy-L-arginine (NOHA), en présence de l'oxygène moléculaire (O_2) et NADPH (nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate), Il existe trois isoformes de NOS : deux NOS constitutives, la NOS neuronale (nNOS) et la NOS endothéliale et une NOS inductible, figure 1.9 (Palmieri et al., 2020).

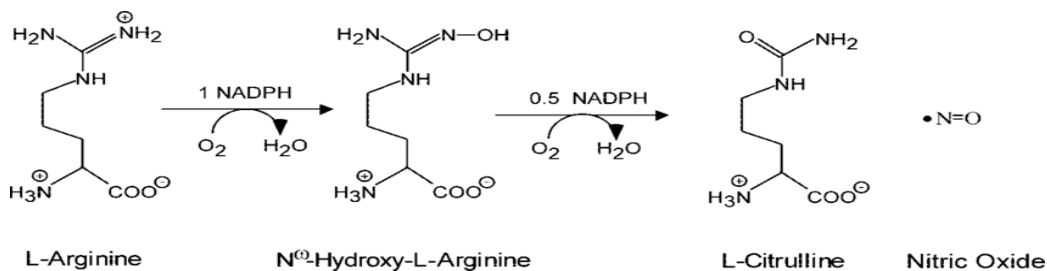


Figure 1.9. Réaction chimique de synthèse du NO par NOS (Wei et al., 2003).

1.5.7.1.2. Peroxyde d'hydrogène

Les ROS incluent les radicaux libres de l'oxygène dont le H_2O_2 qui est un composant principal de ces derniers. Il participe dans plusieurs processus comme la régulation de l'environnement immunitaire dans l'organisme, l'action bactéricide des cellules phagocytaires du système immunitaire inné et agit comme second messager (Nakao et al., 2008).

Le H_2O_2 intracellulaire est capable de déclencher les voies de signalisation qui contrôlent l'expression inductible des gènes régulant les fonctions effectrices des Mφs et la signalisation des cytokines (Rhee, 1999), induisant, ainsi, la production de cytokines pro-inflammatoires (Thannickal and Fanburg, 2000). Il est généré dans les conditions métaboliques normales par la respiration cellulaire (Nakao et al., 2008).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.5.7.1.3. Arginase

L'arginase est une enzyme qui catalyse l'arginine en urée et ornithine. Elle existe sous deux isoformes :

- L'arginase I (ARG-I) qui est exprimée presque exclusivement par les cellules hépatique, où elle joue un rôle essentiel dans la biogénèse de l'urée (Ash, 2004).

- L'arginase II (ARG-II) est une enzyme mitochondriale exprimée par les tissus non-hépatiques et les cellules immunitaires notamment les Mφs (Yang and Ming, 2014).

L'expression de l'arginase dans les Mφs est liée à leurs fonctions phénotypiques. Elle est associée aux Mφs M2, en réponses à des différents stimuli tels que l'IL-4 ou l'IL-13. Elle contribue dans la résolution de l'inflammation, la réparation des tissus et la prolifération cellulaire par conversion de l'arginine en ornithine qui joue un rôle important dans la synthèse de polyamine et proline (Rath et al., 2014a).

1.5.8. Balance arginase/iNOS

Les enzymes iNOS et ARG-I sont respectivement associées à la polarisation M1 et M2 des Mφs. Elles sont impliquées dans le métabolisme d'un substrat commun qui est l-arginine, dans deux voies opposées (Yang and Ming, 2014). L'expression de l'arginase par les Mφs M2 est inhibée par NOHA produit au cours de la synthèse du NO *via* l'iNOS (Rath et al., 2014b). Par ailleurs, l'expression de l'ARG-I par les Mφs M2 limite la biodisponibilité de l-arginine, inhibant ainsi la production du NO (Yang and Ming, 2014). Figure 1.10.

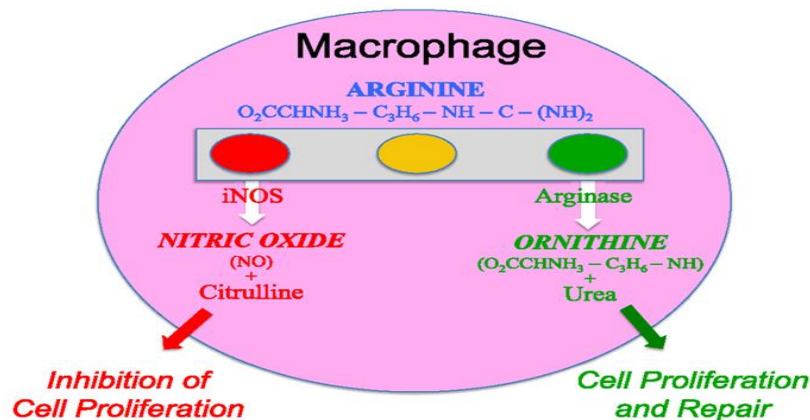


Figure 1.10. Présence des enzymes iNOS et arginase dans le macrophage et régulation opposée (Mills, 2015).

1.5.9. Molécules sécrétées par le macrophage

Les Mφs ont la capacité de sécréter une large gamme de médiateurs solubles qui influencent le développement et l'ampleur de la réponse immune comme les cytokines, les chemokines et autres médiateurs inflammatoires (Murray and Stow, 2014).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.5.9.1. Cytokines et facteurs de croissance

Les cytokines sont de petites protéines, de faible poids moléculaire, qui interviennent dans la communication intercellulaire. La liaison de chaque cytokine à son récepteur à la surface des cellules, engendre une cascade de signalisation qui affecte la fonction cellulaire (Arango Duque and Descoteaux, 2014).

En réponse à différents stimuli, les M ϕ s sécrètent un grand nombre de cytokines (INF- α , INF- γ , TNF- α , IL-1, IL1ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) (Cavaillon, 1990).

L'activation des PRRs se fait par un contact ou une reconnaissance d'un agent pathogène ou un signal de danger, les M ϕ s dits (M1) produisent des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 (IL-1 α , IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-12, IFN (IFN- α , IFN- β) et TNF (Martinez and Gordon, 2014). IL-1 β assure de nombreuses fonctions y compris l'augmentation de l'expansion et la différenciation des lymphocyte TCD4+ (Ben-Sasson et al., 2009).

A l'inverse, les M ϕ s dits (M2) se caractérisent par la libération des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) (Martinez and Gordon, 2014). IL-10 a pour rôle principal l'inhibition de l'activation des M ϕ s et la production des cytokine pro-inflammatoires (Fiorentino et al., 1991), il bloque, aussi, l'expression de la molécule de CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité- II) dans les M ϕ s activés, inhibant ainsi la présentation antigéniques (Chadban et al., 1998).

En fin, les M ϕ s produisent de nombreux facteurs de croissance comme GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) et M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Ils jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie, la régulation, la prolifération et le développement des cellules (Ushach and Zlotnik, 2016).

1.5.9.2. Chemokines et eicosanoïdes

Les chemokines ou chémiokines sont une famille particulière de cytokines liant l'héparine, de faible poids moléculaire. Elles jouent un rôle crucial dans les mécanismes de chimiotactisme, d'activation des leucocytes et la différenciation cellulaire. Ces molécules sont impliquées, à la fois, dans l'immunité innée et adaptative (Comerford and McColl, 2011). Elles ont deux résidus cystéines conservés, qui en fonction de leur positionnement, ont permis de classer les chemokines en quatre sous-familles: les chemokines C (cystéine), CC (cystéine-cystéine) CXC (cystéine-acide aminé quelconque-cystéine), CX3C (cystéine-trois acide aminés quelconques-cystéine). Ces molécules opèrent par les ACKRs (atypique chemokine receptor) et pour lesquels ont une forte affinité, il s'agit d'un sous-groupe de sept récepteurs transmembranaires couplés aux protéines GPCRs (G protein-coupled receptors) connu sous les noms XCR, CCR, CXCR et CX3CR (Ruytinx et al., 2018).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les Mφs synthétisent aussi des prostaglandines et des leucotriènes appartenant aux eicosanoïdes et dérivent de l'acide arachidonique *via* les voies COX (cyclooxygenase) et LOX (5-lipoxygenase). Elles ont une fonction essentielle dans l'initiation de l'inflammation aigue (Werz et al., 2018).

1.5.10. Phagocytose et action microbicide

La phagocytose est un mécanisme d'action fondamentale de certaines cellules de l'immunité innée appelées phagocytes tel que le Mφ. Ce mécanisme participe dans l'élimination des pathogènes, des cellules apoptotiques, tumorales et les débris. Il est crucial pour le maintien de l'homéostasie, la réparation et le remodelage tissulaire lors du développement (Hirayama et al., 2017). Ce processus est initié par l'interaction des molécules de surface des microorganismes et les récepteurs cellulaires spécifiques (PRR, FcR) localisés sur la membrane du phagocyte (Karavitis and Kovacs, 2011).

Lors de la liaison à un antigène, les récepteurs déclenchent des voies de signalisation conduisant au remodelage du cytosquelette d'actine et les lipides membranaires, ce qui entraîne la formation d'une invagination de la membrane plasmique (Uribe-Querol and Rosales, 2020). Ensuite, la membrane se ferme par exocytose pour former un phagosome. L'exocytose nécessite la fusion avec plusieurs vésicules provenant d'organites cellulaires (endosomes et réticulum endoplasmique) (Desjardins, 2003). Le phagosome précoce subit des événements séquentiels de fusion et de fission avec des vésicules endocytaires pour créer un phagosome tardif qui fusionne, en suite, avec les lysosomes et devient phagolysosome. La transformation du phagosome en phagolysosome antimicrobien, est connue sous le nom de la maturation du phagosome.

La maturation du phagosome en phagolysosome est nécessaire pour créer un environnement microbicide, obtenu par acidification progressive, production et libération de nombreuses molécules telles les protéases et les hydrolases qui vont promouvoir la dégradation des antigènes. La dernière étape de la phagocytose est l'apprêtement des fragments peptidiques antigéniques pour la présentation des antigènes à la surface des cellules phagocytaires (Touret and Grinstein, 2006).

1.5.11. Rôle des macrophages dans l'immunité adaptative

En plus de leurs fonction d'éliminer les agents pathogènes, les Mφs jouent un rôle majeur dans la communication entre l'immunité innée et l'immunité adaptative par la présentation antigénique nécessaire pour l'activation des lymphocytes T et B.

1.5.12. Rôle pathogène du macrophage dans le diabète de type 1

Bien que de nombreuses études sur les humains et les souris soulignent un rôle prédominant des lymphocytes T diabétogènes dans la pathogenèse du DT1. Il a été suggéré

Chapitre 1. Revue de la littérature

que les Mφs peuvent jouer un rôle pathogène dans la maladie. Quand ces derniers s'infiltrent dans le pancréas, exercent des effets délétères sur les cellules β causant leur destruction par la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-1β ; ainsi que les ROS tels que NO et le H₂O₂ (Diana et al., 2011; Lehuen et al., 2010; Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 1998). La production de l'IL-12 par les Mφs peut promouvoir la différenciation des lymphocytes TCD8+ cytotoxiques diabétogènes (CTL) menant à l'initiation du DT1.

Par ailleurs, le recrutement des Mφs dans le pancréas est médiée par CC-CHEMOKINE LIGAND 1 (CCL1) et les CCL2 produites par lymphocytes TCD4+ et les cellules β respectivement (Lehuen et al., 2010). L'inhibition de l'infiltration des Mφs dans le pancréas, en bloquant un récepteur favorisant l'adhésion sur cette cellule, ou leur déplétion, empêche le développement du DT1 (Diana et al., 2011).

1.6. Sélénium et macrophages

1.6.1. Historique

Le sélénium fut découvert par le chimiste suédois Berzelius en 1817, il a été considérée comme toxique pour l'Homme pendant 150 ans jusqu'en 1957, où des études menées par Klaus Schwartz et Calvin Folts révèlent les bienfaits de ce dernier et qu'il protège les rats contre la nécrose du foie. Depuis lors, le rôle du sélénium en tant que oligo-élément primordial dans la santé humaine et les mécanismes par lesquels il exerce ses effets biologiques sont élucidés (Avery and Hoffmann, 2018).

1.6.2. Propriétés physico-chimiques de sélénium

Le sélénium est un métalloïde de numéro atomique 34 et de masse atomique de 78.96, il appartient au groupe VIA de la classification périodique, avec le soufre et le tellure (Johansson et al., 2005). Le tableau ci-dessous récapitule les caractéristiques physico-chimiques de cet élément.

Tableau 1.3. Caractéristiques physico-chimiques du Sélénium

(Kieliszek, 2019).

Numéro atomique	34
Masse atomique	78.96
Degré d'oxydation	-2 (Séléniure)
Point de fusion	217°C
Point d'ébullition	685°C
Masse volumique	4.79g/cm ³

1.6.3. Rôle antioxydant

Le sélénium est un oligo-élément qui intervient dans les cellules et agit comme un antioxydant *via* son incorporation dans les selenoproteins tels que la glutathion peroxydase

Chapitre 1. Revue de la littérature

(GPx), thioredoxin réductase (TrxR) et iodothyronine deionodine (IDD). Cet effet antioxydant est capital pour la protection contre les radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire. Ainsi cette protection serait responsable de ses propriétés anti-cancéreuses (Tinggi, 2008).

1.6.4. Aliments riches en sélénium

Le sélénium est un élément trace essentiel présent dans différents aliments, incluant les céréales, les grains, les légumes, la viande et les produits laitiers ainsi que les poissons et les crustacés. L'alimentation constitue la principale source de cet élément (Okoko, 2018). Il existe dans les aliments sous deux formes organique et inorganique (Broadley et al., 2006; Lobinski et al., 2000). Ces deux formes affectent sa biodisponibilité. En général, les formes organiques, telles que sélénométhionine, sont plus bio-disponibles que les sélénites et les sélénates inorganiques (Radomska et al., 2021).

1.6.5. Métabolisme du sélénium

Le sélénium inorganique est utilisé pour la supplémentation en sélénium. Les deux formes couramment utilisées, sélénite et sélénate, ont des propriétés métaboliques légèrement différentes. Une fois absorbé, le sélénate est réduit en sélénite avant de pouvoir être métabolisé. Par ailleurs, le sélénite est réduit en séléniure par TrxR ou par réaction avec le glutathion. Ainsi, le sélénium sous forme de sélénite devrait être réduit dans les cellules de la muqueuse intestinale. Les protéines qui se lient au sélénium administré sous forme de sélénite sont appelées « Selenium binding proteins ». Figure 1.11.

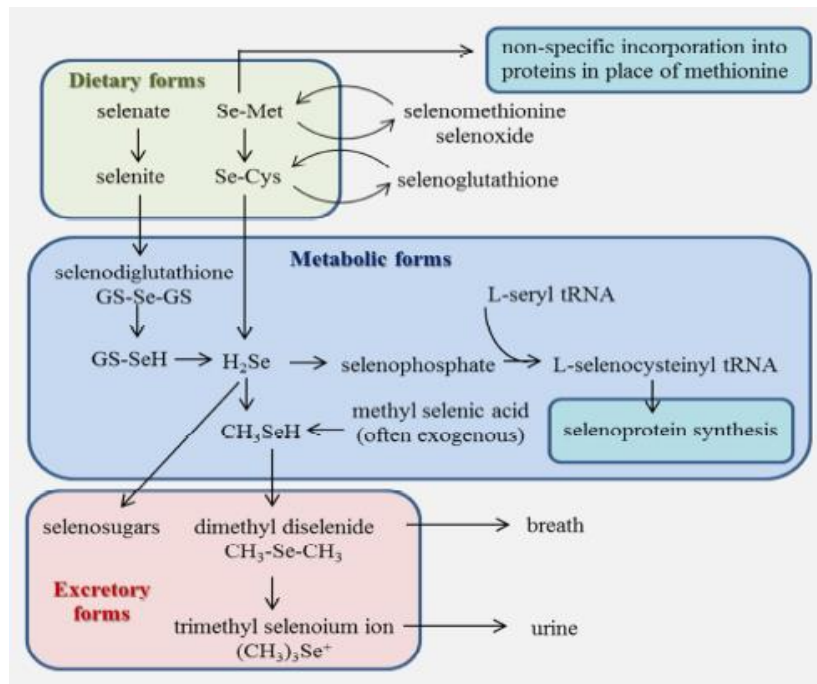


Figure 1.11. Métabolisme de différentes formes du sélénium (Skalickova et al., 2017).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.7.Rôles biologiques du sélénium

Le sélénium est un élément trace qui sa consommation à des niveaux adéquats, assure des fonctions biologiques optimales de l'organisme notamment le système nerveux central, la reproduction masculine, le système endocrinien, la fonction musculaire, le système cardiovasculaire, et l'immunité (Rayman, 2012; Roman et al., 2014).

1.8.Effets du sélénium

1.8.1.Effet du sélénium sur l'immunité

La déficience en sélénium est associée à un dysfonctionnement immunitaire, à une résistance réduite aux infections microbiennes et virales, à une phagocytose et une production d'anticorps inadéquates ainsi qu'à risque accru de cancer (Youn et al., 2008). Dans le cas contraire, la supplémentation en sélénium peut être associée à de nombreux mécanismes tels l'augmentation de l'activité des cellules Natural killer (NK), la prolifération des lymphocytes T, la production d'INF- γ , l'augmentation de l'expression des récepteurs de haute affinité d'IL-2 et le nombre de lymphocytes B producteurs d'anticorps (Hatfield et al., 2006; McKenzie et al., 2006).

1.8.2.Effet du sélénium sur l'activation des macrophages

Le sélénium autant que micronutriment est nécessaire pour réguler les réponses immunes en particulier, celles des M ϕ s, en agissant à plusieurs niveaux de signalisation, il est inclus dans la production et la libération des cytokines pro-inflammatoires et les radicaux libres.

Il inhibe l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et supprime l'expression des gènes inflammatoires à l'instar de COX2, iNOS et le TNF- α . De ce fait, le sélénium permet la polarisation des M ϕ s vers un phénotype anti-inflammatoire alternativement activés M2 (Narayan et al., 2015; Youn et al., 2008).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.9.Problématique et objectifs

1.9.1.Problématique

Le DT1 est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction sélective des cellules β de Langerhans. Cependant, le sélénium joue un rôle essentiel pour optimiser la réponse immune au cours de cette maladie.

A cet égard, nous essayons, dans ce travail, de déterminer ses effets sur l'activité des M ϕ s au cours du DT1.

1.9.2. Objectifs

Evaluer en *ex vivo*, l'effet du sélénium sur les M ϕ s au cours de la maladie.

1.9.3. But

Montrer l'effet du sélénium à la fois sur la modulation de l'activité des M ϕ s, la diminution de sa production des molécules inflammatoires impliquées dans le développement de la maladie et sa capacité d'induire une polarisation des M ϕ s vers un état alternativement activé.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

2.1. Matériel et méthodes

2.2. Résultats

2.3. Discussion

2.4. Conclusion

Cette étude a fait l'objet d'une publication internationale au près d'un journal d'un comité de lecture international.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

Bureau editorial:

https://www.eurekaselect.com/journal/59/editorial-board?fbclid=IwAR2Qla_K0kjJcEX0tEq3ZilZiJ6PZQJcZLeyA1ct1luu9qNqSIAGJf20eE0

Editeur en chef :

Emilio Jirillo , Italy.

Abstracting and indexing

1. PubMed

2. MEDLINE®

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets, XXXX, XX, 1-13

1

RESEARCH ARTICLE

Sodium Selenite Modulates Global Activation of Proinflammatory M1-like Macrophages, Necroinflammation and M1-like/M2-like Dichotomy at the Onset of Human Type 1 Diabetes

Mouna Nouar¹, Maroua Miliani¹, Imène Belhassena¹, Ahlam Fatmi¹ and Mourad Aribi^{1*}

¹Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria

Abstract: *Aim:* The study aims to show that sodium selenite (Ss) would have an immunomodulatory effect on the functional activity of proinflammatory macrophages (Mφs) during their extended extracellular activation at the onset of human type 1 diabetes (T1D).

Background: Exacerbated activation of proinflammatory “M1” macrophages (Mφs) can promote chronic local pancreatic islet inflammation and T1D development.

Objective: We investigated the *ex vivo* effects of Ss on the immune modulation of global/extended activation of human proinflammatory M1-like Mφs.

Methods: Experiments were carried out on primary monocytes-derived Mφs (MDMs).

Results: The levels of IL-1β, TNF-α, H₂O₂ and intracellular free calcium ions (μCa^{2+}), and the ratios of IL-1β-to-IL-10 and TNF-α-to-IL-10 were markedly increased in T1D Mφs than in healthy control Mφs. Conversely, both IL-10 production and arginase 1 (ARG1) activity were downregulated in T1D Mφs. Additionally, Ss treatment induced a marked downregulation of respiratory burst, μCa^{2+} levels, M1-like Mφ-associated inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) activity, cell necrosis and related necroinflammation biomarkers, including IL-1β and TNF-α, CD14 expression, and the ratios of iNOS-to-ARG1, IL-1β-to-IL-10, and TNF-α-to-IL-10. Moreover, Ss upregulated anti-inflammatory “M2-like” Mφ activities as demonstrated by ARG1 activity and IL-10 production, as well

ARTICLE HISTORY

Received: April 07, 2022
Revised: November 28, 2022
Accepted: December 07, 2022

DOI:
[10.2174/1871530323066230201135916](https://doi.org/10.2174/1871530323066230201135916)

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Modèles de cellules *ex vivo* et expériences indépendantes

Les Mφs ont été générés à partir de monocytes, collectés auprès de patient volontaires atteints de DT1 ou de donneurs de sang sains. Les échantillons cellulaires ont été divisés en quatre groupes comprenant des Mφs de témoins sains (CoMφ) et des Mφs de diabétique de type 1 (DT1Mφ), traités (Ss+) ou pas (Ss, contrôle critique) avec du sélénium sous la forme de sélénite de sodium (Ss).

Les expériences ont été réalisées sur des surnageants, des lysats cellulaires ou sur des cellules entières. Le burst respiratoire (production du NO et H₂O₂) et les niveaux de nécrose cellulaire, IL-1β, TNF-α et de l'IL-10 ont été mesurés dans des surnageants, tandis que les lysats ont été utilisés pour mesurer l'activité de l'ARG1 et les niveaux de Ca^{2+} . La phagocytose et la capacité bactéricide des pathogènes ont été effectuées en présence d'une souche bactérienne de référence. L'activité iNOS a été déterminée sur la base de la production de NO et des protéines totales. Les niveaux d'expression de CD14 ont été évalués par immunofluorescence directe sur des cellules entières, à l'aide de Fluid cell imaging station. Toutes les expériences ont été répétées indépendamment au moins quatre fois. La conception de l'étude est résumée sur la figure 2.1.

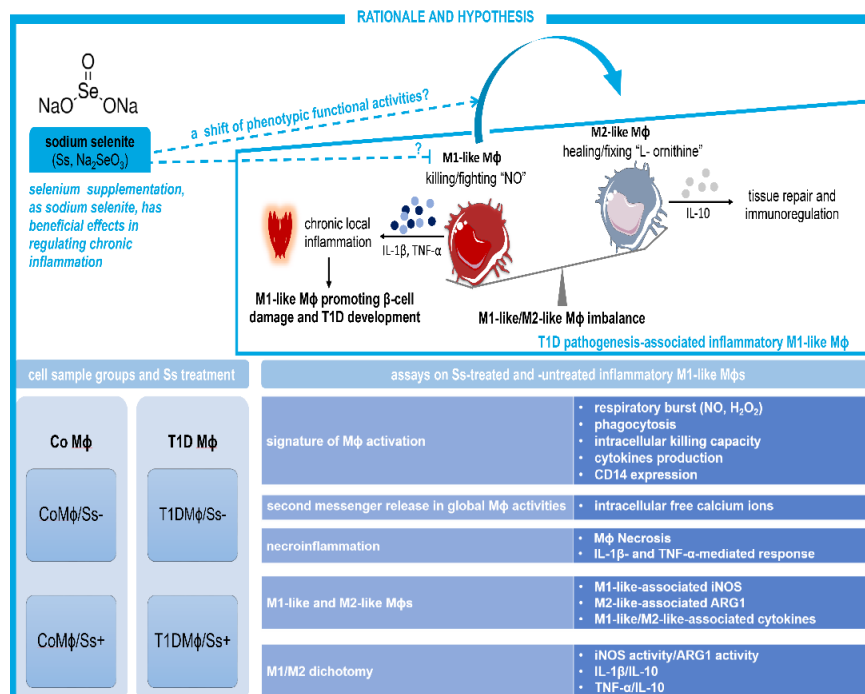


Figure 12.1. Organigramme de l'étude.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

2.1.2. Critères d'éligibilité pour la collecte d'échantillons de cellules primaires et déclaration d'éthique

Dans cette étude mécanistique *ex vivo*, la collecte d'échantillons de cellules primaires a été réalisée à partir de diabétiques de type 1 nouvellement diagnostiqués et de volontaires témoins sains appariés selon l'âge et le sexe. Patients et témoins (âgés ≤ 20 ans dans chaque groupe), appartiennent à la même localité géographique (région du Nord-Ouest algérien, Tlemcen). Les principaux critères d'exclusion étaient l'infection, l'inflammation, l'association avec d'autres maladies auto-immunes et tous les facteurs pouvant interférer avec le processus inflammatoire.

A l'inverse, les critères d'inclusion étaient principalement le consentement éclairé et écrit, les patients adolescents ou jeunes atteints de DT1 récent (durée du diabète < 18 mois). La durée du diabète était de $13,25 \pm$ (erreur standard de la moyenne) $0,0$ mois. L'indice de masse corporelle (IMC) était de $20,86 \pm 0,12$ (erreur standard de la moyenne). Tous les donneurs ou parents au nom de leur enfant ont fourni un consentement écrit éclairé. L'Institutional Review Board/Scientific Council local a approuvé l'étude actuelle (numéro d'enregistrement DBL NM014).

2.2. Préparation et traitement des échantillons cellulaires

2.2.1. Isolement et purification des monocytes

Les monocytes ont été isolés des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) par la méthode d'adhérence au plastique différentielle (Wahl et al., 2005) . En bref, les PBMC ont été isolés à partir du sang veineux frais prélevé dans des tubes contenant de l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) (BD, Belliver Industrial Estate, Royaume-Uni) par centrifugation en gradient de densité de Ficoll-Histopaque (Ficoll-Histopaque 1077 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)(Selvaraj et al., 2009) , et la viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion du bleu trypan (TBET) (Fedoroff and Richardson, 2001). Les PBMC ont ensuite été transférés dans une plaque de culture à 24 puits (Salles et al., 2014; Selvaraj et al., 2009) contenant du milieu RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, États-Unis), 2 mM de L-glutamine, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamycine et 10 % de sérum autologue, et incubé pendant 2h à 37°C et 5% de CO₂ avec une atmosphère humide (Salles et al., 2014) pour permettre l'adhérence des monocytes. Les cellules non adhérentes ont été éliminées. La pureté des monocytes était supérieure à 90 %, déterminée par coloration fluorescente avec PhycoErytherin (PE)-anticorps anti-CD14 humain (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) à l'aide de la Fluid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, MA USA) (Dahmani et al., 2020), après comptage de cellules par TBET au microscope (Zeiss, Allemagne).

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

2.2.2. Génération des Mφs M1-(classique-) like pro-inflammatoire, extension du spectre d'activation inflammatoire induite par le ligand TLR et traitement par le Ss

Pour générer des Mφs pro-inflammatoires de type M1, un nombre de 2×10^5 de monocytes ont été mis en culture dans le milieu RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, États-Unis) contenant 2 mM de L-glutamine, 50 µg/mL de gentamycine, 10 % de sérum autologue (Selvaraj et al., 2009), avec une concentration égale de granulocyte-macrophage colony-stimulating factor et d'interféron-gamma (Buchacher et al., 2015; Krausgruber et al., 2011; Shiomi et al., 2016), puis incubé pendant 48 h à 37°C et 5% de CO₂ en atmosphère humide. Pour un spectre d'activation inflammatoire extracellulaire étendu, les Mφs ont été exposés à 5 µg/mL de PHA-L (PHA-L-Calbiochem) (Keshewani and Sodhi, 2007; Ysmail-Dahlouk et al., 2016) et incubée pendant 48 h à 37°C et 5 % de CO₂ en atmosphère humide. Enfin, ils ont été traités avec 30 nmol/L de Ss (Na₂SeO₃) (Aribi et al., 2015) pendant 48 h.

2.3. Lyse de macrophage

Pour déterminer les niveaux de protéines, l'activité Ca^{2+} et d'ARG1, les Mφs ont été lysés pendant 30 min avec 500 µL de Triton X 100 à 0,1 % (TX100). La réaction a été stoppée par l'ajout d'un mélange contenant du Tris-HCL et du MnCl₂ (Miliani et al., 2018).

2.4. Dosage des protéines totales

Les concentrations totales de protéines ont été mesurées par spectrophotométrie, après formation d'un complexe coloré quantifiable, à 540 nm à l'aide d'un kit commercial (Thermo Fisher Scientific Inc., Middletown, USA) (Belhassena et al., 2020).

2.5. Burst respiratoire

Le burst respiratoire (ou burst oxydatif) a été effectué par la détermination des niveaux de production de NO et de H₂O₂.

2.5.1. Mesure de NO

Le taux de production de NO a été évalué au niveau des surnageants de culture en mesurant l'accumulation de métabolites oxydatifs stables (NO_x, nitrite et nitrate), par la réaction colorimétrique de Griess, en utilisant l'acide trichloroacétique (TCA), le chlorure vanadium (III) et le réactif de Griess, comme décrit (Aribi, 2018). L'absorbance a été mesurée à 540 nm sur le lecteur de plaque ELISA (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). La quantité de nitrite dans l'échantillon a été obtenue par référence à une courbe standard construite en utilisant du nitrite de sodium.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

2.5.2. Mesure de H₂O₂

H₂O₂ a été évalué par la méthode adaptée de Pick et Keisari, modifiée ultérieurement par (Aribi, 2018). Cette méthode est basée sur l'oxydation du rouge phénol par l'H₂O₂ via la peroxydase.

Une solution tampon de rouge de phénol (PRS), qui contient un tampon de PAB pour *peroxydase buffer assay* (5,0 mM K₂HPO₄, 1,0 mM K₂HPO₄, 140 mM NaCl, glucose 0,5mM ajusté à pH =7,4), 0,28 mM (0,1g/L), du rouge de phénol (phénolsulfonphthaléine) et 8,5 U/L (50 mg/mL) de peroxydase de raifort (HRPO, EC 1.11.1.7). La solution PRS a été préparée immédiatement avant le dosage, en ajoutant du rouge de phénol et du HRPO à 2,1 mL à la solution PAB à une concentration finale de 0,46 mM et 0,046 U/mL, respectivement. Ensuite, le surnageant a été ajouté au mélange préparé dans un ratio de 1 à 4, puis incubé pendant 30 min à 37°C. Pour la réaction, on ajoute 10 ml de NaOH 1 N (Aribi, 2018; Benghalem et al., 2017; Pick and Keisari, 1980). Les niveaux de H₂O₂ ont été mesurés par spectrophotométrie à 610 nm contre un blanc contenant du PRS tamponné et du NaOH aux concentrations appropriées. Une courbe standard a été préparée en utilisant des dilutions de 30% H₂O₂.

2.6. Test de phagocytose et destruction bactéricide (pathogen killing)

La phagocytose est la capacité bactéricide des agents pathogènes ont été réalisées en utilisant un mélange d'un nombre de 2×10^5 de M ϕ s et de souches de *S. aureus* (American Type Culture Collection [ATCC] 6538) à une multiplicité d'infection (MOI) de 50 dans une plaque de 24 puits, comme décrit précédemment (Aribi, 2018; Benghalem et al., 2017; Nouari et al., 2016). Les résultats de la phagocytose ont été déterminés en utilisant le pourcentage de diminution du nombre de bactéries extracellulaires viables. Le pourcentage de la capacité bactéricide a été calculé après le test de viabilité de M ϕ après infection à l'aide de Blue de Trypan.

2.7. Dosage des activités M1-like_(iNOS) et M2-like_(ARG1)

L'activité iNOS (EC 1.14.13.39) a été obtenue en normalisant chaque concentration de NO en milligrammes de protéines par puit et exprimée en pmol par mg de protéines par 30 min. L'activité ARG1 (ARG1, EC 3.5.3.1) a été mesurée dans des lysats cellulaires. Le dosage a été réalisé en utilisant une technique spectrophotométrique basée sur la détermination de la production d'urée comme décrit (Corraliza et al., 1994). L'activité ARG1 a été exprimée en nmol d'urée par mg de protéines par 1h.

2.8. Mesure de nécroinflammation

La nécroinflammation a été évaluée en mesurant la nécrose de M ϕ s et la production de cytokines pro-inflammatoires de type M1 IL-1 β et TNF- α par les M ϕ s non-nécrotiques

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

restants. La production d'IL-10 a été mesurée en tant que cytokine régulatrice/anti-inflammatoire de type M2 (Murray and Wynn, 2011).

2.8.1. Nécrose

La nécrose a été évaluée par spectrophotométrie sur lecteur ELISA à 490 nm au niveau du surnageant de la culture cellulaire par la méthode de cytotoxicité basée sur le lactate déshydrogénase (LDH) [48] en utilisant un kit commercial sensible (LDH Colorimetric Assay Kit, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA), selon les instructions du fabricant. Les quantités relatives de libération de LDH du cytosol des cellules endommagées dans le surnageant ont été exprimées en pourcentage (Dahou et al., 2021).

2.8.2. Mφs non-nécrotiques restants

Les Mφs non nécrotiques (nonNecrM) restant à la fin de chaque expérience parmi l'ensemble des cellules viables productrices de cytokines en réponse aux stimuli pro-inflammatoires et aux débris nécrotiques de Mφ, leur nombre a été estimé par rapport au nombre total de Mφ viables comme suit :

$$\text{Remaining nonNecrM} = \frac{\text{NVM} \times (100 - \% \text{Necrosis})}{100}$$

NVM est le nombre de Mφs viables à la fin de chaque expérience. Le pourcentage de nonNecrM = 100 - %Nécrose.

2.8.3. Dosage des cytokines

Les concentrations de cytokines ont été quantifiées dans le surnageant de culture par la méthode sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Les niveaux d'IL-1β et d'IL-10 ont été mesurés par des kits ELISA commerciaux respectifs (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Les niveaux de TNF-α ont été déterminés en utilisant un kit ELISA (BD OptEIA, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA). Les densités optiques (DO) ont été mesurées à 450 nm avec un lecteur de plaque ELISA (BiochromAnthos 2020, Cambridge, UK). Les limites de détection (LOD) étaient de 0,3 pg/mL pour l'IL-1β, 1 pg/mL pour le TNF-α et l'IL-10

2.9. Mesure du calcium intracellulaire libre

La détermination des niveaux d' Ca^{2+} a été effectuée en utilisant la méthode de l'ortho-crésol-phtaléine complexone (OCP) (Benghalem et al., 2017), qui s'appuie sur la réaction du Ca^{2+} avec l'OCP formant un complexe chromogénique, il a été mesuré par spectrophotométrie à 560 nm contre un blanc. Les taux d' Ca^{2+} ont été exprimés en µg par mg de protéines.

2.10. Test d'immunofluorescence

Le taux d'expression de CD14 membranaire par les Mφs a été déterminé par immunofluorescence directe. Un nombre de 2×10^5 de Mφs a été mis en culture dans des

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

chamber slide pendant 24h. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été lavées 2 fois avec 200 μ L du PBS puis fixées avec 100 μ L de solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 minutes à température ambiante et ensuite bloquées avec du PBS contenant du SVF pendant une heure. Les anticorps de souris anti-CD14 humain couplé au PE (BD,Pharmingen) dilué à un ratio de 1 :750 ont été ajoutés à une solution de blocage à un volume de 200 μ L (Belhassena et al., 2020). La fluorescence a été visualisée et évaluée en utilisant le microscope *Fluorimaging station* et l'intensité de la fluorescence a été calculée par le logiciel ImageJ (the National Institutes of Health, Bethesda MD, USA) (Jackson and Krasnodembskaya, 2017; Schneider et al., 2012).

2.11. Analyses statistiques des données

Les données ont été présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Des analyses statistiques ont été effectuées par des tests non-paramétriques, Mann-Whitney *U*, pour deux groupes, ou des tests d'analyse de variance à une voie (ANOVA) de Kruskal-Wallis, pour quatre groupes, avec des comparaisons par paires à l'aide de l'approche Dunn-Bonferroni, car les données n'étaient pas normalement distribuées. Les statistiques ont été effectués avec le logiciel SPSS version 20.0 pour Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, États-Unis), et les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à une valeur *p* inférieure à 0,05.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

2.2. Résultats

Dans la présente étude, nous avons examiné en *ex vivo*, l'effet du Ss sur l'immunomodulation des M1 like monocytes-derived M ϕ s et leurs fonctions phénotypiques. Pour cela des M ϕ s dérivés des monocytes des patients atteints du DT1 et des contrôles sains ont été stimulés par PHA-L et traités simultanément par une dose de 30 ng/mL de Ss.

2.2.1. Effet du sélénite de sodium sur la nécrose et la nécroinflammation associée et cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α associés aux macrophages M1-like au début du diabète de type 1

Comme le montre la figure 2.2, en l'absence de traitement par Ss, la nécrose du M ϕ et les niveaux d'IL-1 β et du TNF- α ont été significativement supérieurs dans les M ϕ s de DT1 par rapport à ceux des M ϕ s des contrôles non-traités; tandis que dans les M ϕ s non-nécrotiques restants ont significativement diminués ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ par le test Mann-Whitney U , respectivement). De plus, le traitement par Ss a induit une baisse significative de la nécrose cellulaire, de l'IL-1 β et du TNF- α , et inversement, une forte augmentation a été observée dans les M ϕ s non-nécrotiques restants, dans les DT1 comparés aux M ϕ s du DT1 non-traités par Ss ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$ respectivement par le test Mann-Whitney U). Les valeurs p par le test de Kruskal-Wallis étaient inférieures à 0.05 pour la nécrose cellulaire, et inférieure à 0.01 pour les non-nécrotiques restants (IL-1 β et TNF- α).

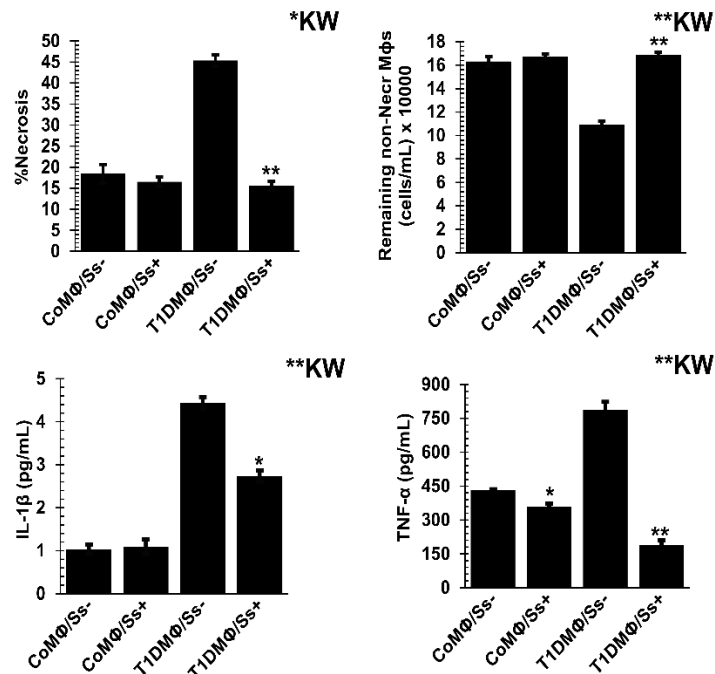


Figure 2.2. Effet du sélénite de sodium sur la nécroinflammation et la production associée au cytokines pro-inflammatoires de type M1 IL-1 β et TNF- α au début du diabète de type 1 humain.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

Les niveaux de cytokines ont été mesurés à l'aide de la méthode immuno-sorbet assay sandwich (ELISA). Le test de nécrose M ϕ a été déterminé par spectrophotométrie par le test de cytotoxicité basé sur la lactate déshydrogénase (LDH). Le nombre de M ϕ non-nécrotiques restants a été mathématiquement estimé à la fin de chaque expérience. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes réalisées sur des échantillons de cellules isolées de quatre volontaires atteints de DT1 et de quatre témoins sains ($n = 16$ dans chaque groupe). M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss- : M ϕ de témoin non-traités au sélénite de sodium, CoM ϕ /Ss+ : M ϕ de témoin traité au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss- : M ϕ de diabétique de type 1 non-traités au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss+ : M ϕ de diabétique de type 1 traité avec sélénite de sodium, IL-1 β : interleukine-1 β , non-Necr M ϕ s : macrophages non-nécrotiques, TNF- α : tumor necrosis factor- α . Les différences statistiques mises en évidence entre les deux groupes sont réalisées par le test de Mann-Whitney U. Les astérisques indiquent une différence significative entre CoM ϕ /Ss- et CoM ϕ /Ss+ ou entre T1DM ϕ /Ss- et T1DM ϕ /Ss+, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. La différence statistique entre tous les groupes est déterminée par un test de Kruskal-Wallis (KW) non paramétrique avec des comparaisons multiples par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni, *KW : $p < 0,05$, **KW : $p < 0,01$

2.2.2. Effet du sélénite de sodium sur la production de la cytokine IL-10 anti-inflammatoire/régulatrice associée au macrophage M2-like

La figure 2.3 montre que les niveaux de production d'IL-10 étaient similaires dans les M ϕ s de témoins traités ou non-traités par le Ss ($p > 0.05$ par le test Mann-Whitney U). En revanche, le traitement par le Ss a induit une diminution significative des niveaux de production d'IL-10 dans les M ϕ s de DT1 par rapport aux M ϕ s de témoins non-traité ($p < 0.05$ par le test Mann-Whitney U). De plus, le traitement par le Ss a induit une forte augmentation de la production d'IL-10 dans les M ϕ s du DT1 par rapport aux M ϕ s du DT1 non-traités (pour les deux comparaisons, $p < 0.05$ par le test Mann-Whitney U). La valeur p était inférieure à 0.01 selon le test de Kruskal-Wallis.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

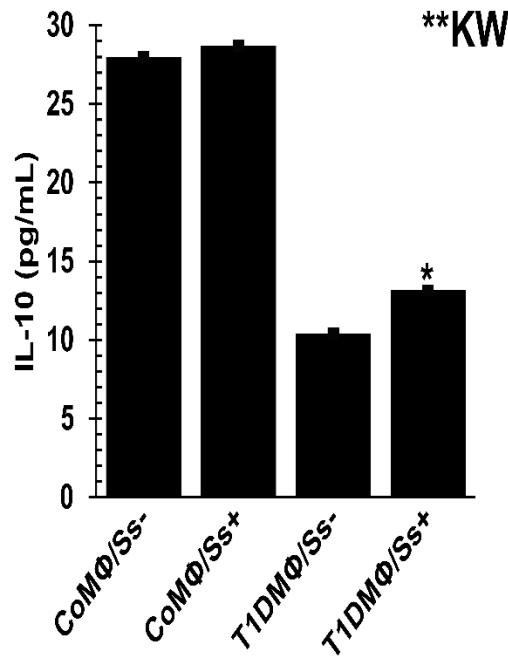


Figure 2.3. Effet du sélénite de sodium sur la production de cytokine anti-inflammatoire/régulatrice de type M2 IL-10 par les Mφs humains au début du diabète de type 1.

Les niveaux d'IL-10 produite par le Mφ ont été mesurés à l'aide de la méthode immuno-enzymatique sandwich (ELISA). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes réalisées sur des échantillons de cellules isolées de quatre volontaires atteints de DT1 et de quatre témoins sains ($n = 16$ dans chaque groupe). Mφ : macrophage, CoMφ/Ss- : Mφ de témoin non-traités au sélénite de sodium, CoMφ/Ss+ : Mφ de témoin traité au sélénite de sodium, T1DMφ/Ss- : Mφ de diabétique de type 1 non-traités au sélénite de sodium, T1DMφ/Ss+ : Mφ de diabétique de type 1 traité avec sélénite de sodium, IL-10 : interleukine -10. Les différences statistiques mises en évidence entre les deux groupes sont réalisées par le test de Mann-Whitney U . L'astérisque indique une différence significative entre T1DMφ/Ss- et T1DMφ/Ss+, $*p < 0,05$. La différence statistique entre tous les groupes est déterminée par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) avec des comparaisons multiples par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni, ****KW** : $p < 0,01$.

2.2.3. Effet du sélénite de sodium sur le burst respiratoire

La production du NO et du H₂O₂ a été examinée autant que biomarqueur du burst respiratoire. Comme le montre la figure 2.4, les concentrations en NO et en H₂O₂ ont augmenté dans les Mφs du DT1 que dans les Mφs de contrôles mais la différence n'a pas atteint un niveau significatif pour la production du NO ($p > 0,05$ et $p < 0,05$, respectivement par le test de Mann-Whitney U). En revanche, le traitement par Ss induit une forte baisse pour les deux variables, que ce soit dans les Mφs du DT1 ou dans les Mφs du contrôle (pour la production du NO et de H₂O₂, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). La valeur $p < 0,01$, en utilisant le test de Kruskal-Wallis.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

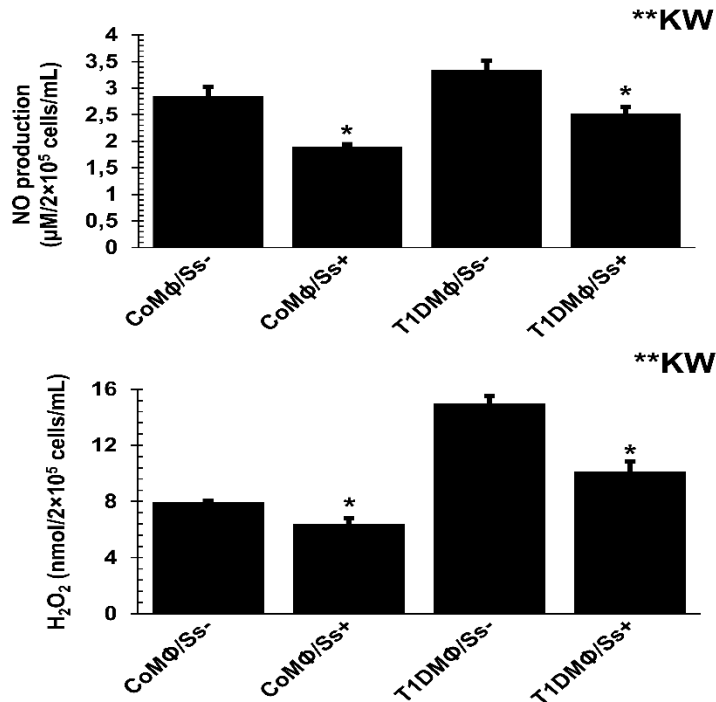


Figure 2.4. Effet du sélénite de sodium sur le burst respiratoire des Mφs au début du diabète de type 1.

Le burst respiratoire a été réalisée par des mesures de production de NO et de libération de H₂O₂. Les niveaux de La production de NO a été mesurée par la réaction sensible de Griess. Les niveaux de H₂O₂ ont été mesurés par la méthode adaptée de Pick et Keisar. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de cinq expériences indépendantes réalisées sur des échantillons de cellules isolées de quatre volontaires atteints de DT1 et de quatre témoins sains ($n = 20$ dans chaque groupe). Mφ : macrophage, CoMφ/Ss⁻ : Mφ de témoin non-traités au sélénite de sodium, CoMφ/Ss⁺ : Mφ de témoin traité au sélénite de sodium, T1DMφ/Ss⁻ : Mφ de diabétique de type 1 non-traités au sélénite de sodium, T1DMφ/Ss⁺ : Mφ de diabétique de type 1 traité avec sélénite de sodium, NO : monoxyde d'azote, H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène. Les différences statistiques mises en évidence entre les deux groupes sont réalisées par le test de Mann-Whitney U. Les astérisques indiquent une différence significative entre CoMφ/Ss⁻ et CoMφ/Ss⁺ ou entre T1DMφ/Ss⁻ et T1DMφ/Ss⁺, * $p < 0,05$. La différence statistique entre tous les groupes est déterminée par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) avec des comparaisons multiples par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni, **KW : $p < 0,01$.

2.2.4. Effet du sélénite de sodium sur la modulation de M1-like(activité d'iNOS) et M2-like(activité d'Arg1)

Les résultats dans la figure 2.5 montrent que les niveaux d'activité d'ARG1 ont baissé et les niveaux d'activité d'iNOS ont augmenté, dans les Mφs de DT1 par rapport aux Mφs de témoins, mais la différence n'était pas significative pour les deux comparaisons ($p > 0.05$ par le test Mann-Whitney U). De plus, le traitement par Ss a induit une augmentation de l'activité d'ARG1 que ce soit dans les Mφs de témoins ou dans les Mφs des DT1 mais la différence

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

n'était pas significative lors de la comparaison entre les M ϕ s de DT1 ($p < 0.05$, $p > 0.05$). A l'inverse, le traitement par Ss a induit une baisse significative de l'activité d'iNOS, à la fois dans les M ϕ s des contrôles et des DT1 (pour les deux comparaisons, $p < 0.05$). Pour les comparaisons multiples par le test de Kruskal-Wallis p était inférieure à 0.05, pour l'activité d'arginase et inférieure à 0.01 pour l'activité d'iNOs.

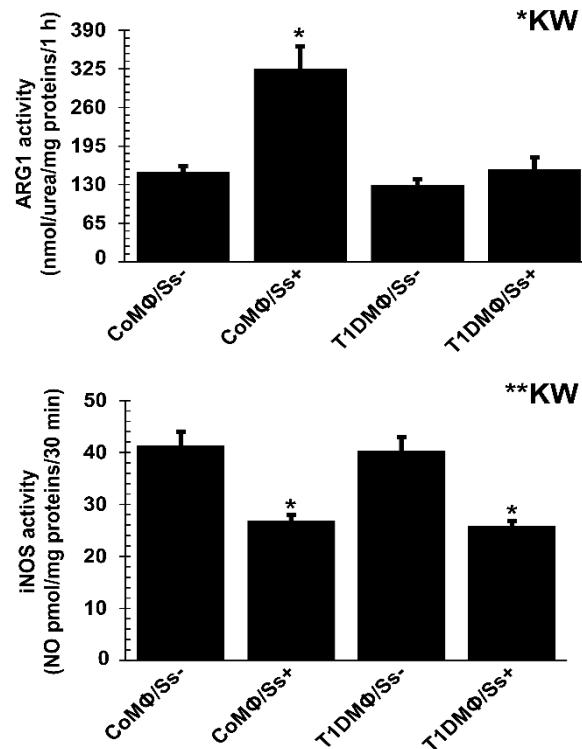


Figure 2.5. Effet du sélénite de sodium sur les M ϕ s humains de type M1 (activité d'iNOs) et de type M2 (activité d'ARG 1) au début du diabète de type 1.

L'activité ARG1 a été mesurée dans des lysats cellulaires du M ϕ à l'aide d'une technique spectrophotométrique basée sur la détermination de la production d'urée. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de cinq expériences indépendantes réalisées sur des échantillons de cellules isolées de quatre volontaires atteints de DT1 et de quatre témoins sains ($n = 20$ dans chaque groupe). Les concentrations d'iNOS ont été obtenues par normalisation par rapport à la concentration en protéines (les données sont présentées comme la moyenne de l'activité d'iNOS avec SEM). ARG1 : arginase 1, iNOS : monoxyde d'azote synthase inductible, NO : monoxyde d'azote, M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss $^-$: M ϕ de témoin non-traités au sélénite de sodium, CoM ϕ /Ss $^+$: M ϕ de témoin traité au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss $^-$: type 1 diabète M ϕ non-traités par sélénite de sodium, DT1 M ϕ /Ss $^+$: M ϕ de diabétique de type 1 traité par sélénite de sodium. Les différences statistiques mises en évidence entre les deux groupes sont réalisées par le test de Mann-Whitney U. Les astérisques indiquent une différence significative entre CoM ϕ /Ss $^-$ et CoM ϕ /Ss $^+$ ou entre T1DM ϕ /Ss $^-$ et T1DM ϕ /Ss $^+$, * $p < 0,05$. La différence statistique entre tous les groupes est

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

déterminée par un test de Kruskal-Wallis (KW) non paramétrique avec des comparaisons multiples par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni, *KW : $p < 0,05$, **KW : $p < 0,01$.

2.2.5. Effet du sélénite de sodium sur le taux du calcium intracellulaire libre

Nous avons observé sur la figure 2.6 que les niveaux d' $i\text{Ca}^{2+}$ ont augmenté de manière significative dans les M ϕ s du DT1 par rapport aux M ϕ s des contrôles ($p < 0.05$ par le test de Mann-Whitney U). A l'opposé, le traitement par Ss a significativement réduit les niveaux d' $i\text{Ca}^{2+}$ dans les M ϕ s de DT1 et dans les M ϕ s des contrôles (pour les deux comparaisons, $p < 0.05$ par le test de Mann-Whitney U). Pour les comparaisons multiples, utilisant le test de Kruskal-Wallis, la valeur $p < 0.01$.

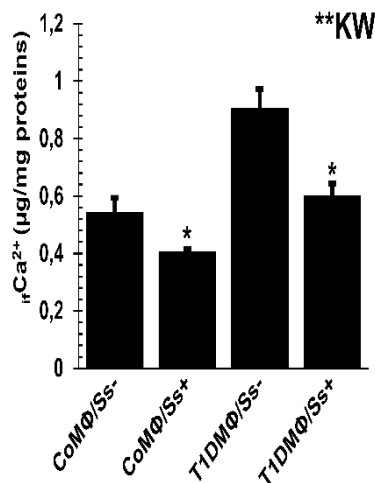


Figure 2.6. Effet du sélénite de sodium sur l' $i\text{Ca}^{2+}$ dans le M ϕ humain au début du diabète de type 1.

Les niveaux d'ions calcium libres intracellulaires ont été par une méthode biochimique du complexe d'orthocrésolphtaléine (OCP). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de cinq expériences indépendantes réalisées sur des échantillons de cellules isolées de quatre volontaires atteints de DT1 et de quatre témoins sains ($n = 20$ dans chaque groupe). $i\text{Ca}^{2+}$: ions calcium libres intracellulaires. M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss- : M ϕ de témoin non-traités au sélénite de sodium, CoM ϕ /Ss+ : M ϕ de témoin traité au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss- : M ϕ de diabétique de type 1 non-traités au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss+ : M ϕ de diabétique de type 1 traité avec du sélénite de sodium. Les différences statistiques mises en évidence entre les deux groupes sont réalisées par le test de Mann-Whitney U . Les astérisques indiquent une différence significative entre CoM ϕ /Ss- et CoM ϕ /Ss+ ou entre T1DM ϕ /Ss- et T1DM ϕ /Ss+, * $p < 0,05$. La différence statistique entre tous les groupes est déterminée par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) avec des comparaisons multiples par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni, **KW : $p < 0,01$.

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

2.2.6. Effet du sélénite de sodium sur la phagocytose et la destruction bactérienne des agents pathogènes

Il en résulte de la figure 2.7 que la phagocytose semblait être similaire entre les M ϕ de DT1 et les M ϕ du contrôles; tandis que la destruction des agents pathogènes était réduite dans les M ϕ s du DT1 par rapport aux M ϕ s de contrôle, mais la différence n'était pas significative (pour les deux comparaisons, ($p > 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). Cependant, la phagocytose et la capacité de destruction des agents pathogènes ont augmenté dans les M ϕ s de DT1 traités par Ss, mais la phagocytose a significativement baissé dans les M ϕ s du contrôles traités par Ss (pour les deux comparaisons, ($p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). Pour les comparaisons multiples par le test de Kruskal-Wallis, la valeur p était inférieure à 0,05 pour la phagocytose et la destruction des agents pathogènes.

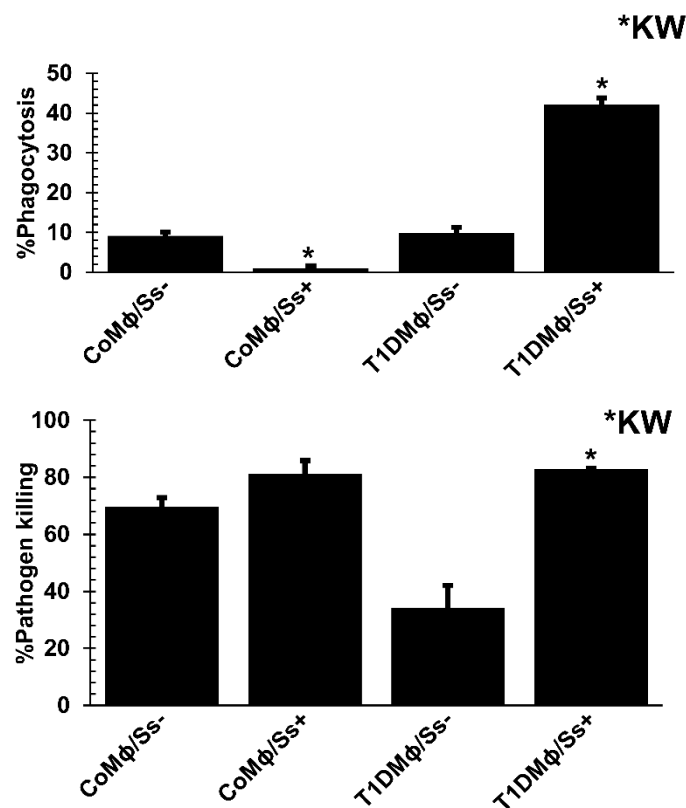


Figure 2.7. Effet du sélénite de sodium sur la capacité phagocytaire et bactéricide du M ϕ au début du diabète de type 1.

L'activité bactéricide de M ϕ s a été dosée par la méthode de protection antibiotique. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes réalisées sur des échantillons de cellules isolés de quatre volontaires atteints de DT1 et de quatre témoins sains ($n=16$ dans chaque groupe). M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss⁻ : M ϕ de témoin non-traités au sélénite de sodium, CoM ϕ /Ss⁺ : M ϕ de témoin traité au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss⁻ : M ϕ de diabétique de type 1 non-traités au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss⁺ : M ϕ de diabétique de type 1 traité avec du sélénite de sodium. Les différences statistiques mises en évidence entre les deux groupes

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

sont réalisées par le test de Mann-Whitney U. Un astérisque indique une différence significative entre CoM ϕ /Ss- et CoM ϕ /Ss+ ou entre T1DM ϕ /Ss et T1DM ϕ /Ss+, * $p < 0,05$. La différence statistique entre tous les groupes est déterminée par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) avec des comparaisons multiples par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni, *KW : $p < 0,05$.

2.2.7. Effet immuno-modulateur du sélénite de sodium sur la balance des M1-like pro-inflammatoire versus les M2-like anti-inflammatoire

La figure 2.8 illustre qu'en l'absence du Ss le rapport M1: M2 a augmenté dans les M ϕ s du DT1 que dans les M ϕ s du contrôle, comme le démontrent les ratios de l'activité d' iNOS à l'activité d' ARG1, IL-1 β -à-IL-10 et TNF- α - à l'IL-10, mais aucune différence n'a été révélée pour les activités iNOS / ARG1 (respectivement, $p > 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,05$ par le test Mann-Whitney U). De plus, le traitement par Ss a induit une baisse significative du rapport M1:M2 dans tous les groupes de comparaison dans les M ϕ s du DT1 (pour toutes les comparaisons, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). Lors de l'utilisation du test de Kruskal-Wallis, la valeur p était inférieure à 0,01 pour l'activité iNOS- à l'activité ARG1 et à l'IL-1 β - à l'IL-10, et inférieure à 0,05 pour le TNF- α -à -l'IL-10.

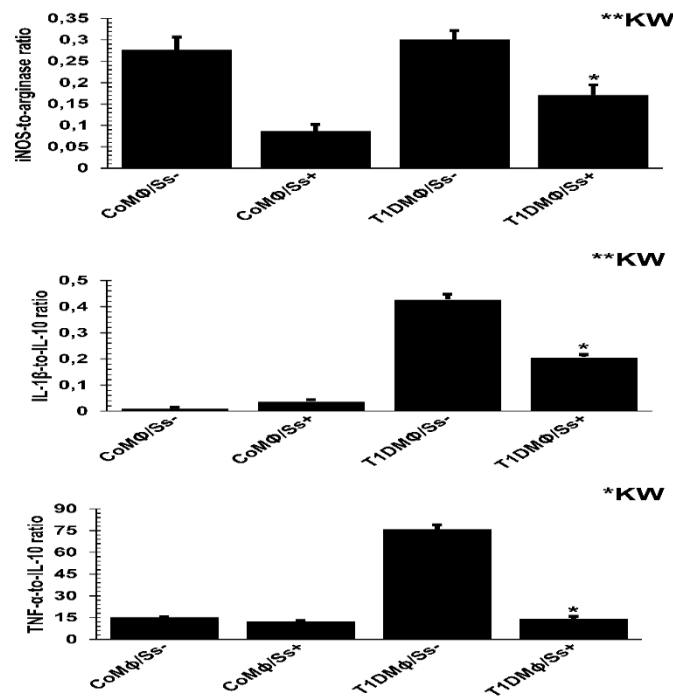


Figure 2.8. Effet du sélénite de sodium sur la balance des M ϕ s « M1-like » pro-inflammatoire versus « M2-like » anti-inflammatoire au début de diabète de type 1.

La dichotomie M1-like/M2-like M ϕ a été estimée par les ratios de l'activité iNOS à l'activité ARG1, IL-1 β -à-IL-10 et TNF- α -à-IL-10. M1 : classiquement activé, pro-inflammatoire/tueur M ϕ s, M2 : M ϕ s alternativement activé, anti-inflammatoire/régulateur. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM). M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss- : M ϕ de témoin non-traités au sélénite de sodium, CoM ϕ /Ss+ : M ϕ de témoin traité au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss- : M ϕ de

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

diabétique de type 1 non-traités au sélénite de sodium, T1DM ϕ /Ss+ : M ϕ de diabétique de type 1 traité avec du sélénite de sodium. Les différences statistiques sont indiquées entre deux groupes par le test de Mann-Whitney U. Les astérisques indiquent une différence significative entre T1DM ϕ /Ss- et T1DM ϕ /Ss+, * $p < 0,05$. La différence statistique entre tous les groupes est déterminée par un test de Kruskal-Wallis (KW) non paramétrique avec des comparaisons multiples par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni, *KW : $p < 0,05$, **KW : $p < 0,01$.

2.2.8. Effet du sélénite de sodium sur l'activation du macrophage M1-like associé à l'expression du CD14 au cours du DT1

D'après les résultats présentés sur la figure 2.9, en l'absence du traitement par Ss, les niveaux d'expression de CD14 ont augmenté dans les M ϕ s du DT1 par rapport aux M ϕ s des contrôles, mais la différence n'était pas statistiquement significative ($p > 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). A l'inverse, les niveaux d'expression de CD14 ont baissé dans les M ϕ s traités par Ss, que ce soit dans le groupe des M ϕ s du contrôle ou du DT1, mais la différence n'était significative que dans les M ϕ s du DT1 (respectivement, $p > 0,05$ et $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). Pour les comparaisons multiples, la valeur de p était inférieure à 0,05 selon le test de Kruskal-Wallis.

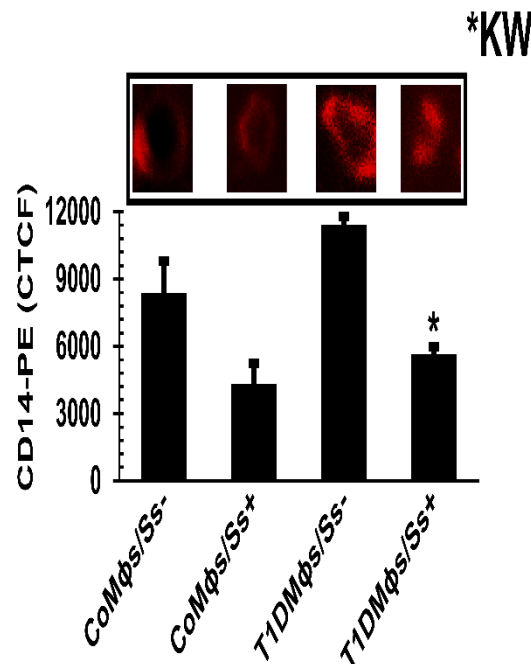


Figure 2.9. Effet du sélénite de sodium sur l'activation des M ϕ s de type M1 associée à l'expression de CD14 au début du diabète humain de type 1.

L'expression CD14 de M ϕ s a été évaluée par immunofluorescence directe grâce à Fluid Cell Imaging Station puis analysée avec le logiciel ImageJ. L'intensité de fluorescence est relative au fond respectif de chaque cellule comme suit : fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) = densité intégrée - (zone de cellule sélectionnée \times fluorescence moyenne des lectures de fond). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

réalisées sur des échantillons de cellules isolées de quatre volontaires atteints de DT1 et de quatre témoins sains ($n = 16$ dans chaque groupe). $M\phi$: macrophage, $CoM\phi/Ss-$: $M\phi$ de témoin non-traités au sélénite de sodium, $CoM\phi/Ss+$: $M\phi$ de témoin traité au sélénite de sodium, $T1DM\phi/Ss-$: $M\phi$ de diabétique de type 1 non-traités au sélénite de sodium, $T1DM\phi/Ss+$: $M\phi$ de diabétique de type 1 traité avec du sélénite de sodium. Les différences statistiques mises en évidence entre les deux groupes sont réalisées par le test U de Mann-Whitney. Les astérisques indiquent une différence significative entre $T1DM\phi/Ss-$ et $T1DM\phi/Ss+$, $*p < 0,05$. La différence statistique entre tous les groupes est déterminée par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KM) avec des comparaisons multiples par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni, $*KW : p < 0,05$

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

2.3. Discussion

Le DT1 a été observé comme étant associé à une activation exacerbée des Mφs pro-inflammatoires (Burg and Tse, 2018). Il est d'un grand intérêt que l'immunomodulation doit être faite au stade pré-diabétique (Raz et al., 2005), ou au début de la maladie afin d'arrêter la destruction totale de cellules β pancréatiques (Sliem et al., 2012). Par conséquent, dans la présente étude, nous avons démontré que Ss induit une baisse de l'activité des Mφs pro-inflammatoires de type M1 et immunomodule la nécro-inflammation, la phagocytose, le burst respiratoire et la dichotomie de type M1/M2 au début du DT1 humain.

2.3.1. Effet du sélénite de sodium sur la nécro-inflammation et la cytokine IL-10 de type M2-like régulatrice/anti-inflammatoire

Les cellules immunitaires, y compris les Mφs M1, mais pas M2, sont plus susceptibles de mourir par nécrose et nécroptose, ce qui entraîne la libération de niveaux accrus de LDH et de protéases (Hao et al., 2021). Notamment, la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse au contenu intracellulaire libéré à la suite d'une rupture de la membrane plasmique caractérisant la nécrose qui représente l'un des principaux marqueurs de la réponse inflammatoire appelée nécroinflammation (Tonnus et al., 2019). Par conséquent, dans notre étude, nous avons observé que le Ss induisait à la fois une régulation négative de la nécroinflammation, comme en témoigne la diminution de la nécrose et des cytokines pro-inflammatoires de type M1 IL-1β et TNF-α, et augmentait la production d'IL-10 par les Mφs non-nécrotiques restants.

L'IL-1β exerce son effet cytotoxique sur les cellules β en augmentant l'expression de protéines pro-apoptotique, comme le premier signal d'apoptose (Fas/CD95). Leur concentration circulante a été régulée positivement chez les patients diabétiques de type 1 nouvellement diagnostiqués (Aribi et al., 2007). Il a été démontré que le TNF-α inhibe la sécrétion d'insuline (Yoon and Jun, 2005), ainsi que la régulation positive de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), accélérant ainsi l'apoptose des cellules β et induisant par la suite l'infiltration des îlots par les cellules présentatrices d'antigène (APC), y compris les Mφs (Lu et al., 2020). De plus, il a été démontré que l'inhibition du TNF-α empêche les souris diabétiques non-obèses (NOD) de développer la maladie (Lee et al., 2005). A l'inverse, l'IL-10 a la capacité d'inhiber la production et la libération de médiateurs immunitaires et de limiter les réponses inflammatoires en inhibant l'activation du Mφ (O'Farrell, 1998). Ainsi, une carence en IL-10 peut entraîner une augmentation de la pancréatite (Rajagopalan et al., 2006). Globalement, nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude précédente menée sur des Mφ dérivés de U937 exposés au H₂O₂, en tant que signal de dommage de blessure et d'inflammation, démontrant que le

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

traitement par le Ss induisait une régulation négative des cytokines pro-inflammatoires, y compris à la fois IL-1 β et TNF α (Okoko, 2018). Ils sont également conformes à ceux rapportant que la production d'IL-10 est régulée à la baisse au début du DT1 (Benghalem et al., 2017; Rios- Arce et al., 2020; Ysmail-Dahlouk et al., 2016). Néanmoins, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude similaire permettant une comparaison avec nos résultats. Enfin, nous montrons ici que le traitement par le Ss pourrait jouer un puissant rôle modulateur de la réponse nécro-inflammatoire médiée par les M ϕ s de type M1 dans le DT1 récent.

2.3.2. Effet du sélénite de sodium sur le burst respiratoire

Il a été rapporté que burst respiratoire joue un rôle crucial dans la pathogenèse du DT1 et de ses complications (Sokolovska et al., 2020). Les phagocytes activés, comme les M ϕ s, produisent des niveaux élevés de ROS et de RNS dans la maladie, y compris la production de H₂O₂ et de NO, ce qui est conforme à nos résultats (Fatima et al., 2016; Meares et al., 2013b). Il a été rapporté qu'une production élevée de NO est induite par diverses cytokines pro-inflammatoires produite par le M ϕ , dont l'IL-1 β et le TNF- α , *via* l'induction de l'expression d'iNOS en activant les facteurs de transcription NF- κ B et STAT-1 (Bedoya et al., 2012). Comme le NO, le H₂O₂ produit par les M ϕ s peut également être toxique pour les cellules β et provoquer leurs dommages, contribuant ainsi potentiellement à la pathogenèse du DT1 (Broniowska et al., 2015). Dans notre étude, nous avons observé que le traitement par le Ss a diminué la production de NO et les niveaux de H₂O₂, ce qui est cohérent avec diverses études (Aribi et al., 2015; Chomchan et al., 2018; Okoko, 2018). Néanmoins, la comparaison avec d'autres études reste limitée, sachant qu'il n'existe pas d'études sur l'effet du Ss sur la production de NO et H₂O₂ par les M ϕ s humains au cours du DT1, bien qu'il soit devenu aujourd'hui un des sujets de recherche majeurs en raison de son rôle de protection des cellules et des fonctions immunitaires bien documentées.

2.3.3. Effet du sélénite de sodium sur la phagocytose et la destruction bactérienne

La phagocytose représente l'un des meilleurs marqueurs des activités phénotypiques fonctionnelles. Il a été rapporté qu'elle est compromise dans le DT1 (Geerlings and Hoepelman, 1999). Dans la présente étude, nous avons observé que le Ss a un effet inverse à la fois sur l'activité phagocytaire et sur la destruction des agents pathogènes dans les M ϕ s du DT1. Nos résultats plaident en faveur de l'action du Ss sur la commutation phénotypique des M ϕ s dans des conditions inflammatoires. Bien que les effets anti-inflammatoires du Ss soient bien documentés (Han et al., 2019; Huang et al., 2012), leurs effets sur les M ϕ s pro-

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunomodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

inflammatoires de type M1 au cours du DT1 semblent être explorés ici pour la première fois, ce qui devrait ouvrir la voie à de nouvelles investigations du mécanisme.

2.3.4. Effet de sélénite de sodium sur les Mφs M1-like_(iNOS) et M2-like_(ARG1), et la dichotomie de Mφs “M1-like” versus Mφs “M2-like”

D'un grand intérêt, la régulation à la hausse de l'activité d'ARG1 peut jouer un rôle immunorégulateur puissant au début du DT1, car elle entraîne une biodisponibilité réduite de la L-arginine pour iNOS et la production ultérieure de NO. Cela semble être un mécanisme essentiel de "l'immunosuppression associée à l'inflammation" (Benghalem et al., 2017). Dans notre étude, nous avons observé que l'activité d'ARG1 semble être légèrement régulée à la hausse dans les Mφs du DT1 traités par le Ss, ce dernier réduisait remarquablement les niveaux d'iNOS, ce qui est cohérent avec les études *in vivo* et *in vitro* (Dhanjal et al., 2017; Zeng et al., 2009). De plus, un fort switch au phénotype anti-inflammatoire M2 (ARG1) ne semblerait pas toujours souhaitable dans différentes conditions inflammatoires, en particulier dans les infections virales, comme cela a été récemment rapporté dans la pandémie de COVID-19 (Stancioiu et al., 2020). Par conséquent, il convient de souligner que le DT1 peut être causé par mimétisme moléculaire, à la suite d'une infection virale, ce qui pourrait renforcer l'auto-immunité (Filippi and von Herrath, 2008). Il convient de noter que dans certains cas, l'interprétation des résultats semble difficile, en particulier dans une situation où deux variables immunitaires aux effets opposés augmentent ou diminuent simultanément. Par conséquent, la meilleure façon de déterminer quelle variable domine l'autre est de mesurer le rapport des deux variables. Ainsi, le rapport des activités iNOS/ARG1 serait plus informatif que l'activité iNOS ou ARG1 déterminée seule. A noter également, la dichotomie du Mφ de type M1/M2-like fait également référence au rapport cytokines pro-inflammatoires/anti-inflammatoires qui correspond à la polarisation Th1/Th2 des lymphocytes T auxiliaires, respectivement. Ainsi, dans l'étude actuelle, nous avons observé qu'en l'absence de traitement par le Ss, les ratios iNOS activité-à-ARG1 activité, IL-1β-à-IL-10 et TNF-α-à-IL-10 étaient significativement élevés dans les Mφs du DT1; tandis que tous ces rapports étaient nettement diminués dans les Mφs traités par le Ss. De ce fait, nos résultats sont en accord avec ceux d'études précédentes démontrant que le Ss a des propriétés anti-inflammatoires et qu'il est capable de changer phénotypiquement les Mφs de type M1-like pro-inflammatoire/tueur vers un phénotype anti-inflammatoire/régulateur de type M2 (Nelson et al., 2011).

2.3.5. Effet du sélénite de sodium sur le calcium intracellulaire libre

En tant que second messager omniprésent, l' Ca^{2+} peut affecter plusieurs activités biologiques du Mφ telles que la production de cytokines, la phagocytose, la fusion phagosome-

Chapitre 2. Le sélénite de sodium immunodule les activités fonctionnelles du macrophage au début du diabète de type 1

lysosome et la destruction des agents pathogènes (Nunes and Demaurex, 2010), ainsi que la génération de ROS et le burst respiratoire (Kelly et al., 2010). Les niveaux d' $^{45}\text{Ca}^{2+}$ devraient donc être utilisés comme un contrôle puissant pour chaque biomarqueur des activités fonctionnelles des M ϕ s.

Dans la présente étude, nous avons observé que le traitement par le Ss réduisait nettement les niveaux d' $^{45}\text{Ca}^{2+}$, confirmant les résultats concernant la phagocytose liée aux M ϕ anti-inflammatoires de type M2 (Jaggi et al., 2020), le burst respiratoire, la production de cytokines et le marqueur de surface cellulaire de l'activation du M ϕ CD14. Ces résultats corroborent notre étude récente sur les M ϕ s humain dérivées de monocytes GM-CSF activés par le LPS (GMMDM) (Meziane et al., 2019).

2.3.6. Effet du sélénite de sodium sur l'expression du CD14

Il a été rapporté que le phénotype M1 est caractérisé par l'expression accrue du corécepteur CD14, une glycosylphosphatidylinositol, glycoprotéine exprimée principalement à la surface des cellules myéloïdes. Il remplit de multiples fonctions comme l'initiation de la signalisation dépendante du TLR, ce qui suggère qu'il peut réguler la plasticité du M ϕ de type M1/M2 (da Silva et al., 2017). Une étude précédente a rapporté que la fréquence de la maladie était significativement réduite chez les souris diabétiques non-obèses (NOD) mâles et femelles déficientes en CD14 par rapport à leurs proches (Klötting et al., 2004). Dans la présente étude, nous avons montré que le Ss régulait négativement l'expression de CD14, suggérant que celui-ci se comporte comme un agent de contrôle négatif empêchant l'activation de la fonction pro-inflammatoire du M ϕ M1-like, qui est facilitée par une expression élevée du corécepteur CD14 (Jimenez-Duran et al., 2020). Du point de vue mécanistique, le Ss aurait des effets négatifs sur les voies d'activation des M ϕ s, ce qui diminuerait par conséquent le niveau d'expression de CD14.

2.4. Conclusions

Nos résultats viennent supporter l'hypothèse que le sélénite de sodium peut moduler la réponse de l'immunité innée particulièrement celle du M ϕ et protéger les diabétiques de type 1 des complications engendrées par la maladie.

Chapitre 3. Conclusions et perspectives

Chapitre 3. Conclusions et perspectives

Le DT1 est une maladie auto-immune causée par la destruction des cellules β pancréatiques. Elle est considérée comme un trouble qui apparaît chez les enfants et les adolescents, mais parfois aussi chez les adultes. Cette destruction est associée aux cellules du système immunitaire, y compris les M ϕ s qui sont une population hétérogène et capable d'afficher différents phénotypes fonctionnels par polarisation, en réponse à divers signaux physiologiques et pathogéniques ainsi la régulation de la différenciation et de la polarisation contribuera au développement de thérapie sélective et efficace.

Les M ϕ s sont dotés d'une grande plasticité qui leur permet de changer de phénotype en réponse à des médicaments ou à des molécules bioactives et compte tenu des propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrice du Ss dans l'auto-immunité et l'inflammation chronique.

Dans ce travail, nous avons étudié pour la première fois les effets *ex vivo* du Ss sur la modulation des activités fonctionnelles des M ϕ s humains pro-inflammatoires de type M1 au cours DT1 récent. Ainsi, nous avons démontré qu'il pourrait être capable d'inverser les M ϕ s de type M1, tout en induisant un switch des activités fonctionnelles phénotypiques vers les M ϕ s anti-inflammatoires de type M2, en diminuant, d'une part, la production des cytokines pro-inflammatoires, la nécrose, l'activité de l'iNOS, le taux d'expression de la molécule co-stimulante CD14 et le burst respiratoire et favorisant, d'autre part, la production d'IL-10 et l'activité d'arginase. Cela fournit une nouvelle approche thérapeutique utilisant Ss pour promouvoir la fonction anti-inflammatoire des M ϕ s au début de la maladie, ce qui pourrait entraîner une protection profonde des cellules β contre les lésions pro-inflammatoires prédominantes induites par les M ϕ s de type M1.

En termes de perspectives, l'étude actuelle devrait ouvrir la voie à un large éventail d'investigations, y compris, mais sans s'y limiter,

- (i) L'étude des voies de signalisation intracellulaires, de la cinétique et du mode d'action du Ss lors de la polarisation M1-M2.
- (ii) Mesurer les effets du Ss sur la régulation de l'activité des canaux calciques dans les M ϕ s du DT1.
- (iii) Vérifier *in vivo* l'efficacité de la supplémentation en Ss sur le burst respiratoire, la production de cytokines et la phagocytose.
- (iv) Explorer l'effet du traitement par le Ss sur d'autres marqueurs de l'activation et les sous-types de M ϕ , ainsi que sur leur chimiotaxie dans le processus d'inflammation du DT1 d'apparition récente.

Chapitre3. Conclusions et perspectives

- (v) L'étude mécanistique de l'effet du Ss sur l'interaction entre les Mφs pro-inflammatoires de type M1 et les cellules β.
- (vi) Enfin, bien que le réservoir de cellules β productrices d'insuline ne soit pas encore complètement endommagés au début du DT1, ce qui permet de proposer plus facilement des thérapies immunomodulatrices chez les patients atteints de DT1 récent que chez les sujets pré-diabétiques, il serait plus judicieux de prévoir de telles stratégies thérapeutiques pour les patients ayant des antécédents familiaux de DT1 ou des auto-anticorps tenaces, et qui n'ont pas encore développé de DT1, c'est-à-dire des sujets qui sont au stade de pré-diabète. Ainsi, la présente étude serait plus intéressante si elle avait été étendue à des Mφs dérivés de monocytes isolés à un stade prédiabétique afin d'éviter toute limitation éventuelle, sachant que l'immunomodulation pourrait avoir un effet significatif sur le retardement de l'apparition du diabète, et, par conséquent, sur le retardement du développement éventuel de complications diabétiques, en particulier chez les patients ayant un mauvais contrôle glycémique. Cette étude serait également encore plus intéressante dans le cadre d'un essai clinique où une taille d'échantillon plus importante est requise.

Chapitre 4. Bibliographie

- Almahfoodh, D., Alabbood, M., Alali, A., Mansour, A., 2017. Epidemiology of type 1 diabetes mellitus in Basrah, Southern Iraq: A retrospective study. *Diabetes Research and Clinical Practice* 133, 104–108. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.09.001>
- Anjos, S., Polychronakos, C., 2004. Mechanisms of genetic susceptibility to type I diabetes: beyond HLA. *Molecular Genetics and Metabolism* 81, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.11.010>
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Aribi, M., 2018. Macrophage Bactericidal Assays, in: Rousselet, G. (Ed.), *Macrophages*. Springer New York, New York, NY, pp. 135–149. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_14
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>
- Aribi, M., Moulessehou, S., Kendouci-Tani, M., Benabadj, A.-B., Hichami, A., Khan, N.A., 2007. Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients. *Med Sci Monit* 13, CR372-378.
- Ash, D.E., 2004. Structure and function of arginases. *J Nutr* 134, 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2760S>
- Atkinson, M.A., 2012. The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a007641–a007641. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007641>
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., Michels, A.W., 2014. Type 1 diabetes. *Lancet* 383, 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Avery, J., Hoffmann, P., 2018. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients* 10, 1203. <https://doi.org/10.3390/nu10091203>
- Baumann, B., Salem, H.H., Boehm, B.O., 2012. Anti-Inflammatory Therapy in Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep* 12, 499–509. <https://doi.org/10.1007/s11892-012-0299-y>
- Bedoya, F.J., Salguero-Aranda, C., Cahuana, G.M., Tapia-Limonchi, R., Soria, B., Tejedo, J.R., 2012. Regulation of pancreatic β -cell survival by nitric oxide: clinical relevance. *Islets* 4, 108–118. <https://doi.org/10.4161/isl.19822>
- Belhassena, I., Nouari, W., Messaoud, A., Nouar, M., Brahimi, M., Lamara, S.-A.C., Aribi, M., 2020. Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease. *International Immunopharmacology* 83, 106349. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349>
- Benghalem, I., Meziane, W., Hadjidj, Z., Ysmail-Dahlouk, L., Belamri, A., Mouhadjer, K., Aribi, M., 2017. 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. *Cytokine* 96, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.001>
- Ben-Sasson, S.Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C.A., Paul, W.E., 2009. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 7119–7124. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902745106>

Chapitre 4. Bibliographie

- Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A., Doniach, D., 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2, 1279–1283. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)90140-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)90140-8)
- Bradfield, J.P., Qu, H.-Q., Wang, K., Zhang, H., Sleiman, P.M., Kim, C.E., Mentch, F.D., Qiu, H., Glessner, J.T., Thomas, K.A., Frackelton, E.C., Chiavacci, R.M., Imielinski, M., Monos, D.S., Pandey, R., Bakay, M., Grant, S.F.A., Polychronakos, C., Hakonarson, H., 2011. A genome-wide meta-analysis of six type 1 diabetes cohorts identifies multiple associated loci. *PLoS Genet.* 7, e1002293. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002293>
- Broadley, M.R., White, P.J., Bryson, R.J., Meacham, M.C., Bowen, H.C., Johnson, S.E., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., Breward, N., Harriman, M., Tucker, M., 2006. Biofortification of UK food crops with selenium. *Proc Nutr Soc* 65, 169–181. <https://doi.org/10.1079/pns2006490>
- Broniowska, K.A., Oleson, B.J., McGraw, J., Naatz, A., Mathews, C.E., Corbett, J.A., 2015. How the location of superoxide generation influences the β -cell response to nitric oxide. *J Biol Chem* 290, 7952–7960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627869>
- Brown, C.T., Davis-Richardson, A.G., Giongo, A., Gano, K.A., Crabb, D.B., Mukherjee, N., Casella, G., Drew, J.C., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C.H., Schatz, D., Atkinson, M.A., Triplett, E.W., 2011. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS ONE* 6, e25792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025792>
- Buchacher, T., Ohradanova-Repic, A., Stockinger, H., Fischer, M.B., Weber, V., 2015. M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS One* 10, e0143593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143593>
- Burg, A.R., Tse, H.M., 2018. Redox-Sensitive Innate Immune Pathways During Macrophage Activation in Type 1 Diabetes. *Antioxidants & Redox Signaling* 29, 1373–1398. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7243>
- Canivell, S., Gomis, R., 2014. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmunity Reviews* 13, 403–407. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.020>
- Cavaillon, J., 1990. Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. *Cytokine* 2, 313–329. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(90\)90061-W](https://doi.org/10.1016/1043-4666(90)90061-W)
- Chadban, Tesch, Foti, Lan, Atkins, Nikolic-Paterson, 1998. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages *in vitro* and *in vivo*: IL-10 differentially modulates MHC class II. *Immunology* 94, 72–78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00487.x>
- Chentoufi, A.A., Geenen, V., Giannokakis, N., Amrani, A., 2011. Type 1 Diabetes Immunological Tolerance and Immunotherapy. *Clinical and Developmental Immunology* 2011, 1–2. <https://doi.org/10.1155/2011/103738>
- Chomchan, R., Puttarak, P., Brantner, A., Siripongvutikorn, S., 2018. Selenium-Rich Ricegrass Juice Improves Antioxidant Properties and Nitric Oxide Inhibition in Macrophage Cells. *Antioxidants (Basel)* 7, 57. <https://doi.org/10.3390/antiox7040057>
- Comerford, I., McColl, S.R., 2011. Mini-review series: focus on chemokines. *Immunol Cell Biol* 89, 183–184. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.164>
- Corraliza, I.M., Campo, M.L., Soler, G., Modolell, M., 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* 174, 231–235.
- Cox, S.L., Silveira, P.A., 2009. Emerging roles for B lymphocytes in Type 1 diabetes. *Expert Rev Clin Immunol* 5, 311–324. <https://doi.org/10.1586/eci.09.4>
- da Silva, T.A., Zorzetto-Fernandes, A.L.V., Cecilio, N.T., Sardinha-Silva, A., Fernandes, F.F., Roque-Barreira, M.C., 2017. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Sci Rep* 7, 7083. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07397-0>

Chapitre 4. Bibliographie

- Dahmani, Z., Addou-Klouche, L., Gizard, F., Dahou, S., Messaoud, A., Chahinez Djebri, N., Benaisti, M.I., Mostefaoui, M., Terbeche, H., Nouari, W., Miliani, M., Lefranc, G., Fernandez, A., Lamb, N.J., Aribi, M., 2020. Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity. *PLoS One* 15, e0240982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982>
- Dahou, S., Smahi, M.C.-E., Nouari, W., Dahmani, Z., Benmansour, S., Ysmail-Dahlouk, L., Miliani, M., Yebdri, F., Fakir, N., Laoufi, M.Y., Chaib-Draa, M., Tourabi, A., Aribi, M., 2021. L-Threoascorbic acid treatment promotes *S. aureus*-infected primary human endothelial cells survival and function, as well as intracellular bacterial killing, and immunomodulates the release of IL-1 β and soluble ICAM-1. *International Immunopharmacology* 95, 107476. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107476>
- Daneman, D., 2006. Type 1 diabetes. *The Lancet* 367, 847–858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68341-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68341-4)
- de Goffau, M.C., Luopajarvi, K., Knip, M., Ilonen, J., Ruohtula, T., Härkönen, T., Orivuori, L., Hakala, S., Welling, G.W., Harmsen, H.J., Vaarala, O., 2013. Fecal microbiota composition differs between children with β -cell autoimmunity and those without. *Diabetes* 62, 1238–1244. <https://doi.org/10.2337/db12-0526>
- Desjardins, M., 2003. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3, 280–291. <https://doi.org/10.1038/nri1053>
- Dhanjal, N.I.K., Sharma, S., Prabhu, K.S., Prakash, N.T., 2017. Selenium supplementation through Se-rich dietary matrices can upregulate the anti-inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *Food Agric Immunol* 28, 1374–1392. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1343805>
- Diana, J., Gahzarian, L., Simoni, Y., Lehuen, A., 2011. Innate immunity in type 1 diabetes. *Discov Med* 11, 513–520.
- Espinoza-Jiménez, A., Peón, A.N., Terrazas, L.I., 2012. Alternatively Activated Macrophages in Types 1 and 2 Diabetes. *Mediators of Inflammation* 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/815953>
- Fan, X., Zhang, H., Cheng, Y., Jiang, X., Zhu, J., Jin, T., 2016. Double Roles of Macrophages in Human Neuroimmune Diseases and Their Animal Models. *Mediators of Inflammation* 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/8489251>
- Fatima, N., Faisal, S.M., Zubair, S., Ajmal, M., Siddiqui, S.S., Moin, S., Owais, M., 2016. Role of Pro-Inflammatory Cytokines and Biochemical Markers in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Correlation with Age and Glycemic Condition in Diabetic Human Subjects. *PLoS ONE* 11, e0161548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161548>
- Fedoroff, S., Richardson, A., 2001. *Protocols for neural cell culture*, 3rd ed. ed. Humana Press, Totowa, N.J.
- Ferrante, C.J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G., Cronstein, B.N., Hasko, G., Outram, S., Leibovich, S.J., 2013. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. *Inflammation* 36, 921–931. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9621-3>
- Filippi, C.M., von Herrath, M.G., 2008. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes* 57, 2863–2871. <https://doi.org/10.2337/db07-1023>
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147, 3815–3822.
- Frederiksen, B., Kroehl, M., Lamb, M.M., Seifert, J., Barriga, K., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., Norris, J.M., 2013. Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA Pediatr* 167, 808–815. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.317>
- Geerlings, S.E., Hoepelman, A.I., 1999. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26, 259–265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x>

Chapitre 4. Bibliographie

- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327, 656–661. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- Gordon, S., Martinez, F.O., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Grassin-Delyle, S., Abrial, C., Salvator, H., Brolo, M., Naline, E., Devillier, P., 2020. The Role of Toll-Like Receptors in the Production of Cytokines by Human Lung Macrophages. *J Innate Immun* 12, 63–73. <https://doi.org/10.1159/000494463>
- Graves, P.M., Barriga, K.J., Norris, J.M., Hoffman, M.R., Yu, L., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., 1999. Lack of association between early childhood immunizations and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Care* 22, 1694–1697. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.10.1694>
- Guilliams, M., Mildner, A., Yona, S., 2018. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49, 595–613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
- Hägglöf, B., Blom, L., Dahlquist, G., Lönnberg, G., Sahlin, B., 1991. The Swedish childhood diabetes study: indications of severe psychological stress as a risk factor for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in childhood. *Diabetologia* 34, 579–583. <https://doi.org/10.1007/bf00400277>
- Han, H.W., Yang, E.J., Lee, S.-M., 2019. Sodium Selenite Alleviates Breast Cancer-Related Lymphedema Independent of Antioxidant Defense System. *Nutrients* 11, 1021. <https://doi.org/10.3390/nu11051021>
- Hao, Q., Idell, S., Tang, H., 2021. M1 Macrophages Are More Susceptible to Necroptosis. *J Cell Immunol* 3, 97–102. <https://doi.org/10.33696/immunology.3.084>
- Hatfield, D.L., Berry, M.J., Gladyshev, V.N., 2006. Selenium: its molecular biology and role in human health, 2nd ed. ed. Springer, New York.
- Hirayama, D., Iida, T., Nakase, H., 2017. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci* 19, 92. <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>
- Hoffmann, P.R., Berry, M.J., 2008. The influence of selenium on immune responses. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 1273–1280. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700330>
- Horwood, N.J., 2016. Macrophage Polarization and Bone Formation: A review. *Clin Rev Allergy Immunol* 51, 79–86. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8519-2>
- Huang, Z., Rose, A.H., Hoffmann, P.R., 2012. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 16, 705–743. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4145>
- Hummel, M., Fuchtenbusch, M., Schenker, M., Ziegler, A.G., 2000. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care* 23, 969–974. <https://doi.org/10.2337/diacare.23.7.969>
- Imagawa, A., Hanafusa, T., Miyagawa, J., Matsuzawa, Y., 2000. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N. Engl. J. Med.* 342, 301–307. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002033420501>
- Italiani, P., Boraschi, D., 2015. New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. *Immune Netw* 15, 167–176. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.4.167>
- Jackson, M., Krasnodembskaya, A., 2017. Analysis of Mitochondrial Transfer in Direct Co-cultures of Human Monocyte-derived Macrophages (MDM) and Mesenchymal Stem Cells (MSC). *BIO-PROTOCOL* 7. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2255>
- Jaggi, U., Yang, M., Matundan, H.H., Hirose, S., Shah, P.K., Sharifi, B.G., Ghiasi, H., 2020. Increased phagocytosis in the presence of enhanced M2-like macrophage responses correlates with increased primary and latent HSV-1 infection. *PLoS Pathog* 16, e1008971. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008971>

Chapitre 4. Bibliographie

- Jefferson, T., Demicheli, V., 1998. No evidence that vaccines cause insulin dependent diabetes mellitus. *J Epidemiol Community Health* 52, 674–675. <https://doi.org/10.1136/jech.52.10.674>
- Jimenez-Duran, G., Luque-Martin, R., Patel, M., Koppe, E., Bernard, S., Sharp, C., Buchan, N., Rea, C., de Winther, M.P.J., Turan, N., Angell, D., Wells, C.A., Cousins, R., Mander, P.K., Masters, S.L., 2020. Pharmacological validation of targets regulating CD14 during macrophage differentiation. *EBioMedicine* 61, 103039. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103039>
- Johansson, L., Gafvelin, G., Arnér, E.S.J., 2005. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta* 1726, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.010>
- Juhas, U., Ryba-Stanisławowska, M., Szargiej, P., Myśliwska, J., 2015. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw* 69, 496–502. <https://doi.org/10.5604/17322693.1150133>
- Kapellos, T.S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E.R., Schultze, J.L., 2019. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 10, 2035. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>
- Karavitis, J., Kovacs, E.J., 2011. Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *J Leukoc Biol* 90, 1065–1078. <https://doi.org/10.1189/jlb.0311114>
- Kelly, E.K., Wang, L., Ivashkiv, L.B., 2010. Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *J Immunol* 184, 5545–5552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901293>
- Kesharwani, V., Sodhi, A., 2007. Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: Production and regulation of nitric oxide. *Nitric Oxide* 16, 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.11.001>
- Kieliszek, M., 2019. Selenium—Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food. *Molecules* 24, 1298. <https://doi.org/10.3390/molecules24071298>
- Klötting, N., Klötting, I., Jack, R.S., 2004. CD14 triggers autoimmune Type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia* 47, 151–152. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1251-0>
- Knip, M., Virtanen, S.M., Seppä, K., Ilonen, J., Savilahti, E., Vaarala, O., Reunanen, A., Teramo, K., Hämäläinen, A.-M., Paronen, J., Dosch, H.-M., Hakulinen, T., Akerblom, H.K., Finnish TRIGR Study Group, 2010. Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* 363, 1900–1908. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1004809>
- Korwar, A.M., Shay, A.E., Basrur, V., Conlon, K., Prabhu, K.S., 2019. Selenoproteome Identification in Inflamed Murine Primary Bone Marrow-Derived Macrophages by Nano-LC Orbitrap Fusion Tribrid Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 1276–1283. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02192-9>
- Kostic, A.D., Gevers, D., Siljander, H., Vatanen, T., Hyötyläinen, T., Hämäläinen, A.-M., Peet, A., Tillmann, V., Pöhö, P., Mattila, I., Lähdesmäki, H., Franzosa, E.A., Vaarala, O., de Goffau, M., Harmsen, H., Ilonen, J., Virtanen, S.M., Clish, C.B., Orešič, M., Huttenhower, C., Knip, M., DIABIMMUNE Study Group, Xavier, R.J., 2015. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 17, 260–273. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.001>
- Kozloski, G.A., 2019. Macrophage Markers. *MATER METHODS* 9. <https://doi.org/10.13070/mm.en.9.2758>
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., Udalova, I.A., 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12, 231–238. <https://doi.org/10.1038/ni.1990>
- Lamb, M.M., Miller, M., Seifert, J.A., Frederiksen, B., Kroehl, M., Rewers, M., Norris, J.M., 2015. The effect of childhood cow's milk intake and HLA-DR genotype on risk of islet

Chapitre 4. Bibliographie

- autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Pediatr Diabetes* 16, 31–38. <https://doi.org/10.1111/pedi.12115>
- Langston, P.K., Shibata, M., Horng, T., 2017. Metabolism Supports Macrophage Activation. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00061>
- Lee, L.-F., Xu, B., Michie, S.A., Beilhack, G.F., Warganich, T., Turley, S., McDevitt, H.O., 2005. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15995–16000. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508122102>
- Lehuen, A., Diana, J., Zaccane, P., Cooke, A., 2010. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* 10, 501–513. <https://doi.org/10.1038/nri2787>
- Li, M., Song, L.-J., Qin, X.-Y., 2014. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 749–758. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12270>
- Lobinski, R., Edmonds, J.S., Suzuki, K.T., Uden, P.C., 2000. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 72, 447–461. <https://doi.org/10.1351/pac200072030447>
- Lu, J., Liu, J., Li, L., Lan, Y., Liang, Y., 2020. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin Transl Immunology* 9, e1122. <https://doi.org/10.1002/cti2.1122>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Maslowski, K.M., Mackay, C.R., 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.* 12, 5–9. <https://doi.org/10.1038/ni0111-5>
- McKenzie, R.C., Beckett, G.J., Arthur, J.R., 2006. Effects of selenium on immunity and aging, in: Hatfield, D.L., Berry, M.J., Gladyshev, V.N. (Eds.), *Selenium*. Springer US, Boston, MA, pp. 311–322. https://doi.org/10.1007/0-387-33827-6_27
- Meares, G.P., Fontanilla, D., Broniowska, K.A., Andreone, T., Lancaster, J.R., Corbett, J.A., 2013a. Differential responses of pancreatic β -cells to ROS and RNS. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304, E614-622. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00424.2012>
- Meares, G.P., Fontanilla, D., Broniowska, K.A., Andreone, T., Lancaster, J.R., Corbett, J.A., 2013b. Differential responses of pancreatic β -cells to ROS and RNS. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E614-622. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00424.2012>
- Merger, S.R., Leslie, R.D., Boehm, B.O., 2013. The broad clinical phenotype of Type 1 diabetes at presentation. *Diabetic Medicine* 30, 170–178. <https://doi.org/10.1111/dme.12048>
- Meziane, W., Mekkaoui, Z., Hai, I., Kacimi, K., Djilali, K., Touil-Boukoffa, C., Lefranc, G., Fernandez, A., Lamb, N., Mennechet, F., Aribi, M., 2019. Combination of metformin with sodium selenite induces a functional phenotypic switch of human GM-CSF monocyte-derived macrophages. *International Immunopharmacology* 73, 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.004>
- Miliani, M., Nouar, M., Paris, O., Lefranc, G., Mennechet, F., Aribi, M., 2018. Thymoquinone Potently Enhances the Activities of Classically Activated Macrophages Pulsed with Necrotic Jurkat Cell Lysates and the Production of Antitumor Th1-/M1-Related Cytokines. *J Interferon Cytokine Res* 38, 539–551. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0010>
- Mills, C.D., 2015. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>
- Morgan, E., Halliday, S.R., Campbell, G.R., Cardwell, C.R., Patterson, C.C., 2016. Vaccinations and childhood type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* 59, 237–243. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3800-8>
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>

Chapitre 4. Bibliographie

- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Murray, R.Z., Stow, J.L., 2014. Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00538>
- Nakao, N., Kurokawa, T., Nonami, T., Tumurkhuu, G., Koide, N., Yokochi, T., 2008. Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor- α in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. *Innate Immun* 14, 190–196. <https://doi.org/10.1177/1753425908093932>
- Narayan, V., Ravindra, K.C., Liao, C., Kaushal, N., Carlson, B.A., Prabhu, K.S., 2015. Epigenetic regulation of inflammatory gene expression in macrophages by selenium. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.09.009>
- Nazimek, K., Bryniarski, K., 2012. The biological activity of macrophages in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw* 66, 507–520. <https://doi.org/10.5604/17322693.1004080>
- Nelson, S.M., Lei, X., Prabhu, K.S., 2011. Selenium Levels Affect the IL-4–Induced Expression of Alternative Activation Markers in Murine Macrophages. *The Journal of Nutrition* 141, 1754–1761. <https://doi.org/10.3945/jn.111.141176>
- Nelson, S.M., Shay, A.E., James, J.L., Carlson, B.A., Urban, J.F., Prabhu, K.S., 2016. Selenoprotein Expression in Macrophages Is Critical for Optimal Clearance of Parasitic Helminth *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Biol Chem* 291, 2787–2798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684738>
- Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., Aribi, M., 2016. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.* 30, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>
- Nunes, P., Demareux, N., 2010. The role of calcium signaling in phagocytosis. *J Leukoc Biol* 88, 57–68. <https://doi.org/10.1189/jlb.0110028>
- Ocaña-Guzman, R., Vázquez-Bolaños, L., Sada-Ovalle, I., 2018. Receptors That Inhibit Macrophage Activation: Mechanisms and Signals of Regulation and Tolerance. *J Immunol Res* 2018, 8695157. <https://doi.org/10.1155/2018/8695157>
- O’Farrell, A.-M., 1998. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *The EMBO Journal* 17, 1006–1018. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1006>
- Offit, P.A., Hackett, C.J., 2003. Addressing parents’ concerns: do vaccines cause allergic or autoimmune diseases? *Pediatrics* 111, 653–659. <https://doi.org/10.1542/peds.111.3.653>
- Okoko, T., 2018. Kolaviron and selenium reduce hydrogen peroxide-induced alterations of the inflammatory response. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16, 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.004>
- O’Neill, S.K., Liu, E., Cambier, J.C., 2009. Change you can B(cell)eive in: recent progress confirms a critical role for B cells in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16, 293–298. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32832832e06a7>
- Palmieri, E.M., McGinity, C., Wink, D.A., McVicar, D.W., 2020. Nitric Oxide in Macrophage Immunometabolism: Hiding in Plain Sight. *Metabolites* 10, 429. <https://doi.org/10.3390/metabo10110429>
- Pick, E., Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38, 161–170.
- Polychronakos, C., Li, Q., 2011. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat. Rev. Genet.* 12, 781–792. <https://doi.org/10.1038/nrg3069>
- Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., 1998. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1139–1149. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(97\)00492-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(97)00492-9)
- Radomska, D., Czarnomysy, R., Radomski, D., Bielawska, A., Bielawski, K., 2021. Selenium as a Bioactive Micronutrient in the Human Diet and Its Cancer Chemopreventive Activity. *Nutrients* 13, 1649. <https://doi.org/10.3390/nu13051649>

Chapitre 4. Bibliographie

- Rajagopalan, G., Kudva, Y.C., Sen, M.M., Marietta, E.V., Murali, N., Nath, K., Moore, J., David, C.S., 2006. IL-10-deficiency unmasks unique immune system defects and reveals differential regulation of organ-specific autoimmunity in non-obese diabetic mice. *Cytokine* 34, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.04.006>
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., Munder, M., 2014a. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., Munder, M., 2014b. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* 5, 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Rayman, M.P., 2012. Selenium and human health. *Lancet* 379, 1256–1268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)
- Raz, I., Eldor, R., Naparstek, Y., 2005. Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends in Biotechnology* 23, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.01.009>
- Regnell, S.E., Lernmark, Å., 2017. Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. *Diabetologia* 60, 1370–1381. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4308-1>
- Rewers, M., Ludvigsson, J., 2016. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet* 387, 2340–2348. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30507-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30507-4)
- Rhee, S.G., 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31, 53–59. <https://doi.org/10.1038/emm.1999.9>
- Rios-Arce, N.D., Dagenais, A., Feenstra, D., Coughlin, B., Kang, H.J., Mohr, S., McCabe, L.R., Parameswaran, N., 2020. Loss of interleukin-10 exacerbates early Type-1 diabetes-induced bone loss. *J Cell Physiol* 235, 2350–2365. <https://doi.org/10.1002/jcp.29141>
- Roep, B.O., 2003. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure. *Diabetologia* 46, 305–321. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1089-5>
- Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C., 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 6, 25–54. <https://doi.org/10.1039/C3MT00185G>
- Ruytinx, P., Proost, P., Van Damme, J., Struyf, S., 2018. Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions. *Front. Immunol.* 9, 1930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01930>
- Salles, M.S.V., Zanetti, M.A., Junior, L.C.R., Salles, F.A., Azzolini, A.E.C.S., Soares, E.M., Faccioli, L.H., Valim, Y.M.L., 2014. Performance and immune response of suckling calves fed organic selenium. *Animal Feed Science and Technology* 188, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.11.008>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schwizer, R.W., Leiter, E.H., Evans, R., 1984. Macrophage-mediated cytotoxicity against cultured pancreatic islet cells. *Transplantation* 37, 539–544. <https://doi.org/10.1097/00007890-198406000-00002>
- Selvaraj, P., Prabhu Anand, S., Harishankar, M., Alagarasu, K., 2009. Plasma 1,25 Dihydroxy Vitamin D3 Level and Expression of Vitamin D Receptor and Cathelicidin in Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical Immunology* 29, 470–478. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9277-9>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A., 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233, 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Uchida, K., 2002. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem* 277, 10459–10466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110314200>
- Shiomi, A., Usui, T., Mimori, T., 2016. GM-CSF as a therapeutic target in autoimmune diseases. *Inflamm Regen* 36, 8. <https://doi.org/10.1186/s41232-016-0014-5>

Chapitre 4. Bibliographie

- Shreshtha, S., Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Singh, S., 2018. Nitric Oxide: It's Role in Immunity. *JCDR*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2018/31817.11764>
- Sieweke, M.H., Allen, J.E., 2013. Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science* 342, 1242974–1242974. <https://doi.org/10.1126/science.1242974>
- Simmons, K.M., 2015. Type 1 diabetes: A predictable disease. *WJD* 6, 380. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.380>
- Skalickova, S., Milosavljevic, V., Cihalova, K., Horoky, P., Richtera, L., Adam, V., 2017. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition* 33, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.05.001>
- Sliem, H., Ellethy, A., Salama, M.-S., Hassan, G., 2012. Role of immune system modulation in prevention of type 1 diabetes mellitus. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16, 904. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.102989>
- Sokolovska, J., Dekante, A., Bauman, L., Pahirko, L., Valeinis, J., Dislere, K., Rovite, V., Pirags, V., Sjakste, N., 2020. Nitric oxide metabolism is impaired by type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *biom rep*. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1288>
- Southern, C., Schulster, D., Green, I.C., 1990. Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett* 276, 42–44. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80502-a](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80502-a)
- Stancioiu, F., Papadakis, G.Z., Kteniadakis, S., Izotov, B.N., Coleman, M.D., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A., 2020. A dissection of SARS-CoV2 with clinical implications (Review). *Int J Mol Med* 46, 489–508. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4636>
- Steck, A.K., Baschal, E.E., Jasinski, J.M., Boehm, B.O., Bottini, N., Concannon, P., Julier, C., Morahan, G., Noble, J.A., Polychronakos, C., She, J.X., Eisenbarth, G.S., Type 1 Diabetes Genetics Consortium, 2009. rs2476601 T allele (R620W) defines high-risk PTPN22 type 1 diabetes-associated haplotypes with preliminary evidence for an additional protective haplotype. *Genes Immun.* 10 Suppl 1, S21-26. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.87>
- Stoffels, K., Overbergh, L., Giulietti, A., Kasran, A., Bouillon, R., Gysemans, C., Mathieu, C., 2004. NOD macrophages produce high levels of inflammatory cytokines upon encounter of apoptotic or necrotic cells. *J Autoimmun* 23, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.03.012>
- Sumiya, Y., Ishikawa, M., Inoue, T., Inui, T., Kuchiike, D., Kubo, K., Uto, Y., Nishikata, T., 2015. Macrophage Activation Mechanisms in Human Monocytic Cell Line-derived Macrophages. *Anticancer Res.* 35, 4447–4451.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>
- Tinggi, U., 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med* 13, 102–108. <https://doi.org/10.1007/s12199-007-0019-4>
- Tonnus, W., Gembarde, F., Latk, M., Parmentier, S., Hugo, C., Bornstein, S.R., Linkermann, A., 2019. The clinical relevance of necroinflammation-highlighting the importance of acute kidney injury and the adrenal glands. *Cell Death Differ* 26, 68–82. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0193-5>
- Touret, N., Grinstein, S., 2006. Caractéristiques dynamiques et fonctionnelles de la membrane du phagosome. *Med Sci (Paris)* 22, 457–458. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006225457>
- Uribe-Querol, E., Rosales, C., 2020. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- Ushach, I., Zlotnik, A., 2016. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* 100, 481–489. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0316-144R>

Chapitre 4. Bibliographie

- van Dissel, J.T., Stikkelbroeck, J.J., van den Barselaar, M.T., Sluiter, W., Leijh, P.C., van Furth, R., 1987. Divergent changes in antimicrobial activity after immunologic activation of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 139, 1665–1672.
- Van Gassen, N., Staels, W., Van Overmeire, E., De Groef, S., Sojoodi, M., Heremans, Y., Leuckx, G., Van de Casteele, M., Van Ginderachter, J.A., Heimberg, H., De Leu, N., 2015. Concise Review: Macrophages: Versatile Gatekeepers During Pancreatic β -Cell Development, Injury, and Regeneration. *Stem Cells Transl Med* 4, 555–563. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0272>
- Verge, C.F., Howard, N.J., Rowley, M.J., Mackay, I.R., Zimmet, P.Z., Egan, M., Hulinska, H., Hulinsky, I., Silvestrini, R.A., Kamath, S., 1994. Anti-glutamate decarboxylase and other antibodies at the onset of childhood IDDM: a population-based study. *Diabetologia* 37, 1113–1120. <https://doi.org/10.1007/bf00418375>
- von Herrath, M., Sanda, S., Herold, K., 2007. Type 1 diabetes as a relapsing–remitting disease? *Nature Reviews Immunology* 7, 988–994. <https://doi.org/10.1038/nri2192>
- Vunta, H., Belda, B.J., Arner, R.J., Channa Reddy, C., Vanden Heuvel, J.P., Sandeep Prabhu, K., 2008. Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 1316–1323. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700346>
- Wahl, L.M., Wahl, S.M., Smythies, L.E., Smith, P.D., 2005. Isolation of Human Monocyte Populations. *CP in Immunology* 70. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0706as70>
- Wang, L., Zhang, S., Wu, H., Rong, X., Guo, J., 2019. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol* 106, 345–358. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>
- Watkins, R.A., Evans-Molina, C., Blum, J.S., DiMeglio, L.A., 2014. Established and emerging biomarkers for the prediction of type 1 diabetes: a systematic review. *Transl Res* 164, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.02.004>
- Wei, C.-C., Wang, Z.-Q., Hemann, C., Hille, R., Stuehr, D.J., 2003. A Tetrahydrobiopterin Radical Forms and then Becomes Reduced during N ω -Hydroxyarginine Oxidation by Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* 278, 46668–46673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307682200>
- Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, F.S., Szot, G.L., Bluestone, J.A., Gordon, J.I., Chervonsky, A.V., 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455, 1109–1113. <https://doi.org/10.1038/nature07336>
- Werz, O., Gerstmeier, J., Liberos, S., De la Rosa, X., Werner, M., Norris, P.C., Chiang, N., Serhan, C.N., 2018. Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat Commun* 9, 59. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02538-5>
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., Wong, S.-C., 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16–e31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W., 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xia, H., Zhang, L., Dai, J., Liu, X., Zhang, X., Zeng, Z., Jia, Y., 2021. Effect of Selenium and Peroxynitrite on Immune Function of Immature Dendritic Cells in Humans. *Med Sci Monit* 27, e929004. <https://doi.org/10.12659/MSM.929004>
- 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. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>
- Yang, P., Huang, S., Xu, A., 2016. The Oxidative Burst System in Amphioxus, in: *Amphioxus Immunity*. Elsevier, pp. 153–165. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-849903-0.00008-7>

Chapitre 4. Bibliographie

- Yang, Z., Ming, X.-F., 2014. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol* 5, 533. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00533>
- Yao, Y., Xu, X.-H., Jin, L., 2019. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front. Immunol.* 10, 792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>
- Yoon, J.-W., Jun, H.-S., 2005. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther* 12, 580–591.
- Youn, H.-S., Lim, H.J., Choi, Y.J., Lee, J.Y., Lee, M.-Y., Ryu, J.-H., 2008. Selenium suppresses the activation of transcription factor NF- κ B and IRF3 induced by TLR3 or TLR4 agonists. *International Immunopharmacology* 8, 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.12.008>
- Ysmail-Dahlouk, L., Nouari, W., Aribi, M., 2016. 1,25-dihydroxyvitamin D 3 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. *Immunology Letters* 179, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.002>
- Zamani, F., Zare Shahneh, F., Aghebati-Maleki, L., Baradaran, B., 2013. Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Adv Pharm Bull* 3, 329–332. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.053>
- Zeng, J., Zhou, J., Huang, K., 2009. Effect of selenium on pancreatic proinflammatory cytokines in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Nutr Biochem* 20, 530–536. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.012>
- Zhang, X., Goncalves, R., Mosser, D.M., 2008. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology* 83. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>
- Zizzo, G., Hilliard, B.A., Monestier, M., Cohen, P.L., 2012. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* 189, 3508–3520. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200662>

RESEARCH ARTICLE

Sodium Selenite Modulates Global Activation of Proinflammatory M1-like Macrophages, Necroinflammation and M1-like/M2-like Dichotomy at the Onset of Human Type 1 Diabetes

Mouna Nouar¹, Maroua Miliiani¹, Imène Belhassena¹, Ahlam Fatmi¹ and Mourad Aribi^{1,*}

¹Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria

Abstract: Aim: The study aims to show that sodium selenite (Ss) would have an immunomodulatory effect on the functional activity of proinflammatory macrophages (Mφs) during their extended extracellular activation at the onset of human type 1 diabetes (T1D).

Background: Exacerbated activation of proinflammatory “M1” macrophages (Mφs) can promote chronic local pancreatic islet inflammation and T1D development.

Objective: We investigated the *ex vivo* effects of Ss on the immune modulation of global/extended activation of human proinflammatory M1-like Mφs.

ARTICLE HISTORY

Methods: Experiments were carried out on primary monocytes-derived Mφs (MDMs).

Received: April 07, 2022
Revised: November 28, 2022
Accepted: December 07, 2022

DOI: 10.2174/1871530323666230201135916

Results: The levels of IL-1β, TNF-α, H₂O₂ and intracellular free calcium ions (iCa²⁺), and the ratios of IL-1β-to-IL-10 and TNF-α-to-IL-10 were markedly increased in T1D Mφs than in healthy control Mφs. Conversely, both IL-10 production and arginase 1 (ARG1) activity were downregulated in T1D Mφs. Additionally, Ss treatment induced a marked downregulation of respiratory burst, iCa²⁺ levels, M1-like Mφ-associated inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) activity, cell necrosis and related necroinflammation biomarkers, including IL-1β and TNF-α, CD14 expression, and the ratios of iNOS-to-ARG1, IL-1β-to-IL-10, and TNF-α-to-IL-10. Moreover, Ss upregulated anti-inflammatory “M2-like” Mφ activity as demonstrated by ARG1 activity and IL-10 production, as well as phagocytosis capacity.

Conclusion: Ss exerts a potent immunomodulatory role on functional activities of human proinflammatory T1D M1-like Mφs subjected to extended activation, as well as on the M1-like/M2-like dichotomy. Additionally, the current study provides a novel therapeutic approach using Ss to promote the anti-inflammatory function of Mφs at the onset of T1D.

Keywords: Extended extracellular activation spectrum, macrophage functional activities, immunomodulation, primary human M1-like monocyte-derived macrophages, sodium selenite treatment, type 1 diabetes.

1. INTRODUCTION

Mφs have been identified as one of the most critical effector cells of innate immunity that infiltrate pancreatic lymph node (PLN) to participate in β-cells destruction and T1D development [1]. Early studies demonstrating Mφs cell-mediated killing of islet cells have been performed through coculture with mouse pancreatic islet cell monolayers [2].

The current classification of Mφs into two main subtypes, so-called “classically” activated (M1) or “alternatively” acti-

vated (M2) Mφs, has led to show that the detrimental role on β-cells is attributed to the M1 (killing/fighting “nitric oxide [NO]”) subtype as proinflammatory phenotype [3,4]. In contrast, the anti-inflammatory M2 (wound healing/fixing “L-ornithine”) subtype has been known to reduce insulinitis and inflammation in the pancreas due to the production of anti-inflammatory cytokines, like IL-10 [5]. Additionally, accumulative evidence suggests that the damage caused by proinflammatory Mφs to β-cells may be due to their exacerbated, chronic and uncontrolled activation, which leads to persistent

inflammation of the pancreas [6]. Therefore, in *ex vivo* or *in vitro* studies, their “continuous” and “global/extended” activation would be of great interest to mimic their functional role at the beginning of T1D.

*Address correspondence to these authors at the ¹Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria; Tel: +213-0-556-281-751; E-mail: mourad.aribi@univ-tlemcen.dz

Modulating the inflammatory process is one of the main current approaches in T1D immunotherapy. Of note, recent evidence suggests that trace element selenium supplementation, in the form of sodium selenite (Ss, Na₂SeO₃), can be highly effective in the modulation of both innate and adaptive immune responses [7, 8]. In Mφs, Ss has been demonstrated to exert its anti-inflammatory effect by attenuating the expression of proinflammatory genes and prostaglandin D2 metabolite (15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂ [(15d-PGJ₂)] that are recognized to be induced during inflammatory processes [9,10]. Additionally, it has been shown that Ss has the ability to negatively regulate inflammation and to promote Mφ switching from classically proinflammatory phenotype toward a pro-resolving anti-inflammatory phenotype, in which a key role was attributed to cyclooxygenase (COX)-dependent cyclopentenone prostaglandins, Δ¹²-PGJ₂ and 15d-PGJ₂, that are produced in the presence of selenoproteins [11, 12]. Its ability to downregulate inflammation has been linked to its incorporation into selenoproteins, while activating pro-resolution pathways *via* differential regulation of two transcription factors, including inhibition of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF-κB) and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) in a ligand-dependent manner. Moreover, selenoproteins also downregulated inflammatory gene expression through epigenetic mechanisms by decreasing histone H4 acetylation at K12 and K16 in the COX-2 and tumor necrosis factor (TNF) promoters, and of the subunit p65 of the redox-sensitive transcription factor NF-κB [13].

On the basis of the aforementioned findings, the purpose of this study was to investigate the *ex vivo* effects of Ss on the immune modulation of necroinflammation and selected functional activities of proinflammatory human M1-like monocyte-derived Mφs subjected to global/extended activation at the onset of T1D, including respiratory burst, phagocytosis, cytokines production and the expression levels of CD14.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Ex vivo* Primary Cell Models and Independent Experiments

Mφs were generated from monocyte cells collected from volunteer patients with T1D or healthy blood donors. Cell samples were divided into four groups, including healthy control Mφs (CoMφ), and type 1 diabetic Mφs (T1DMφ), treated (Ss+) or not (Ss-, critical controls) with Ss. Experiments were carried out on supernatants, cell lysates, or on whole cells. Respiratory burst (NO and H₂O₂ production) and levels of cell necrosis, IL-1β, TNF-α and IL-10 were measured on the supernatants, while lysates were used to measure the concentration of total cell protein content, ARG1 activity and iCa²⁺ levels. Pathogen phagocytosis and killing capacities were carried out in the presence of a reference bacterial strain. iNOS activity was determined based on NO production and relative proteins. CD14 expression levels on whole cells were assessed by direct immunofluorescence using Flouid Cell Imaging Station. All experiments were repeated independently at least four times. The design of the study is summarized in Fig. (1).

2.2. Primary Cell Sample Collection Eligibility Criteria and Ethics Statement

In this *ex vivo* mechanistic study, primary cell sample collection was performed from four newly diagnosed type 1 diabetics and age-, body mass index (BMI)-, and sex-matched four healthy control volunteers. Patients and controls (three female and one male aged ≤ 20 years old in each group) belong to the same geographical locality (Northwest region of Algeria, Tlemcen). The main exclusion criteria were infection, inflammation, association with other autoimmune diseases, and all factors that may interfere with the inflammatory process. Inclusion criteria were mainly informed and written consent, adolescent or young patients with recent-onset T1D (diabetes duration < 18 months). Diabetes duration was 13.25 ± (standard error of mean) 0.0 months. Body mass index (BMI) was 20.86 ± 0.12. All donors or parents, on behalf of their child, provided informed written consent. The local Institutional Review Board/Scientific Council approved the current study (registration number DBL NM014).

2.3. Cell Samples Preparation and Treatment

2.3.1. Monocytes Isolation and Purification

Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by the differential plastic adherence method [14]. In brief, PBMCs were isolated from fresh venous blood collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-containing tubes (BD, Belliver Industrial Estate, UK) by Ficoll-Histopaque density gradient centrifugation (Ficoll-Histopaque 1077 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) [15], and cell viability was assayed by Trypan Blue Exclusion Test (TBET) [16]. PBMCs were then transferred to 24-well plate culture [15,17] containing RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 2 mM L-glutamine, 50 μg/mL gentamycin and 10% autologous serum, and incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂ with humid atmosphere [17] to allow monocytes adherence. The non-adherent cells were removed. Monocytes purity was over 90% as determined by fluorescent staining with Phycoerytherin (PE)-anti-human CD14 antibody (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) using Flouid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, MA USA) [18] after microscopically (Zeiss, Germany) cell counting by TBET.

2.3.2. M1-(Classic-) Like Proinflammatory Mφs Generation, Extension of the TLR-Ligand-Induced Inflammatory Activation Spectrum, and Ss Treatment

To generate proinflammatory M1-like Mφs, monocytes were seeded at 2 × 10⁵ cells per well in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) containing 2 mM L-glutamine, 50 μg/mL gentamycin, 10% autologous serum [15] with an equal concentration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma [19-21], and then incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO₂ with the humid atmosphere. For an extended extracellular inflammatory activation spectrum, Mφs were continuously exposed to 5 μg/mL phytohemagglutinin-L (PHA-L) lectin (PHA-L-Calbiochem), as an agonist of a panel of toll-like receptors (TLR2/6, 4 and 5) [22], through incubation for 48 h at 37 °C and 5% CO₂ with

the humid atmosphere. Finally, they were treated for 48 h with 30 nmol/L (*i.e.*, \cong 5 ng/mL) Ss [23-25] in a final volume of culture medium, in order to avoid cell death or cytotoxicity while obtaining *in vitro* responses to treatments throughout the experiments.

2.4. Mφs Lysis Assay

To determine the levels of proteins, iCa^{2+} and ARG1 activity, Mφs were lysed for 30 min with 500 μ L of 0.1 % TritonX 100 (TX100). The reaction was stopped by the addition of a mixture containing Tris-HCL and $MnCl_2$ [26].

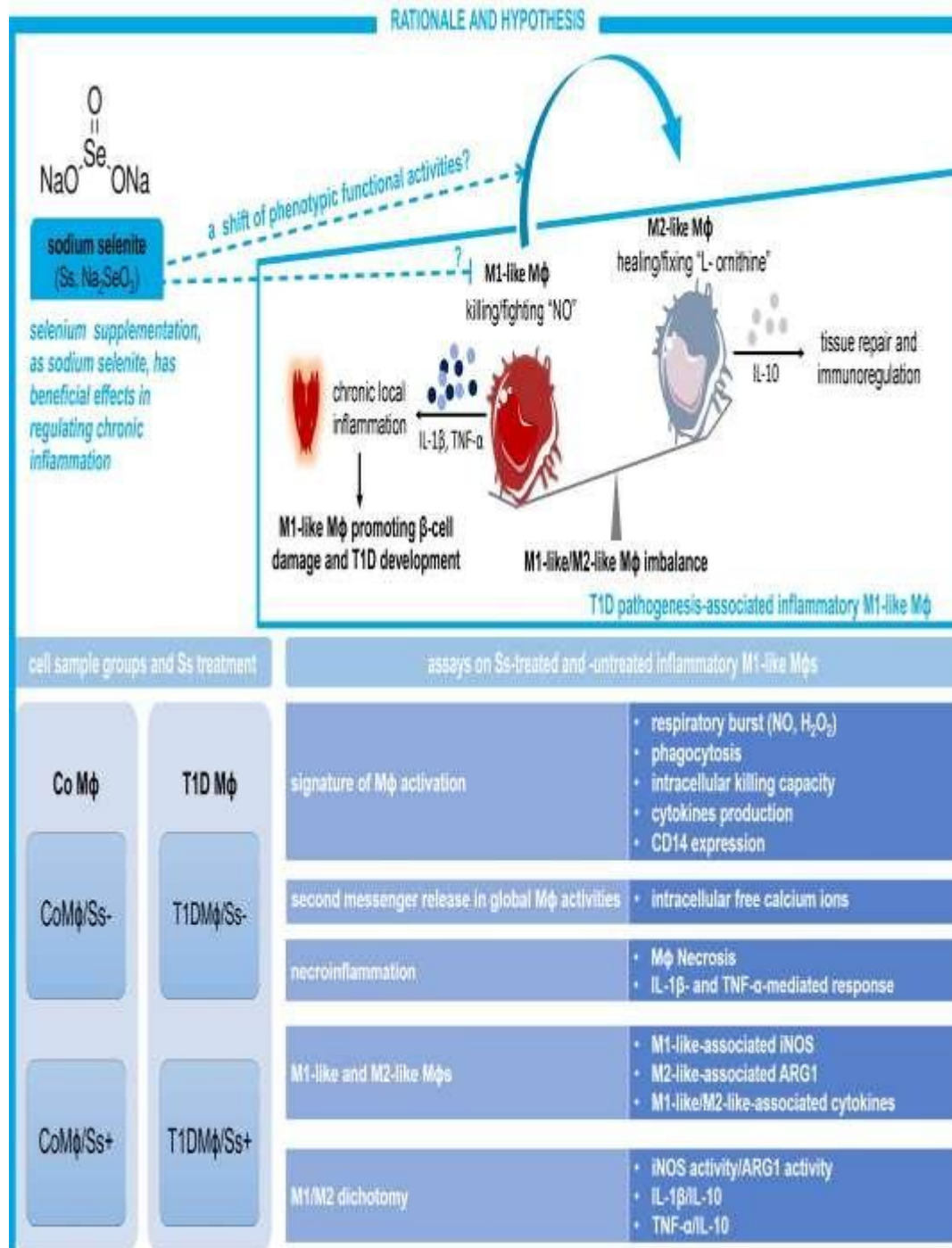


Fig. (1). Study flow-charts. Imbalance of M1-like (killing/fighting “NO”) and M2-like (healing/fixing “L-ornithine”) Mφ toward exacerbated M1-like Mφ activities has been involved in the induction of chronic local inflammation, promoting pancreatic β-cell damage and T1D development. In the current study, we evaluated the *ex vivo* effect of Ss on the immunomodulation of phenotypic functional activities of human proinflammatory M1-like Mφs at the recent-onset T1D. **Abbreviations:** ARG1: arginase 1, CD14: cluster of differentiation 14, H₂O₂: hydrogen peroxide, iCa^{2+} : intracellular free calcium ions, iNOS: inducible nitric oxide synthase, IL: interleukin, Mφ: macrophage, NO: nitric oxide, Ss: sodium selenite (Na₂SeO₃), T1D: type 1 diabetes, TNF-α: tumor necrosis factor alpha. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

2.5. Protein Assay

Total cell protein concentrations were spectrophotometrically measured in cell lysates using a commercial kit (ThermoFisher Scientific Inc., USA), based on protein-copper chelation chemistry (biuret/bicinchoninic acid [BCA] method), resulting in the formation of a quantifiable light stable purple color complex in an alkaline medium [27].

2.6. Respiratory Burst Assay

Respiratory burst assay was carried out by the determination of the levels of NO production and H₂O₂ as reactive nitrogen (RNS) and molecular oxygen (ROS) species, respectively, released by activated phagocytes in response to proinflammatory stimuli [28, 29].

2.6.1. NO Production Assay

NO production levels were evaluated by nitrite (NO₂) measurement, as a stable and final end-product of NO, based on the determination of its accumulation in cell-free culture supernatants using a sensitive colorimetric Griess reaction [30]. Briefly, after the reduction of nitrate to nitrite by adding 100 μ L 50.9 mM Vanadium (III) chloride (VCl₃) to an equal volume of supernatant, deproteinized with trichloroacetic acid (TCA), 50 μ L of the Griess reagent were added, and was incubated at 37 °C for 30 min. Reaction with nitrite causes the development of a pink color [28]. The absorbance was read at 540 nm using ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The concentration of NO production was determined from a linear standard curve established by sodium nitrite (NaNO₂) [31].

2.6.2. H₂O₂ Assay

H₂O₂ assay was performed by the modified method of Pick and Keisari, as described in detail [28, 32, 33] with some modifications. The assay was based using buffered phenol red solution (PRS [peroxide assay buffer (PAB)-phenolsulfonphthalein (PSP)-Horseradish peroxidase (HRPO, EC 1.11.1.7)]) (details of the PRS composition in [28]). Briefly, after the PRS solution was immediately prepared prior to the assay, the supernatant was added to the assay mixture at a ratio of 1-4 and incubated for 30 min at 37 °C, and then the reaction was stopped by adding 10 μ L of 1 N NaOH. Thereafter, the H₂O₂ levels were measured spectrophotometrically at 610 nm against a blank that contained buffered PRS and NaOH in appropriate concentrations. A linear standard curve was established by the use of dilutions of 30% H₂O₂.

2.7. Phagocytosis and Pathogen-Killing Assays

Phagocytosis and pathogen-killing capacities were carried out using a mixture of 2×10^5 M ϕ s and *S. aureus* (American Type Culture Collection [ATCC] 6538) strains at a multiplicity of infection (MOI) of 50 in a 24-well plate, as described [28, 33, 34]. Phagocytosis results were determined using the percentage decrease in the number of viable extracellular bacteria. The percentage of bacterial killing was calculated after the M ϕ viability assay after infection using the Trypan Blue counting test.

2.8. M1-Like_(iNOS) and M2-Like_(ARG1) Activities Assay

iNOS (EC 1.14.13.39) activity was obtained by normalizing each NO concentration to milligrams of proteins per well and expressed as pmol per mg proteins per 30 min. ARG1 (ARG1, EC 3.5.3.1) activity was measured in cell lysates. The assay was carried out using a spectrophotometric technique based on the determination of the production of urea as described [35]. The ARG1 activity was expressed as nmol urea per mg proteins per 1 h.

2.9. Necroinflammation Assays

Necroinflammation was assessed by measuring M ϕ s necrosis and M1-like proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α production by the remaining non-necrotic M ϕ s. IL-10 production was measured as M2-like regulatory/anti-inflammatory-associated cytokine [36].

2.9.1. Necrosis Assay

Necrosis assay was spectrophotometrically performed on an ELISA reader at 490 nm on cell culture supernatant by lactate dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity method [37] using a sensitive commercial kit (LDH Colorimetric Assay Kit, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA), according to the manufacturer's instructions. The relative amounts of LDH released from the cytosol of damaged cells into the supernatant were expressed as a percentage [38].

2.9.2. Remaining Non-Necrotic M ϕ s

The fact that non-necrotic M ϕ s (nonNecrM) remained at the end of each experiment among the set of viable cytokine-producing cells in response to proinflammatory stimuli and necrotic M ϕ debris, their number was estimated relative to the total number of viable M ϕ s as follows:

$$\text{Remaining nonNecrM} = \frac{\text{NVM} \times (100 - \% \text{Necrosis})}{100}$$

NVM is the number of viable M ϕ s at the end of each experiment.

The percentage of nonNecrM = 100 - % Necrosis.

2.9.3. Cytokines Assay

Concentrations of cytokines were quantified in the culture supernatant using a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). IL-1 β and IL-10 levels were measured by respective commercial ELISA kits (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). TNF- α levels were determined using ELISA sets (BD OptEIA, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA). Optical densities (ODs) were measured at 450 nm with an ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The limits of detection (LOD) were 0.3 pg/mL for IL-1 β , 1 pg/mL for TNF- α and IL-10.

2.10. iCa²⁺ Assay

The determination of iCa²⁺ levels was performed using the orthocresolphthalein (OCP) complexone method [33], based on the reaction of iCa²⁺ with OCP forming a chromogenic complex, which was measured spectrophotometrically at 560 nm against a blank. The levels of iCa²⁺ were expressed as μ g per mg proteins.

2.11. CD14 Assay

The surface expression levels of CD14 by M ϕ s were performed by direct immunofluorescence. 2×10^5 of M ϕ s were cultured in a chamber slide at 37°C and 5% CO₂. After fixation by 4% paraformaldehyde for 15 min and blocking by 5% FBS in PBS for 1 h, M ϕ s were stained with PE-labeled mouse anti-human CD14 monoclonal antibodies (BD Pharmingen) diluted at 1:750 in a block solution [39]. The stained cells were assessed using Fliod Cell Imaging Station (ThermoFischer Scientific, MA USA), and analyzed with ImageJ software (the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)[40, 41].

2.12. Statistical Analyses

The data were presented as the mean with standard error of mean (SEM). Statistical analyses were performed by a non-parametric Mann-Whitney *U*, for two groups or Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) tests, for four groups, with pairwise comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, as the data were not normally distributed. Statistics were carried out using SPSS software package version 20.0 for

windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and differences were considered statistically significant at a *p*-value less than 0.05.

3. RESULTS

3.1. Ss Downregulates Necrosis and Related Necroinflammation M1-Like M ϕ s-Associated Proinflammatory Cytokines IL-1 β and TNF- α at the Onset of T1D

As shown in Fig. (2), M ϕ necrosis and both IL-1 β and TNF- α levels were significantly increased in Ss-untreated T1D M ϕ s than those from Ss-untreated control M ϕ s; while, remaining non-necrotic M ϕ s were markedly decreased (respectively, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ by Mann-Whitney *U* test). Additionally, Ss treatment induced a marked downregulation of cell necrosis, IL-1 β and TNF- α , and, conversely, a marked upregulation of remaining non-necrotic M ϕ s in T1D M ϕ s when compared with Ss-untreated T1D M ϕ s (respectively, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.01$ by Mann-Whitney *U* test). When using the Kruskal-Wallis test, the *p*-value was less than 0.05 for cell necrosis, and less than 0.01 for remaining non-necrotic M ϕ s, IL-1 β and TNF- α .

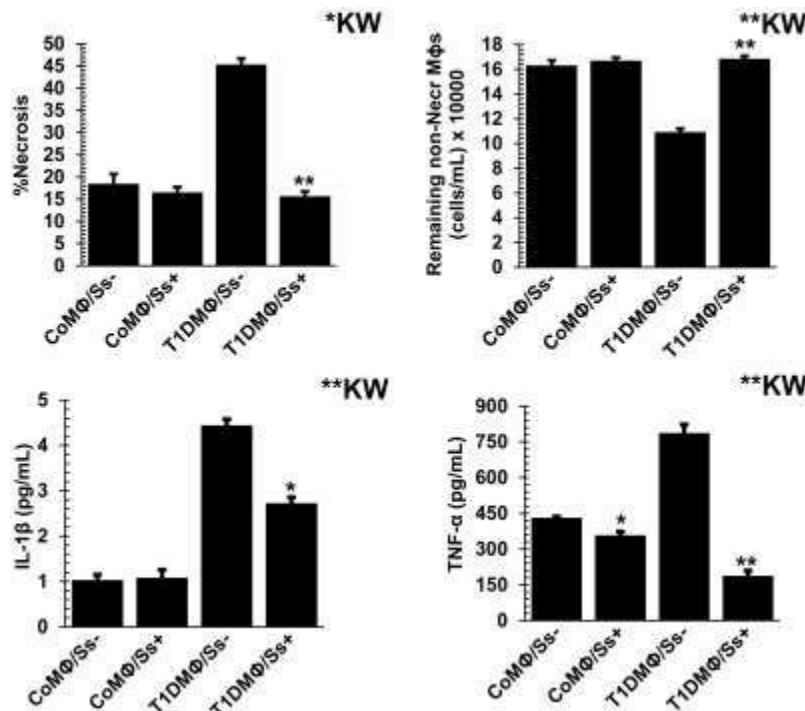


Fig. (2). Effect of sodium selenite on necroinflammation and the related production of proinflammatory M1-like IL-1 β and TNF- α cytokines at the onset of human type 1 diabetes. Cytokine levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The M ϕ necrosis assay was spectrophotometrically determined by the lactate dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity assay. The number of remaining non-necrotic M ϕ s were mathematically estimated at the end of each experiment. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 16$ in each group). The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 16$ in each group). **Abbreviations:** M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss-: control M ϕ untreated with sodium selenite, CoM ϕ /Ss+: control M ϕ treated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss-: type 1 diabetes M ϕ untreated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss+: type 1 diabetes M ϕ treated with sodium selenite, IL-1 β : interleukin-1 β , non-Necr M ϕ s: non-necrotic macrophages, TNF- α : tumor necrosis factor alpha. Statistical differences highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney *U* test. Asterisks indicate a significant difference between CoM ϕ /Ss- and CoM ϕ /Ss+ or between T1DM ϕ /Ss- and T1DM ϕ /Ss+, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, *KW: $p < 0.05$, **KW: $p < 0.01$.

3.2. Ss Enhances the Production of M2-like Mφs-Associated Anti-Inflammatory/Regulatory Cytokine IL-10 at the Onset of T1D

As depicted in Fig. (3), IL-10 production levels were similar between Ss-treated control Mφs and Ss-untreated control Mφs ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Conversely, a significant decrease in IL-10 production levels was observed in Ss-untreated T1D Mφs compared to Ss-untreated control Mφs ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, Ss treatment induced a significant upregulation of IL-10 production in T1D Mφs ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). P -value was less than 0.01 by Kruskal-Wallis test.

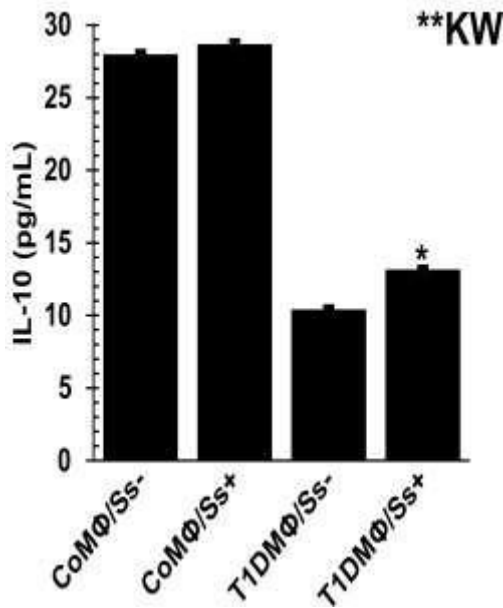


Fig. (3). Effect of sodium selenite on the production of M2-like anti-inflammatory/regulatory cytokine IL-10 by human Mφs at the onset of type 1 diabetes. The Mφ IL-10 levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 16$ in each group). **Abbreviations:** Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: Type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite, IL-10: interleukin 10. Statistical differences highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisk indicates a significant difference between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, ****KW:** $p < 0.01$.

3.3. Ss Induces Downregulation of Respiratory Burst of Proinflammatory M1-like Mφs at the Onset of T1D

As shown in Fig. (4), both NO production and H_2O_2 levels were increased in T1D Mφs than in control Mφs, but the difference did not reach a significant level for NO production (respectively, $p > 0.05$ and $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, Ss treatment induced a marked downregulation of the two variables, whether in T1D Mφs or control Mφs (for

both NO production and H_2O_2 , $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). When using Kruskal-Wallis test, $p < 0.01$.

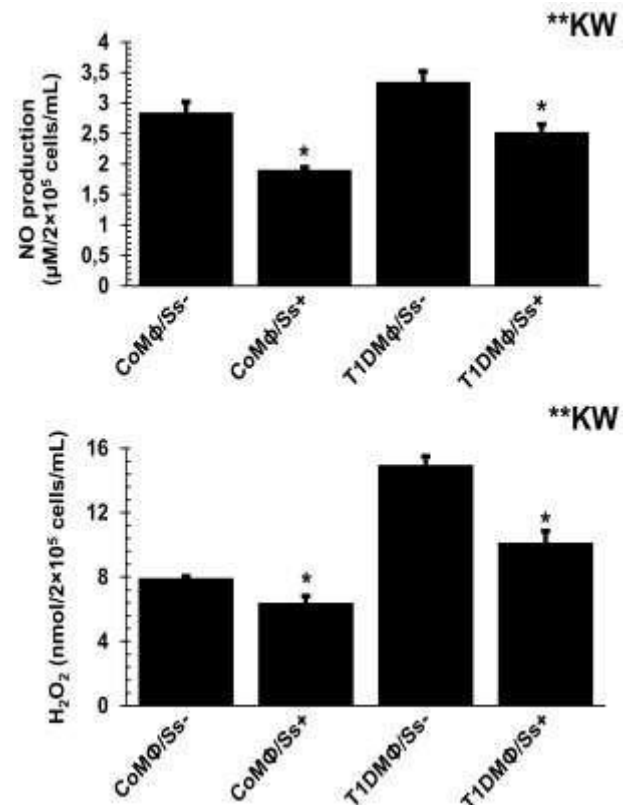


Fig. (4). Effect of sodium selenite on human Mφs respiratory burst at the onset of type 1 diabetes. The respiratory burst was performed by measurements of NO production and H_2O_2 release. The levels of NO production were measured by the sensitive Griess reaction. H_2O_2 levels were measured by the adapted method of Pick and Keisar. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of five independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 20$ in each group). **Abbreviations:** Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite, NO: nitric oxide, H_2O_2 : hydrogen peroxide. Statistical differences highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between CoMφ/Ss- and CoMφ/Ss+ or between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, ****KW:** $p < 0.01$.

3.4. Ss Treatment has a Marked effect on the Modulation of M1-like (iNOS Activity), but Appears to have a Slight Effect on M2-Like (ARG1 activity) at the Onset of T1D

As shown in Fig. (5), T1D Mφs exhibited decreased levels of ARG1 activity and increased levels of iNOS activity than in control Mφs, but the differences were not significant for the two comparisons ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, Ss treatment induced upregulation of ARG1 activity whether in control Mφs or T1D Mφs, but the difference was not significant when comparing between T1D Mφs (respectively, $p < 0.05$ and $p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Conversely, Ss treatment

induced a significant downregulation of iNOS activity in both control and T1D M ϕ s (for the two comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). For multiple comparisons by the Kruskal-Wallis test, the p -value was less than 0.05 for ARG1 activity and less than 0.01 for iNOS activity.

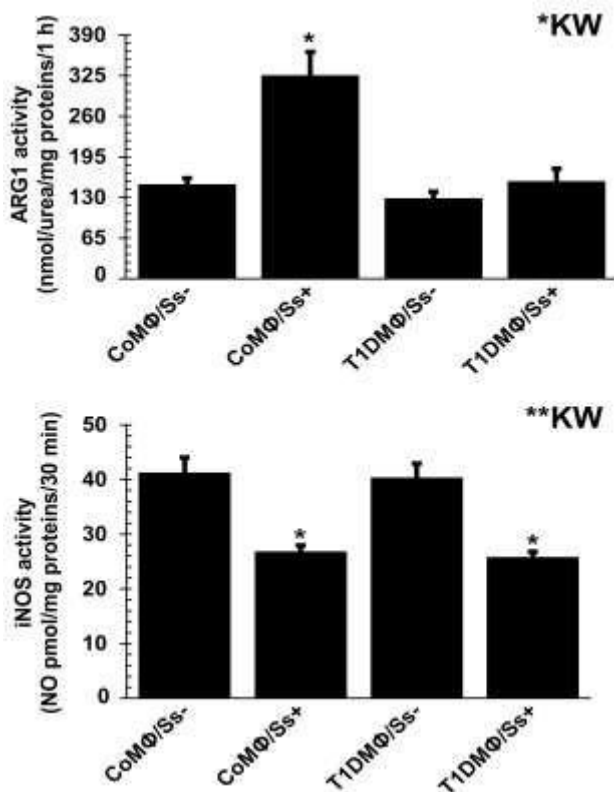


Fig. (5). Effect of sodium selenite on M1-like(iNOs activity) and M2-like(ARG 1 activity) human M ϕ s at the onset of type 1 diabetes. ARG1 activity was measured in M ϕ cell lysates using a spectrophotometric technique based on the determination of the production of urea. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of five independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 20$ in each group). iNOS concentrations were obtained by normalization relative to the protein concentration (data are presented as the average of iNOS activity with SEM). **Abbreviations:** ARG1: arginase 1, iNOS: inducible nitric oxide synthase, NO: nitric oxide, M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss-: control M ϕ untreated with sodium selenite, CoM ϕ /Ss+: control M ϕ treated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss-: type 1 diabetes M ϕ untreated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss+: type 1 diabetes M ϕ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between CoM ϕ /Ss- and CoM ϕ /Ss+ or between T1DM ϕ /Ss- and T1DM ϕ /Ss+.

* $p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, **KW: $p < 0.05$, **KW: $p < 0.01$.

3.5. Ss Induces Downregulation of $i\text{Ca}^{2+}$ Levels in Proinflammatory M1-like M ϕ s at the Onset of T1D

We observed in Fig. (6) that the levels of $i\text{Ca}^{2+}$ were significantly increased in T1D M ϕ s as compared to healthy control M ϕ s ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, Ss

treatment markedly downregulated $i\text{Ca}^{2+}$ levels in both T1D M ϕ s and control M ϕ s (for the two comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). For multiple comparisons using the Kruskal-Wallis test, the p -value was less than 0.01.

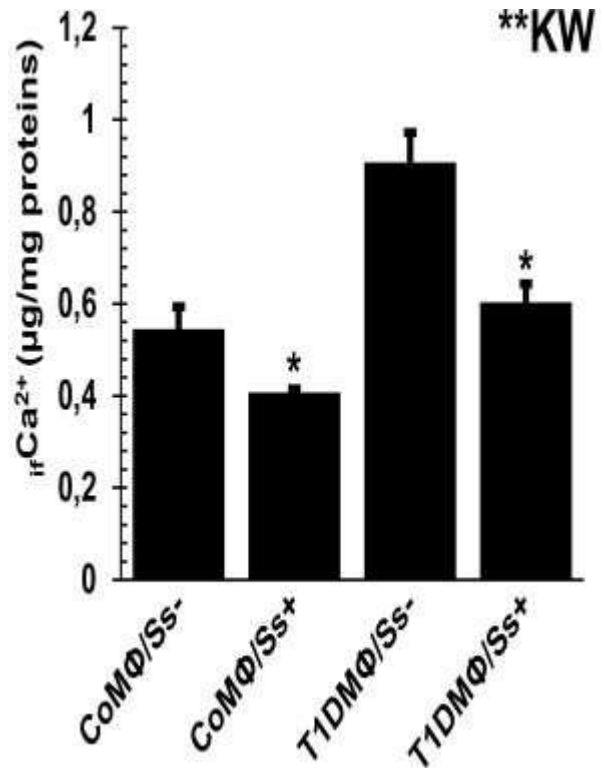


Fig. (6). Effect of sodium selenite on $i\text{Ca}^{2+}$ in human M ϕ at the onset of type 1 diabetes. Intracellular free calcium ion levels were biochemically measured by the orthocresolphthalein (OCP) complexone method. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of five independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 20$ in each group). **Abbreviations:** $i\text{Ca}^{2+}$: intracellular free calcium ions, M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss-: control M ϕ untreated with sodium selenite, CoM ϕ /Ss+: control M ϕ treated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss-: type 1 diabetes M ϕ untreated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss+: type 1 diabetes M ϕ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between CoM ϕ /Ss- and CoM ϕ /Ss+ or between T1DM ϕ /Ss- and T1DM ϕ /Ss+, * $p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, **KW: $p < 0.01$.

3.6. Ss Ameliorates Phagocytosis and Pathogen-killing Capacity of Proinflammatory M1-like M ϕ s at the Onset of T1D

As shown in Fig. (7), phagocytosis appeared to be similar between T1D M ϕ s and healthy control M ϕ s; whereas, pathogen killing was decreased in T1D M ϕ s than in control M ϕ s, but the difference was not significant (for the two comparisons, $p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). However, both phagocytosis and pathogen-killing capacity were markedly upregulated in Ss-treated T1D M ϕ s, but phagocytosis was markedly

downregulated in Ss-treated control Mφs (for the two comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). For multiple comparisons by the Kruskal-Wallis test, the p -value was less than 0.05 for both phagocytosis and pathogen killing.

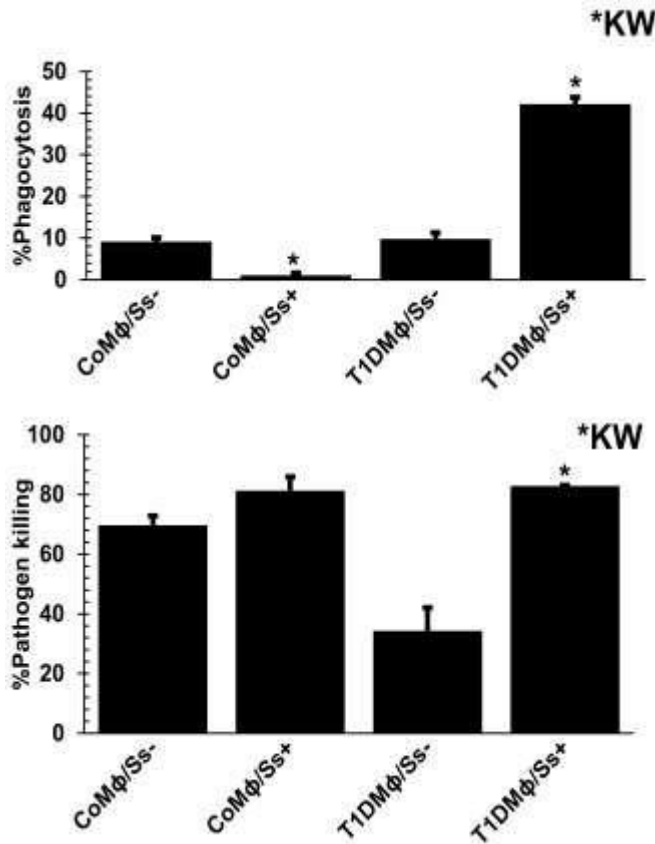


Fig. (7). Effect of sodium selenite on human Mφ phagocytosis and pathogen killing at the onset of type 1 diabetes. The bactericidal activity of Mφs was assayed using the antibiotic protection method. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls (n =16 in each group). **Abbreviations:** Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisk indicates a significant difference between CoMφ/Ss- and CoMφ/Ss+ or between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, *KW: $p < 0.05$.

3.7. Ss Immunomodulates the Balance of Proinflammatory “M1-Like” Mφ Versus Anti-Inflammatory “M2-Like” Mφ at the Onset of T1D

As illustrated in Fig. 8, the M1:M2 ratio was increased in T1D Mφs than in healthy control Mφs, as demonstrated by therapies of iNOS activity-to-ARG1 activity, IL-1β-to-IL-10 and TNF-α-to-IL-10, but the difference did not reach a significant level for iNOS activity-to-ARG1 activity ratio (respectively, $p > 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test).

Additionally, Ss treatment induced downregulation of the M1:M2 ratio in all groups of T1D Mφs (for all comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). When using the Kruskal-Wallis test, the p -value was less than 0.01 for iNOS activity-to-ARG1 activity and IL-1β-to-IL-10, and less than 0.05 for TNF-α-to-IL-10.

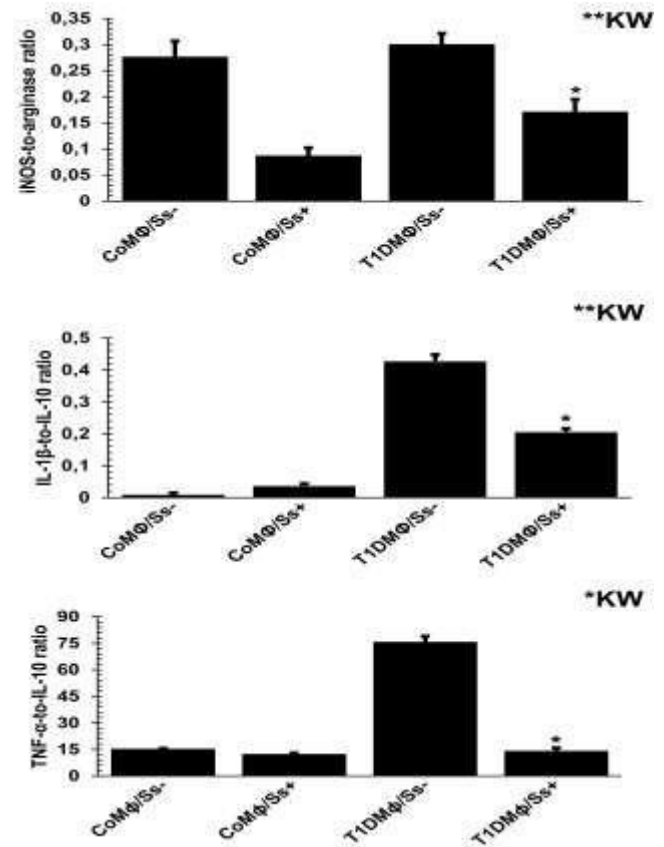


Fig. (8). Effect of sodium selenite on the balance of proinflammatory “M1-like” versus anti-inflammatory “M2-like” Mφs at the onset of type 1 diabetes. The M1-like/M2-like Mφ dichotomy was estimated by the ratios of iNOS activity-to-ARG1 activity, IL-1β-to-IL-10 and TNF-α-to-IL-10. M1: classically activated, proinflammatory/killer Mφs, M2: alternatively activated, anti-inflammatory/regulatory Mφs. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM). **Abbreviations:** Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, *KW: $p < 0.05$, **KW: $p < 0.01$.

3.8. Ss Downregulates Proinflammatory M1-Like Mφs Activation-Associated CD14 Expression at the Onset of T1D

As we see in Fig. (9), CD14 expression levels were upregulated in T1D Mφs than in healthy control Mφs, but the difference was not statistically significant ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Conversely, the expression levels of CD14

were downregulated in Ss-treated Mφs, whether in the control or T1D group, but the difference was significant only in T1DMφs (respectively, $p > 0.05$ and $p < 0.05$ by Mann-Whitney *U* test). For multiple comparisons, the p -value was less than 0.05 by the Kruskal-Wallis test.

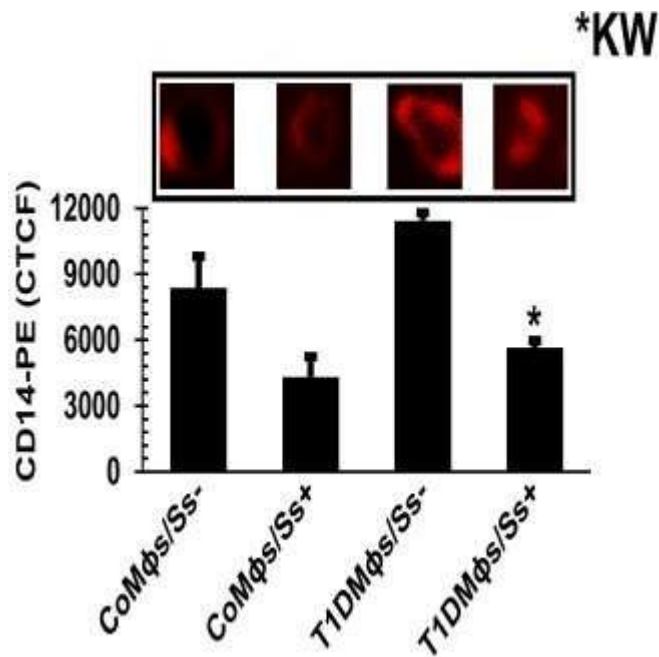


Fig. (9). Effect of sodium selenite on M1-like Mφs activation-associated CD14 expression at the onset of human type 1 diabetes. The CD14 expression of Mφs was assayed by direct immunofluorescence thanks to Floid Cell Imaging Station and then analyzed with ImageJ software. The fluorescence intensity is relative to the respective background of each cell as follows: corrected total cell fluorescence (CTCF) = integrated density - (area of selected cell × mean fluorescence of background readings). The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 16$ in each group). **Abbreviations:** CD14: cluster of differentiation 14, CD14-PE: monoclonal antibody to CD14 phycoerythrin conjugated, Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney *U* test. Asterisks indicate a significant difference between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KM) test with pair-wise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach.

*KW: $p < 0.05$. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

4. DISCUSSION

We demonstrated herein that Ss downregulates proinflammatory M1-like Mφs subjected to global/extended activation, and immunomodulates necroinflammation, phagocytosis, respiratory burst and M1-like/M2-like dichotomy at the onset of human T1D.

4.1. Effect of Ss on Necroinflammation and M2-Like Regulatory/Anti-Inflammatory Cytokine IL-10

Immune cells, including M1 Mφs, but not M2 Mφs, are more susceptible to death by necrosis and necroptosis, resulting in the release of increased levels of LDH and dead cell proteases [42]. Notably, the production of proinflammatory cytokines in response to intracellular content released as a result of plasma membrane rupture characterizing necrosis represents one of the main markers of the inflammatory response referred to as necroinflammation [43]. Hence, in our study, we observed that Ss induced both downregulation of necroinflammation, as demonstrated by decreased necrosis and M1-like proinflammatory cytokines IL-1β and TNF-α, and increased IL-10 production by remaining non-necrotic Mφs.

IL-1β exerts its cytotoxic effect on β-cells by increasing the expression of pro-apoptotic proteins, such as the first apoptosis signal (Fas/CD95). Their circulating concentration has been upregulated in newly-diagnosed type 1 diabetic patients [44]. TNF-α has been shown to inhibit insulin secretion [45], as well as upregulate the expression of major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules, thereby accelerating β-cells apoptosis, and subsequently inducing islet infiltrating antigen-presenting cells (APCs), including Mφs [46]. Additionally, TNF-α blockade has been shown to prevent non-obese diabetic (NOD) mice against disease development [47]. Conversely, IL-10 has the ability to inhibit the production and the release of immune mediators, and limits inflammatory responses by inhibiting Mφ activation [48]. So, IL-10 deficiency can result in increased pancreatitis [49]. Globally, our results are in agreement with those of a previous study carried out on U937-derived Mφs exposed to H₂O₂, as a damage signal of injury and inflammation, demonstrating that Ss treatment induced a downregulation of proinflammatory cytokines, including both IL-1β and TNF-α [50]. They are also in accordance with those reporting that IL-10 production is downregulated at the beginning of T1D [33, 51, 52]. Nevertheless, to the best of our knowledge, there is no similar study allowing comparison with our results. *In fine*, we postulated here that Ss treatment might play a potent modulating role of necroinflammatory response mediated-M1-like Mφs at the recent-onset T1D.

4.2. Effect of Ss on Mφ Respiratory Burst

It has been reported that respiratory burst plays a crucial role in the pathogenesis of T1D and its complications [53]. Activated phagocytes, like Mφs, produce high levels of ROS and RNS in T1D, including H₂O₂ and NO production, which is in accordance with our outcomes [3, 54]. It has been reported that high NO production is induced by various Mφ pro-inflammatory cytokines, including IL-1β and TNF-α, through the induction of iNOS expression by activating the transcription factors NF-κB and STAT-1 [55]. Like NO, H₂O₂ produced by Mφs can also be toxic to β-cells and cause their damage, thereby contributing potentially to the pathogenesis of T1D [56]. In our study, we observed that Ss treatment markedly downregulated both NO production and H₂O₂ levels, which is consistent with various studies [23, 50, 57]. Nevertheless, the comparison with other studies remains limited, knowing that there are no studies on the effect of Ss on the

production of NO and H₂O₂ by human Mφs during T1D, although today it has become one of the major research topics due to its role in protecting cells and well-documented immune functions.

4.3. Effect of Ss on Phagocytosis and Pathogen Capacities

Phagocytosis represents one of the best markers of overall functional phenotypic activities. It has been reported that Mφ phagocytosis is compromised in T1D [58]. In the current study, we observed that Ss has a reversing effect on both phagocytic activity and pathogen killing in T1D Mφs. Our results argue for the Ss action on Mφs phenotypic switching under inflammatory conditions. Although the anti-inflammatory effects of Ss are well documented [59, 60], their effects on the proinflammatory M1-like Mφs during T1D seem to be explored here for the first time, which should pave the way for further mechanistic investigations.

4.4. Effect of Ss on M1-Like_(iNOS) and M2-Like_(ARG1), and the Dichotomy of “M1-Like” Mφs Versus “M2-Like” Mφs

Of great interest, the upregulation of ARG1 activity may play a potent immunoregulatory role at the onset of T1D, as this results in reduced bioavailability of L-arginine for iNOS and the subsequent NO production. This appears to be an essential mechanism of “inflammation-associated immunosuppression” [33]. In our study, we observed that although ARG1 activity appears to be slightly upregulated in Ss-treated T1D Mφs, Ss remarkably reduced iNOS levels, which is consistent with both *in vivo* and *in vitro* studies [61, 62]. Moreover, a strong switch to the anti-inflammatory M2_(ARG1) phenotype would not always seem desirable in different inflammatory conditions, especially in viral infections, as has been recently reported in the COVID-19 pandemic [63]. Therefore, it should be pointed out that T1D can be caused by molecular mimicry, as the result of viral infection, which might enhance autoimmunity [64]. Of note, in some cases, interpreting results appear difficult, especially in situation where two immune variables with opposing effects increase or decrease simultaneously. Therefore, the best way to determine which variable dominates the other is to measure the ratio of the two variables. Thus, the ratio of iNOS/ARG1 activities would be more informative than iNOS or ARG1 activity determined alone. Also of note, M1-like/M2-like Mφ dichotomy also refers to the proinflammatory/anti-inflammatory cytokines ratio, which corresponds to the Th1/Th2 polarization of helper T-cells, respectively. So, in the current study, we observed that in the absence of Ss treatment, the ratios of iNOS to-ARG1 activity, IL-1β-to-IL-10 and TNF-α-to-IL-10 were markedly increased in T1D Mφs; while, all of these ratios were markedly decreased in Ss-treated Mφs. Hence, our results are in agreement with those of previous studies demonstrating that Ss has anti-inflammatory properties and it is able to phenotypic switch of proinflammatory/killer M1-like toward anti-inflammatory/regulatory M2-like dominant Mφs [65].

4.5. Effect of Ss on $i\text{Ca}^{2+}$

As a ubiquitous second messenger, $i\text{Ca}^{2+}$ can affect several biological activities of Mφ, such as cytokines production, phagocytosis, phagosome-lysosome fusion and pathogen killing [66], as well as ROS generation and respiratory burst [67].

$i\text{Ca}^{2+}$ levels should therefore be used as a potent control for each biomarker of functional activities of Mφs. In the current study, we observed that Ss treatment markedly downregulated $i\text{Ca}^{2+}$ levels, confirming results regarding phagocytosis related to anti-inflammatory M2-like Mφs [68], respiratory burst, cytokines production, and cell surface marker of Mφ activation CD14. These results corroborate our recent study on human LPS-activated GM-CSF monocyte-derived Mφs (GM-MDM) [24].

4.6. Effect of Ss on M1-Like Mφ Activation-Associated CD14 Expression

It has been reported that activated M1 Mφ phenotype is characterized by the increased expression of toll-like receptor (TLR) CD14 co-receptor, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein expressed primarily on the surface of myeloid cells. It performs multiple functions as the initiation of TLR-dependent signaling, suggesting that it may function to regulate M1-like/M2-like Mφ plasticity [69]. A previous study reported that the disease frequency was significantly decreased in CD14-deficient male and female non-obese diabetic (NOD) mice compared with their relatives [70]. In the current study, we showed that Ss downregulated the CD14 expression, suggesting that Ss behaves as a negative controller agent preventing the activation of proinflammatory M1-like Mφ function, which is facilitated by high expression of the co-receptor CD14 [71]. Mechanistically, Ss would have negative effects on the activation pathways of Mφs, which would consequently decrease the level of their CD14 expression.

Chapter 1. CONCLUSION

In conclusion, we demonstrated that Ss may be able to reverse the extended extracellular inflammatory activation spectrum of M1-like Mφs, while inducing a shift of phenotypic functional activities to anti-inflammatory M2-like Mφs. This provides a novel therapeutic approach using Ss to promote the anti-inflammatory function of Mφs at the disease onset, which might result in profound protection of β-cells against prominent proinflammatory M1-like macrophage-induced injury. In terms of perspectives, the current study should pave the way for a wide range of investigations, including, but not limited to, (i) study of intracellular signaling pathways, kinetics and mode of action of Ss during M1-M2 polarization, (ii) measure the effects of Ss on the regulation of calcium channels activity in T1D Mφs, (iii) verify *in vivo* the efficacy of Ss supplementation on the respiratory burst, cytokines production and phagocytosis, (iv) explore the effect of Ss treatment on other markers of Mφ activation and subtypes, as well as on their chemotaxis in the process of inflammation at the recent-onset T1D, and (v) mechanistic study of Ss effect on the cross-talk between proinflammatory M1-like Mφs and β-cells. Finally, although the reservoir of insulin-producing beta-cells is not yet completely damaged at the T1D onset, which makes it easier to offer immunomodulatory therapies in patients with recent-onset T1D than in pre-diabetic subjects, it would be wiser to plan such therapeutic strategies for patients with a family history of T1D or tenacious autoantibodies, and who have not yet developed T1D, *i.e.*, subjects who are at the pre-diabetes stage. So, the present study would be more interesting if it had been extended to monocyte-derived Mφs isolated at a pre-diabetic stage in order to

avoid any possible limitation, knowing that immunomodulation could have a significant effect on delaying the onset of diabetes, and, consequently, on delaying the possible development of diabetic complications, especially in patients with poor glycemic control. This study would also be even more interesting in the context of a clinical trial where a larger sample size is required.

Chapitre 2. LIST OF ABBREVIATIONS

ARG1	= Arginase 1
CD14	= Cluster of Differentiation 14
CD14-PE	= Monoclonal Antibody to CD14 Phycoerythrin Conjugated
CoMφ/Ss-	= Control Mφ Untreated with Sodium Selenite
CoMφ/Ss+	= Control Mφ Treated with Sodium Selenite
CTCF	= Corrected Total Cell Fluorescence
H ₂ O ₂	= Hydrogen Peroxide
ⁱⁱ Ca ²⁺	= Intracellular Free Calcium Ions
IL	= Interleukin
iNOS	= Inducible Nitric Oxide Synthase
KW	= Kruskal-Wallis Test
MDMs	= Monocytes-Derived Mφs
Mφ	= Macrophage
NO	= Nitric Oxide
non-Necr Mφs	= Non-Necrotic Macrophages
PE	= Phycoerythrin
PLN	= Pancreatic Lymph Node
SEM	= Standard Error of Mean
Ss	= Sodium Selenite (Na ₂ SeO ₃)
T1D	= Type 1 Diabetes
T1DMφ/Ss-	= Type 1 Diabetes Mφ Untreated with Sodium Selenite
T1DMφ/Ss+	= Type 1 Diabetes Mφ Treated with Sodium Selenite
TBET	= Trypan Blue Exclusion Test
TNF	= Tumor Necrosis Factor

Chapitre 3. ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The local Institutional Review Board/Scientific Council approved the current study (Registration Number DBL NM014).

Chapitre 4. HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals were used in this research. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of institutional and/or research committees and with the 1975 Declaration of Helsinki, as revised in 2013.

Chapitre 5. CONSENT FOR PUBLICATION

All donors or parents, on behalf of their child, provided informed written consent.

Chapitre 6. AVAILABILITY OF DATA

Data is available but cannot be accessed online.

Chapitre 7. CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

Chapitre 8. FUNDING

None.

Chapitre 9. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their deepest gratitude to all primary cell sample donors, as well as to the study teammembers of the Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, for their time and energy.

Chapitre 10. REFERENCES

- [1] Espinoza-Jiménez, A.; Peón, A.N.; Terrazas, L.I. Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes. *Mediators Inflamm.*, **2012**, *2012*, 815953. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/815953>
- [2] Schwizer, R.W.; Leiter, E.H.; Evans, R. Macrophage-mediated cytotoxicity against cultured pancreatic islet cells. *Transplantation*, **1984**, *37*(6), 539-543. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-198406000-00002> PMID: 6375012
- [3] Meares, G.P.; Fontanilla, D.; Broniowska, K.A.; Andreone, T.; Lancaster, J.R., Jr.; Corbett, J.A. Differential responses of pancreatic β-cells to ROS and RNS. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2013**, *304*(6), E614-E622. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00424.2012> PMID: 23321474
- [4] Van Gassen, N.; Staels, W.; Van Overmeire, E.; De Groef, S.; Sojoodi, M.; Heremans, Y.; Leucx, G.; Van de Castele, M.; Van Ginderachter, J.A.; Heimberg, H.; De Leu, N. Concise review: macrophages: versatile gatekeepers during pancreatic β-cell development, injury, and regeneration. *Stem Cells Transl. Med.*, **2015**, *4*(6), 555-563. <http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2014-0272> PMID: 25848123
- [5] Southern, C.; Schulster, D.; Green, I.C. Inhibition of insulin secretion by interleukin-1β and tumour necrosis factor-α via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett.*, **1990**, *276*(1-2), 42-44. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80502-A](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80502-A) PMID: 2265709
- [6] Stoffels, K.; Overbergh, L.; Giulietti, A.; Kasran, A.; Bouillon, R.; Gysemans, C.; Mathieu, C. NOD macrophages produce high levels of inflammatory cytokines upon encounter of apoptotic or necrotic cells. *J. Autoimmun.*, **2004**, *23*(1), 9-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2004.03.012> PMID: 15236748
- [7] Hoffmann, P.R.; Berry, M.J. The influence of selenium on immune responses. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*(11), 1273-1280. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700330> PMID: 18384097
- [8] Xia, H.; Zhang, L.; Dai, J.; Liu, X.; Zhang, X.; Zeng, Z.; Jia, Y. Effect of selenium and peroxynitrite on immune function of immature dendritic cells in humans. *Med. Sci. Monit.*, **2021**, *27*, e929004. <http://dx.doi.org/10.12659/MSM.929004> PMID: 33684094
- [9] Vunta, H.; Belda, B.J.; Arner, R.J.; Channa Reddy, C.; Vanden Heuvel, J.P.; Sandeep Prabhu, K. Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*(11), 1316-1323. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700346> PMID: 18481333
- [10] Shibata, T.; Kondo, M.; Osawa, T.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Uchida, K. 15-Deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*(12), 10459-10466.

- <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110314200> PMID: 11786541
- [11] Korwar, A.M.; Shay, A.E.; Basrur, V.; Conlon, K.; Prabhu, K.S. Selenoproteome identification in inflamed murine primary bone marrow-derived macrophages by Nano-Lc orbitrap fusion tribrid mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2019**, *30*(7), 1276-1283. <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-019-02192-9> PMID: 30972724
- [12] Nelson, S.M.; Shay, A.E.; James, J.L.; Carlson, B.A.; Urban, J.F., Jr; Prabhu, K.S. Selenoprotein expression in macrophages is critical for optimal clearance of parasitic helminth *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Biol. Chem.*, **2016**, *291*(6), 2787-2798. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.684738> PMID: 26644468
- [13] Narayan, V.; Ravindra, K.C.; Liao, C.; Kaushal, N.; Carlson, B.A.; Prabhu, K.S. Epigenetic regulation of inflammatory gene expression in macrophages by selenium. *J. Nutr. Biochem.*, **2015**, *26*(2), 138-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.09.009> PMID: 25458528
- [14] Wahl, L.M.; Wahl, S.M.; Smythies, L.E.; Smith, P.D. Isolation of Human Monocyte Populations. *Curr. Protoc. Immunol.*, **2005**, *70*(1) <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im0706as70> PMID: 18432977
- [15] Selvaraj, P.; Prabhu Anand, S.; Harishankar, M.; Alagarasu, K. Plasma 1,25 dihydroxy vitamin D3 level and expression of vitamin D receptor and cathelicidin in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Immunol.*, **2009**, *29*(4), 470-478. <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-009-9277-9> PMID: 19219539
- [16] Fedoroff, S.; Richardson, A., Eds.; *Protocols for neural cell culture*, 3rd ed; Humana Press: Totowa, N.J, **2001**. <http://dx.doi.org/10.1385/1592592074>
- [17] Salles, M.S.V.; Zanetti, M.A.; Junior, L.C.R.; Salles, F.A.; Azzolini, A.E.C.S.; Soares, E.M.; Faccioli, L.H.; Valim, Y.M.L. Performance and immune response of suckling calves fed organic selenium. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **2014**, *188*, 28-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.11.008>
- [18] Dahmani, Z.; Addou-Klouche, L.; Gizard, F.; Dahou, S.; Messaoud, A.; Chahinez Djebri, N.; Benaissi, M.I.; Mostefaoui, M.; Terbeche, H.; Nouari, W.; Miliani, M.; Lefranc, G.; Fernandez, A.; Lamb, N.J.; Aribi, M. Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity. *PLoS One*, **2020**, *15*(10), e0240982. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0240982> PMID: 33108409
- [19] Krausgruber, T.; Blazek, K.; Smallie, T.; Alzabin, S.; Lockstone, H.; Sahgal, N.; Hussell, T.; Feldmann, M.; Udalova, I.A. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.*, **2011**, *12*(3), 231-238. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1990> PMID: 21240265
- [20] Buchacher, T.; Ohradanova-Repic, A.; Stockinger, H.; Fischer, M.B.; Weber, V. M2 polarization of human macrophages favors survival of the intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS One*, **2015**, *10*(11), e0143593. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143593> PMID: 26606059
- [21] Shiomi, A.; Usui, T.; Mimori, T. GM-CSF as a therapeutic target in autoimmune diseases. *Inflamm. Regen.*, **2016**, *36*(1), 8. <http://dx.doi.org/10.1186/s41232-016-0014-5> PMID: 29259681
- [22] Unitt, J.; Hornigold, D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem. Pharmacol.*, **2011**, *81*(11), 1324-1328. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.010> PMID: 21420389
- [23] Aribi, M.; Meziane, W.; Habi, S.; Boulatika, Y.; Marchand, H.; Aymeric, J.L. Macrophage bactericidal activities against *Staphylococcus aureus* are enhanced *in vivo* by selenium supplementation in a dose-dependent manner. *PLoS One*, **2015**, *10*(9), e0135515. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135515> PMID: 26340099
- [24] Meziane, W.; Mekkaoui, Z.; Hai, I.; Kacimi, K.; Djilali, K.; Touil-Boukoffa, C.; Lefranc, G.; Fernandez, A.; Lamb, N.; Mennechet, F.; Aribi, M. Combination of metformin with sodium selenite induces a functional phenotypic switch of human GM-CSF monocyte-derived macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, **2019**, *73*, 212-224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.004> PMID: 31108386
- [25] Campbell, S.C.; Aldibbiat, A.; Marriott, C.E.; Landy, C.; Ali, T.; Ferris, W.F.; Butler, C.S.; Shaw, J.A.; Macfarlane, W.M. Selenium stimulates pancreatic beta-cell gene expression and enhances islet function. *FEBS Lett.*, **2008**, *582*(15), 2333-2337. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.038> PMID: 18538137
- [26] Miliani, M.; Nouar, M.; Paris, O.; Lefranc, G.; Mennechet, F.; Aribi, M. Thymoquinone potently enhances the activities of classically activated macrophages pulsed with necrotic jurkat cell lysates and the production of antitumor th1-/m1-related cytokines. *J. Interferon Cytokine Res.*, **2018**, *38*(12), 539-551. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2018.0010> PMID: 30422744
- [27] Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klensk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **1985**, *150*(1), 76-85. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7) PMID: 3843705
- [28] Aribi, M. Macrophage bactericidal assays. *Methods Mol. Biol.*, **2018**, *1784*, 135-149. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_14 PMID: 29761396
- [29] Luo, B.; Wang, J.; Liu, Z.; Shen, Z.; Shi, R.; Liu, Y.Q.; Liu, Y.; Jiang, M.; Wu, Y.; Zhang, Z. Phagocyte respiratory burst activates macrophage erythropoietin signalling to promote acute inflammation resolution. *Nat. Commun.*, **2016**, *7*(1), 12177. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12177> PMID: 27397585
- [30] Guevara, I.; Iwanejko, J.; Dembińska-Kieć, A.; Pankiewicz, J.; Wanat, A.; Anna, P.; Gołabek, I.; Bartuś, S.; Malczewska-Malec, M.; Szczudlik, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta*, **1998**, *274*(2), 177-188. [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00060-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00060-6) PMID: 9694586
- [31] Blond, D.; Raoul, H.; Le Grand, R.; Dormont, D. Nitric oxide synthesis enhances human immunodeficiency virus replication in primary human macrophages. *J. Virol.*, **2000**, *74*(19), 8904-8912. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.19.8904-8912.2000> PMID: 10982333
- [32] Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods*, **1980**, *38*(1-2), 161-170. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90340-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(80)90340-3) PMID: 6778929
- [33] Benghalem, I.; Meziane, W.; Hadjidj, Z.; Ysmail-Dahlouk, L.; Belamri, A.; Mouhadjer, K.; Aribi, M. 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. *Cytokine*, **2017**, *96*, 59-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.001> PMID: 28324804
- [34] Nouari, W.; Ysmail-Dahlouk, L.; Aribi, M. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.*, **2016**, *30*, 94-101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033> PMID: 26655879
- [35] Corraliza, I.M.; Campo, M.L.; Soler, G.; Modolell, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods*, **1994**, *174*(1-2), 231-235. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90027-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)90027-2) PMID: 8083527
- [36] Murray, P.J.; Wynn, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, **2011**, *11*(11), 723-737. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3073> PMID: 21997792
- [37] Chan, F.K.M.; Moriwaki, K.; De Rosa, M.J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.*, **2013**, *979*, 65-70. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7 PMID: 23397389
- [38] Dahou, S.; Smahi, M.C.E.; Nouari, W.; Dahmani, Z.; Benmansour, S.; Ysmail-Dahlouk, L.; Miliani, M.; Yebdri, F.; Fakir, N.; Laoufi, M.Y.; Chaib-Draa, M.; Tourabi, A.; Aribi, M. L-Threoascorbic acid treatment promotes *S. aureus*-infected primary human endothelial cells survival and function, as well as intracellular bacterial killing, and immunomodulates the release of IL-1 β and soluble ICAM-1. *Int. Immunopharmacol.*, **2021**, *95*, 107476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107476> PMID: 33676147
- [39] Belhassena, I.; Nouari, W.; Messaoud, A.; Nouar, M.; Brahim, M.; Lamara, S.A.C.; Aribi, M. Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoimmune-inflammatory disease. *Int. Immunopharmacol.*, **2020**, *83*, 106349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349> PMID: 32172203
- [40] Jackson, M.; Krasnodembskaya, A. Analysis of mitochondrial transfer in direct co-cultures of human monocyte-derived macrophages (MDM) and mesenchymal stem cells (MSC). *Bio Protoc.*, **2017**, *7*(9), e2255. <http://dx.doi.org/10.21769/BioProtoc.2255> PMID: 28534038
- [41] Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **2012**, *9*(7), 671-675.

- <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089> PMID: 22930834
- [42] Hao, Q.; Idell, S.; Tang, H. M1 macrophages are more susceptible to necroptosis. *J. Cell. Immunol.*, **2021**, 3(2), 97-102.
<http://dx.doi.org/10.33696/immunology.3.084> PMID: 33959729
- [43] Tonnus, W.; Gembardt, F.; Latk, M.; Parmentier, S.; Hugo, C.; Bornstein, S.R.; Linkermann, A. The clinical relevance of necroinflammation—highlighting the importance of acute kidney injury and the adrenal glands. *Cell Death Differ.*, **2019**, 26(1), 68-82.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41418-018-0193-5> PMID: 30224638
- [44] Aribi, M.; Moulessehou, S.; Kendouci-Tani, M.; Benabadij, A-B.; Hichami, A.; Khan, N.A. Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients. *Med. Sci. Monit.*, **2007**, 13(8), CR372-CR378.
PMID: 17660728
- [45] Yoon, J.W.; Jun, H.S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am. J. Ther.*, **2005**, 12(6), 580-591.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.mj.0000178767.67857.63>
PMID: 16280652
- [46] Lu, J.; Liu, J.; Li, L.; Lan, Y.; Liang, Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin. Transl. Immunology*, **2020**, 9(3), e1122.
<http://dx.doi.org/10.1002/cti2.1122> PMID: 32185024
- [47] Lee, L.F.; Xu, B.; Michie, S.A.; Beilhack, G.F.; Warganich, T.; Turley, S.; McDevitt, H.O. The role of TNF- α in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: Analysis of dendritic cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102(44), 15995-16000.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0508122102> PMID: 16247001
- [48] O'Farrell, A.M.; Liu, Y.; Moore, K.W.; Mui, A.L. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.*, **1998**, 17(4), 1006-1018.
<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.4.1006> PMID: 9463379
- [49] Rajagopalan, G.; Kudva, Y.C.; Sen, M.M.; Marietta, E.V.; Murali, N.; Nath, K.; Moore, J.; David, C.S. IL-10-deficiency unmasks unique immune system defects and reveals differential regulation of organ-specific autoimmunity in non-obese diabetic mice. *Cytokine*, **2006**, 34(1-2), 85-95.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2006.04.006> PMID: 16740391
- [50] Okoko, T. Kolaviron and selenium reduce hydrogen peroxide-induced alterations of the inflammatory response. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **2018**, 16(2), 485-490.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.004> PMID: 30733764
- [51] Rios-Arce, N.D.; Dagenais, A.; Feenstra, D.; Coughlin, B.; Kang, H.J.; Mohr, S.; McCabe, L.R.; Parameswaran, N. Loss of interleukin-10 exacerbates early type-1 diabetes-induced bone loss. *J. Cell. Physiol.*, **2020**, 235(3), 2350-2365.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.29141> PMID: 31538345
- [52] Ysmail-Dahlouk, L.; Nouari, W.; Aribi, M. 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. *Immunol. Lett.*, **2016**, 179, 122-130.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.002> PMID: 27717877
- [53] Sokolovska, J.; Dekante, A.; Baumane, L.; Pahirko, L.; Valeinis, J.; Dislere, K.; Rovite, V.; Pirags, V.; Sjakste, N. Nitric oxide metabolism is impaired by type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Biom Rep.*, **2020**, 12(5), 251-258.
<http://dx.doi.org/10.3892/br.2020.1288>
- [54] Fatima, N.; Faisal, S.M.; Zubair, S.; Ajmal, M.; Siddiqui, S.S.; Moin, S.; Owais, M. Role of pro-inflammatory cytokines and biochemical markers in the pathogenesis of type 1 diabetes: correlation with age and glycemic condition in diabetic human subjects. *PLoS One*, **2016**, 11(8), e0161548.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0161548> PMID: 27575603
- [55] Bedoya, F.J.; Salguero-Aranda, C.; Cahuana, G.M.; Tapia-Limonchi, R.; Soria, B.; Tejedo, J.R. Regulation of pancreatic β -cell survival by nitric oxide. *Islets*, **2012**, 4(2), 108-118.
<http://dx.doi.org/10.4161/isl.19822> PMID: 22614339
- [56] Broniowska, K.A.; Oleson, B.J.; McGraw, J.; Naatz, A.; Mathews, C.E.; Corbett, J.A. How the location of superoxide generation influences the β -cell response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **2015**, 290(12), 7952-7960.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.627869> PMID: 25648890
- [57] Chomchan, R.; Puttarak, P.; Brantner, A.; Siripongvutikorn, S. Selenium-rich ricegrass juice improves antioxidant properties and nitric oxide inhibition in macrophage cells. *Antioxidants*, **2018**, 7(4), 57.
<http://dx.doi.org/10.3390/antiox7040057>
PMID: 29652839
- [58] Geerlings, S.E.; Hoepelman, A.I.M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **1999**, 26(3-4), 259-265.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x> PMID: 10575137
- [59] Huang, Z.; Rose, A.H.; Hoffmann, P.R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.*, **2012**, 16(7), 705-743.
<http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4145>
PMID: 21955027
- [60] Han, H.W.; Yang, E.J.; Lee, S.-M. Sodium selenite alleviates breast cancer-related lymphedema independent of antioxidant defense system. *Nutrients*, **2019**, 11(5), 1021.
<http://dx.doi.org/10.3390/nu11051021>
- [61] Dhanjal, N.I.; Sharma, S.; Prabhu, K.S.; Tejo Prakash, N. Selenium supplementation through Se-rich dietary matrices can upregulate the anti-inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *Food Agric. Immunol.*, **2017**, 28(6), 1374-1392.
<http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2017.1343805> PMID: 29563666
- [62] Zeng, J.; Zhou, J.; Huang, K. Effect of selenium on pancreatic proinflammatory cytokines in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Nutr. Biochem.*, **2009**, 20(7), 530-536.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.012> PMID: 18789669
- [63] Stancioiu, F.; Papadakis, G.; Kteniadakis, S.; Izotov, B.; Coleman, M.; Spandidos, D.; Tsatsakis, A. A dissection of SARS-CoV2 with clinical implications. *Int. J. Mol. Med.*, **2020**, 46(2), 489-508.
<http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2020.4636> PMID: 32626922
- [64] Filippi, C.M.; von Herrath, M.G. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes*, **2008**, 57(11), 2863-2871.
<http://dx.doi.org/10.2337/db07-1023>
PMID: 18971433
- [65] Nelson, S.M.; Lei, X.; Prabhu, K.S. Selenium levels affect the IL-4-induced expression of alternative activation markers in murine macrophages. *J. Nutr.*, **2011**, 141(9), 1754-1761.
<http://dx.doi.org/10.3945/jn.111.141176> PMID: 21775527
- [66] Nunes, P.; Demaurex, N. The role of calcium signaling in phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.*, **2010**, 88(1), 57-68.
<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0110028>
PMID: 20400677
- [67] Kelly, E.K.; Wang, L.; Ivashkiv, L.B. Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *J. Immunol.*, **2010**, 184(10), 5545-5552.
<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901293>
PMID: 20400701
- [68] Jaggi, U.; Yang, M.; Matundan, H.H.; Hirose, S.; Shah, P.K.; Sharifi, B.G.; Ghiasi, H. Increased phagocytosis in the presence of enhanced M2-like macrophage responses correlates with increased primary and latent HSV-1 infection. *PLoS Pathog.*, **2020**, 16(10), e1008971.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008971>
PMID: 33031415
- [69] da Silva, T.A.; Zorzetto-Fernandes, A.L.V.; Cecilio, N.T.; Sardinha-Silva, A.; Fernandes, F.F.; Roque-Barreira, M.C. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Sci. Rep.*, **2017**, 7(1), 7083.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07397-0>
PMID: 28765651
- [70] Klötting, N.; Klötting, I.; Jack, R.S. CD14 triggers autoimmune Type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*, **2004**, 47(1), 151-152.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-003-1251-0>

PMID: 14614560

[71] Jimenez-Duran, G.; Luque-Martin, R.; Patel, M.; Koppe, E.; Bernard, S.; Sharp, C.; Buchan, N.; Rea, C.; de Winther, M.P.J.; Turan, N.; An-

gell, D.; Wells, C.A.; Cousins, R.; Mander, P.K.; Masters, S.L. Pharmacological validation of targets regulating CD14 during macrophage differentiation. *EBioMedicine*, **2020**, *61*, 103039. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103039> PMID: 33038762

DISCLAIMER: The above article has been published, as is, ahead-of-print, to provide early visibility but is not the final version. Major publication processes like copyediting, proofing, typesetting and further review are still to be done and may lead to changes in the final published version, if it is eventually published. All legal disclaimers that apply to the final published article also apply to this ahead-of-print version.

RESEARCH ARTICLE

Sodium Selenite Modulates Global Activation of Proinflammatory M1-like Macrophages, Necroinflammation and M1-like/M2-like Dichotomy at the Onset of Human Type 1 Diabetes

Mouna Nouar¹, Maroua Miliani¹, Imène Belhassena¹, Ahlam Fatmi¹ and Mourad Aribi^{1,*}

¹Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria

Abstract: Aim: The study aims to show that sodium selenite (Ss) would have an immunomodulatory effect on the functional activity of proinflammatory macrophages (Mφs) during their extended extracellular activation at the onset of human type 1 diabetes (T1D).

Background: Exacerbated activation of proinflammatory “M1” macrophages (Mφs) can promote chronic local pancreatic islet inflammation and T1D development.

Objective: We investigated the *ex vivo* effects of Ss on the immune modulation of global/extended activation of human proinflammatory M1-like Mφs.

Methods: Experiments were carried out on primary monocytes-derived Mφs (MDMs).

Results: The levels of IL-1β, TNF-α, H₂O₂ and intracellular free calcium ions ($_{i}Ca^{2+}$), and the ratios of IL-1β-to-IL-10 and TNF-α-to-IL-10 were markedly increased in T1D Mφs than in healthy control Mφs. Conversely, both IL-10 production and arginase 1 (ARG1) activity were downregulated in T1D Mφs. Additionally, Ss treatment induced a marked downregulation of respiratory burst, $_{i}Ca^{2+}$ levels, M1-like Mφ-associated inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) activity, cell necrosis and related necroinflammation biomarkers, including IL-1β and TNF-α, CD14 expression, and the ratios of iNOS-to-ARG1, IL-1β-to-IL-10, and TNF-α-to-IL-10. Moreover, Ss upregulated anti-inflammatory “M2-like” Mφ activity as demonstrated by ARG1 activity and IL-10 production, as well as phagocytosis capacity.

Conclusion: Ss exerts a potent immunomodulatory role on functional activities of human proinflammatory T1D M1-like Mφs subjected to extended activation, as well as on the M1-like/M2-like dichotomy. Additionally, the current study provides a novel therapeutic approach using Ss to promote the anti-inflammatory function of Mφs at the onset of T1D.

Keywords: Extended extracellular activation spectrum, macrophage functional activities, immunomodulation, primary human M1-like monocyte-derived macrophages, sodium selenite treatment, type 1 diabetes.

1. INTRODUCTION

Mφs have been identified as one of the most critical effector cells of innate immunity that infiltrate pancreatic lymph node (PLN) to participate in β-cells destruction and T1D development [1]. Early studies demonstrating Mφs cell-mediated killing of islet cells have been performed through coculture with mouse pancreatic islet cell monolayers [2].

The current classification of Mφs into two main subtypes, so-called “classically” activated (M1) or “alternatively” acti-

vated (M2) Mφs, has led to show that the detrimental role on β-cells is attributed to the M1 (killing/fighting “nitric oxide [NO]”) subtype as proinflammatory phenotype [3,4]. In contrast, the anti-inflammatory M2 (wound healing/fixing “L-ornithine”) subtype has been known to reduce insulinitis and inflammation in the pancreas due to the production of anti-inflammatory cytokines, like IL-10 [5]. Additionally, accumulative evidence suggests that the damage caused by proinflammatory Mφs to β-cells may be due to their exacerbated, chronic and uncontrolled activation, which leads to persistent inflammation of the pancreas [6]. Therefore, *ex vivo* or *in vitro* studies, their “continuous” and “global/extended” activation would be of great interest to mimic their functional role at the beginning of T1D.

*Address correspondence to these authors at the ¹Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria; Tel: +213-0-556-281-751; E-mail: mourad.aribi@univ-tlemcen.dz

Modulating the inflammatory process is one of the main current approaches in T1D immunotherapy. Of note, recent evidence suggests that trace element selenium supplementation, in the form of sodium selenite (Ss, Na_2SeO_3), can be highly effective in the modulation of both innate and adaptive immune responses [7, 8]. In M ϕ s, Ss has been demonstrated to exert its anti-inflammatory effect by attenuating the expression of proinflammatory genes and prostaglandin D2 metabolite (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 [(15d-PGJ2)]) that are recognized to be induced during inflammatory processes [9,10]. Additionally, it has been shown that Ss has the ability to negatively regulate inflammation and to promote M ϕ switching from classically proinflammatory phenotype toward a pro-resolving anti-inflammatory phenotype, in which a key role was attributed to cyclooxygenase (COX)-dependent cyclopentenone prostaglandins, Δ^{12} -PGJ2 and 15d-PGJ2, that are produced in the presence of selenoproteins [11, 12]. Its ability to downregulate inflammation has been linked to its incorporation into selenoproteins, while activating pro-resolution pathways *via* differential regulation of two transcription factors, including inhibition of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in a ligand-dependent manner. Moreover, selenoproteins also downregulated inflammatory gene expression through epigenetic mechanisms by decreasing histone H4 acetylation at K12 and K16 in the COX-2 and tumor necrosis factor (TNF) promoters, and of the subunit p65 of the redox-sensitive transcription factor NF- κ B [13].

On the basis of the aforementioned findings, the purpose of this study was to investigate the *ex vivo* effects of Ss on the immune modulation of necroinflammation and selected functional activities of proinflammatory human M1-like monocyte-derived M ϕ s subjected to global/extended activation at the onset of T1D, including respiratory burst, phagocytosis, cytokines production and the expression levels of CD14.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Ex vivo* Primary Cell Models and Independent Experiments

M ϕ s were generated from monocyte cells collected from volunteer patients with T1D or healthy blood donors. Cell samples were divided into four groups, including healthy control M ϕ s (CoM ϕ), and type 1 diabetic M ϕ s (T1DM ϕ), treated (Ss+) or not (Ss-, critical controls) with Ss. Experiments were carried out on supernatants, cell lysates, or on whole cells. Respiratory burst (NO and H_2O_2 production) and levels of cell necrosis, IL-1 β , TNF- α and IL-10 were measured on the supernatants, while lysates were used to measure the concentration of total cell protein content, ARG1 activity and Ca^{2+} levels. Pathogen phagocytosis and killing capacities were carried out in the presence of a reference bacterial strain. iNOS activity was determined based on NO production and relative proteins. CD14 expression levels on whole cells were assessed by direct immunofluorescence using Fluid Cell Imaging Station. All experiments were repeated independently at least four times. The design of the study is summarized in Fig. (1).

2.2. Primary Cell Sample Collection Eligibility Criteria and Ethics Statement

In this *ex vivo* mechanistic study, primary cell sample collection was performed from four newly diagnosed type 1 diabetics and age-, body mass index (BMI)-, and sex-matched four healthy control volunteers. Patients and controls (three female and one male aged ≤ 20 years old in each group) belong to the same geographical locality (Northwest region of Algeria, Tlemcen). The main exclusion criteria were infection, inflammation, association with other autoimmune diseases, and all factors that may interfere with the inflammatory process. Inclusion criteria were mainly informed and written consent, adolescent or young patients with recent-onset T1D (diabetes duration < 18 months). Diabetes duration was $13.25 \pm$ (standard error of mean) 0.0 months. Body mass index (BMI) was 20.86 ± 0.12 . All donors or parents, on behalf of their child, provided informed written consent. The local Institutional Review Board/Scientific Council approved the current study (registration number DBL NM014).

2.3. Cell Samples Preparation and Treatment

2.3.1. Monocytes Isolation and Purification

Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by the differential plastic adherence method [14]. In brief, PBMCs were isolated from fresh venous blood collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-containing tubes (BD, Bellerive Industrial Estate, UK) by Ficoll-Histopaque density gradient centrifugation (Ficoll-Histopaque 1077 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) [15], and cell viability was assayed by Trypan Blue Exclusion Test (TBET) [16]. PBMCs were then transferred to 24-well plate culture [15,17] containing RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 2 mM L-glutamine, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin and 10% autologous serum, and incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO_2 with humid atmosphere [17] to allow monocytes adherence. The non-adherent cells were removed. Monocytes purity was over 90% as determined by fluorescent staining with PhycoErytherin (PE)-anti-human CD14 antibody (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) using Fluid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, MA USA) [18] after microscopically (Zeiss, Germany) cell counting by TBET.

2.3.2. M1-(Classic-) Like Proinflammatory M ϕ s Generation, Extension of the TLR-Ligand-Induced Inflammatory Activation Spectrum, and Ss Treatment

To generate proinflammatory M1-like M ϕ s, monocytes were seeded at 2×10^5 cells per well in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) containing 2 mM L-glutamine, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin, 10% autologous serum [15] with an equal concentration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma [19-21], and then incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO_2 with the humid atmosphere. For an extended extracellular inflammatory activation spectrum, M ϕ s were continuously exposed to 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ phytohemagglutinin-L (PHA-L) lectin (PHA-L-Calbiochem), as an agonist of a panel of toll-like receptors (TLR2/6, 4 and 5) [22], through incubation for 48 h at 37 °C and 5% CO_2 with

the humid atmosphere. Finally, they were treated for 48 h with 30 nmol/L (*i.e.*, \cong 5 ng/mL) Ss [23-25] in a final volume of culture medium, in order to avoid cell death or cytotoxicity while obtaining *in vitro* responses to treatments throughout the experiments.

2.4. Mφs Lysis Assay

To determine the levels of proteins, iCa^{2+} and ARG1 activity, Mφs were lysed for 30 min with 500 μL of 0.1 % Triton X 100 (TX100). The reaction was stopped by the addition of a mixture containing Tris-HCL and MnCl₂ [26].

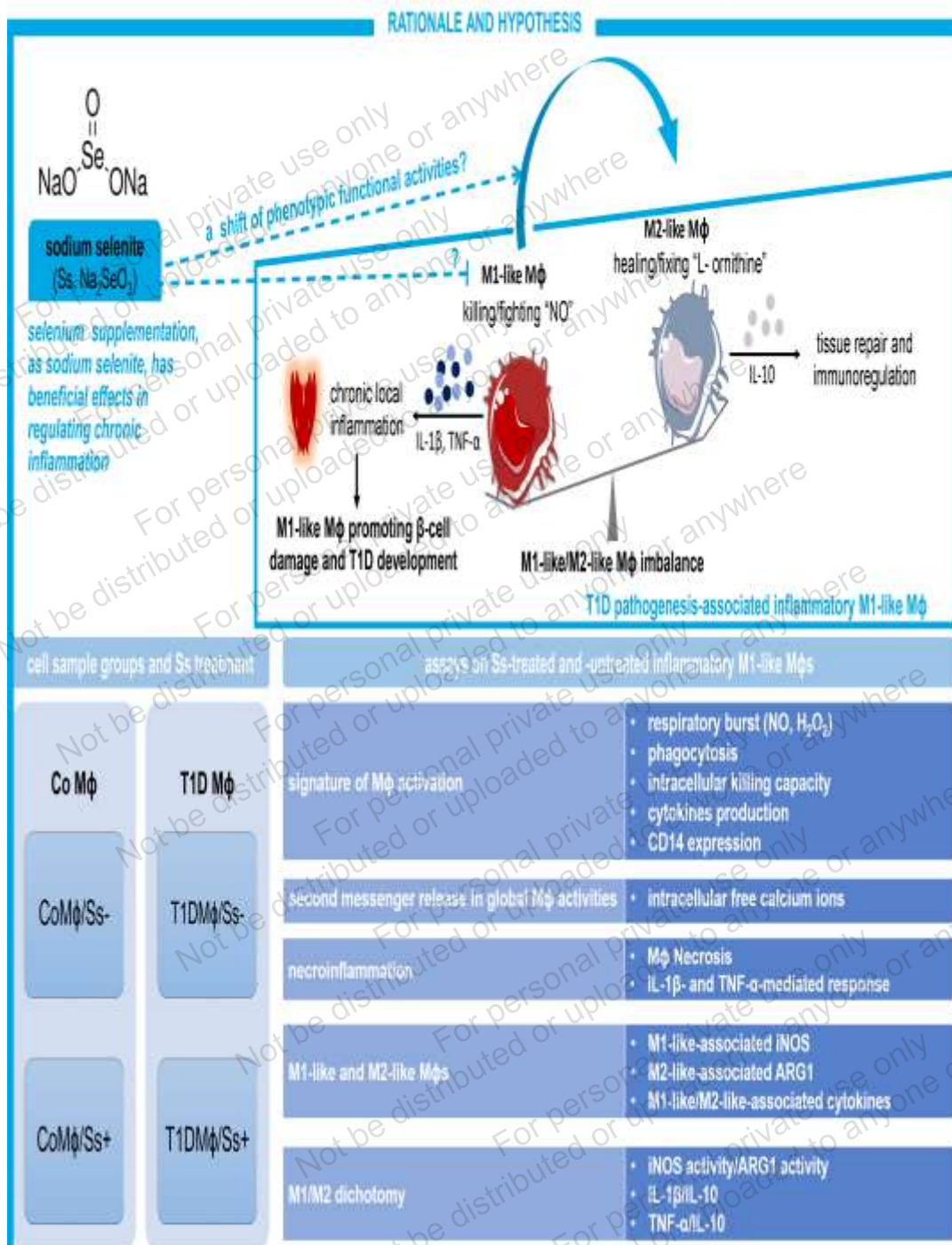


Fig. (1). Study flow-charts. Imbalance of M1-like (killing/fighting “NO”) and M2-like (healing/fixing “L-ornithine”) Mφ toward exacerbated M1-like Mφ activities has been involved in the induction of chronic local inflammation, promoting pancreatic β-cell damage and T1D development. In the current study, we evaluated the *ex vivo* effect of Ss on the immunomodulation of phenotypic functional activities of human proinflammatory M1-like Mφs at the recent-onset T1D. **Abbreviations:** ARG1: arginase 1, CD14: cluster of differentiation 14, H₂O₂: hydrogen peroxide, iCa^{2+} : intracellular free calcium ions, iNOS: inducible nitric oxide synthase, IL: interleukin, Mφ: macrophage, NO: nitric oxide, Ss: sodium selenite (Na₂SeO₃), T1D: type 1 diabetes, TNF-α: tumor necrosis factor alpha. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

2.5. Protein Assay

Total cell protein concentrations were spectrophotometrically measured in cell lysates using a commercial kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), based on protein-copper chelation chemistry (biuret/bicinchoninic acid [BCA] method), resulting in the formation of a quantifiable light stable purple-color complex in an alkaline medium [27].

2.6. Respiratory Burst Assay

Respiratory burst assay was carried out by the determination of the levels of NO production and H₂O₂ as reactive nitrogen (RNS) and molecular oxygen (ROS) species, respectively, released by activated phagocytes in response to proinflammatory stimuli [28, 29].

2.6.1. NO Production Assay

NO production levels were evaluated by nitrite (NO₂) measurement, as a stable and final end-product of NO, based on the determination of its accumulation in cell-free culture supernatants using a sensitive colorimetric Griess reaction [30]. Briefly, after the reduction of nitrate to nitrite by adding 100 µL 50.9 mM Vanadium (III) chloride (VCl₃) to an equal volume of supernatant, deproteinized with trichloroacetic acid (TCA), 50 µL of the Griess reagent were added, and was incubated at 37 °C for 30 min. Reaction with nitrite causes the development of a pink color [28]. The absorbance was read at 540 nm using ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The concentration of NO production was determined from a linear standard curve established by sodium nitrite (NaNO₂) [31].

2.6.2. H₂O₂ Assay

H₂O₂ assay was performed by the modified method of Pick and Keisari, as described in detail [28, 32, 33] with some modifications. The assay was based using buffered phenol red solution (PRS [peroxide assay buffer (PAB)-phenolsulfonphthalein (PSP)-Horseradish peroxidase (HRPO, EC 1.11.1.7)]) (details of the PRS composition in [28]). Briefly, after the PRS solution was immediately prepared prior to the assay, the supernatant was added to the assay mixture at a ratio of 1-4 and incubated for 30 min at 37 °C, and then the reaction was stopped by adding 10 µL of 1 N NaOH. Thereafter, the H₂O₂ levels were measured spectrophotometrically at 610 nm against a blank that contained buffered PRS and NaOH in appropriate concentrations. A linear standard curve was established by the use of dilutions of 30% H₂O₂.

2.7. Phagocytosis and Pathogen-Killing Assays

Phagocytosis and pathogen-killing capacities were carried out using a mixture of 2×10^5 Mφs and *S. aureus* (American Type Culture Collection [ATCC] 6538) strains at a multiplicity of infection (MOI) of 50 in a 24-well plate, as described [28, 33, 34]. Phagocytosis results were determined using the percentage decrease in the number of viable extracellular bacteria. The percentage of bacterial killing was calculated after the Mφ viability assay after infection using the Trypan Blue counting test.

2.8. M1-Like_(iNOS) and M2-Like_(ARG1) Activities Assay

iNOS (EC 1.14.13.39) activity was obtained by normalizing each NO concentration to milligrams of proteins per well and expressed as pmol per mg proteins per 30 min. ARG1 (ARG1, EC 3.5.3.1) activity was measured in cell lysates. The assay was carried out using a spectrophotometric technique based on the determination of the production of urea as described [35]. The ARG1 activity was expressed as nmol urea per mg proteins per 1 h.

2.9. Necroinflammation Assays

Necroinflammation was assessed by measuring Mφs necrosis and M1-like proinflammatory cytokines IL-1β and TNF-α production by the remaining non-necrotic Mφs. IL-10 production was measured as M2-like regulatory/anti-inflammatory-associated cytokine [36].

2.9.1. Necrosis Assay

Necrosis assay was spectrophotometrically performed on an ELISA reader at 490 nm on cell culture supernatant by lactate dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity method [37] using a sensitive commercial kit (LDH Colorimetric Assay Kit, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA), according to the manufacturer's instructions. The relative amounts of LDH released from the cytosol of damaged cells into the supernatant were expressed as a percentage [38].

2.9.2. Remaining Non-Necrotic Mφs

The fact that non-necrotic Mφs (nonNecrM) remained at the end of each experiment among the set of viable cytokine-producing cells in response to proinflammatory stimuli and necrotic Mφ debris, their number was estimated relative to the total number of viable Mφs as follows:

$$\text{Remaining nonNecrM} = \frac{\text{NVM} \times (100 - \% \text{Necrosis})}{100}$$

NVM is the number of viable Mφs at the end of each experiment.

The percentage of nonNecrM = 100 - % Necrosis.

2.9.3. Cytokines Assay

Concentrations of cytokines were quantified in the culture supernatant using a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). IL-1β and IL-10 levels were measured by respective commercial ELISA kits (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). TNF-α levels were determined using ELISA sets (BD OptEIA, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA). Optical densities (ODs) were measured at 450 nm with an ELISA plate reader (BiochromAnthos 2020, Cambridge, UK). The limits of detection (LOD) were 0.3 pg/mL for IL-1β, 1 pg/mL for TNF-α and IL-10.

2.10. ⁴⁵Ca²⁺ Assay

The determination of ⁴⁵Ca²⁺ levels was performed using the orthochresolphthalein (OCP) complexone method [33], based on the reaction of ⁴⁵Ca²⁺ with OCP forming a chromogenic complex, which was measured spectrophotometrically at 560 nm against a blank. The levels of ⁴⁵Ca²⁺ were expressed as µg per mg proteins.

2.11. CD14 Assay

The surface expression levels of CD14 by M ϕ s were performed by direct immunofluorescence. 2×10^5 of M ϕ s were cultured in a chamber slide at 37°C and 5% CO₂. After fixation by 4% paraformaldehyde for 15 min and blocking by 5% FBS in PBS for 1 h, M ϕ s were stained with PE-labeled mouse anti-human CD14 monoclonal antibodies (BD Pharmingen) diluted at 1:750 in a block solution [39]. The stained cells were assessed using Fliod Cell Imaging Station (Thermo Fischer Scientific, MA USA), and analyzed with ImageJ software (the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [40, 41].

2.12. Statistical Analyses

The data were presented as the mean with standard error of mean (SEM). Statistical analyses were performed by a non-parametric Mann-Whitney *U*, for two groups or Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) tests, for four groups, with pairwise comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, as the data were not normally distributed. Statistics were carried out using SPSS software package version 20.0 for

windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and differences were considered statistically significant at a *p*-value less than 0.05.

3. RESULTS

3.1. Ss Downregulates Necrosis and Related Necroinflammation M1-Like M ϕ s-Associated Proinflammatory Cytokines IL-1 β and TNF- α at the Onset of T1D

As shown in Fig. (2), M ϕ necrosis and both IL-1 β and TNF- α levels were significantly increased in Ss-untreated T1D M ϕ s than those from Ss-untreated control M ϕ s; while, remaining non-necrotic M ϕ s were markedly decreased (respectively, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ by Mann-Whitney *U* test). Additionally, Ss treatment induced a marked downregulation of cell necrosis, IL-1 β and TNF- α , and, conversely, a marked upregulation of remaining non-necrotic M ϕ s in T1D M ϕ s when compared with Ss-untreated T1D M ϕ s (respectively, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.01$ by Mann-Whitney *U* test). When using the Kruskal-Wallis test, the *p*-value was less than 0.05 for cell necrosis, and less than 0.01 for remaining non-necrotic M ϕ s, IL-1 β and TNF- α .

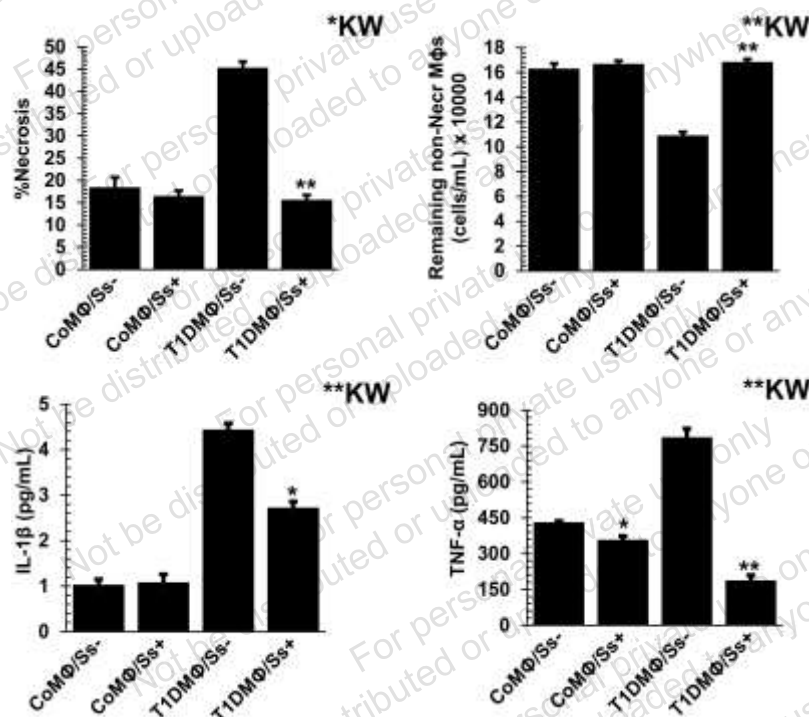


Fig. (2). Effect of sodium selenite on necroinflammation and the related production of proinflammatory M1-like IL-1 β and TNF- α cytokines at the onset of human type 1 diabetes. Cytokine levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The M ϕ necrosis assay was spectrophotometrically determined by the lactate dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity assay. The number of remaining non-necrotic M ϕ s were mathematically estimated at the end of each experiment. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 16$ in each group). The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 16$ in each group). **Abbreviations:** M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss-: control M ϕ untreated with sodium selenite, CoM ϕ /Ss+: control M ϕ treated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss-: type 1 diabetes M ϕ untreated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss+: type 1 diabetes M ϕ treated with sodium selenite, IL-1 β : interleukin-1 β , non-Necr M ϕ s: non-necrotic macrophages, TNF- α : tumor necrosis factor alpha. Statistical differences highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney *U* test. Asterisks indicate a significant difference between CoM ϕ /Ss- and CoM ϕ /Ss+ or between T1DM ϕ /Ss- and T1DM ϕ /Ss+, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, *KW: $p < 0.05$, **KW: $p < 0.01$.

3.2. Ss Enhances the Production of M2-like Mφs-Associated Anti-Inflammatory/Regulatory Cytokine IL-10 at the Onset of T1D

As depicted in Fig. (3), IL-10 production levels were similar between Ss-treated control Mφs and Ss-untreated control Mφs ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Conversely, a significant decrease in IL-10 production levels was observed in Ss-untreated T1D Mφs compared to Ss-untreated control Mφs ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, Ss treatment induced a significant upregulation of IL-10 production in T1D Mφs ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). P -value was less than 0.01 by Kruskal-Wallis test.

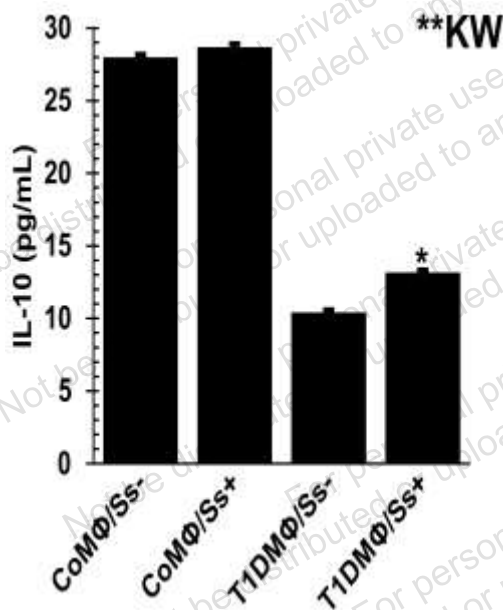


Fig. (3). Effect of sodium selenite on the production of M2-like anti-inflammatory/regulatory cytokine IL-10 by human Mφs at the onset of type 1 diabetes. The Mφ IL-10 levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 16$ in each group). **Abbreviations:** Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: Type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite, IL-10: interleukin 10. Statistical differences highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisk indicates a significant difference between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, ****KW:** $p < 0.01$.

3.3. Ss Induces Downregulation of Respiratory Burst of Proinflammatory M1-like Mφs at the Onset of T1D

As shown in Fig. (4), both NO production and H_2O_2 levels were increased in T1D Mφs than in control Mφs, but the difference did not reach a significant level for NO production (respectively, $p > 0.05$ and $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, Ss treatment induced a marked downregulation of the two variables, whether in T1D Mφs or control Mφs (for

both NO production and H_2O_2 , $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). When using Kruskal-Wallis test, $p < 0.01$.

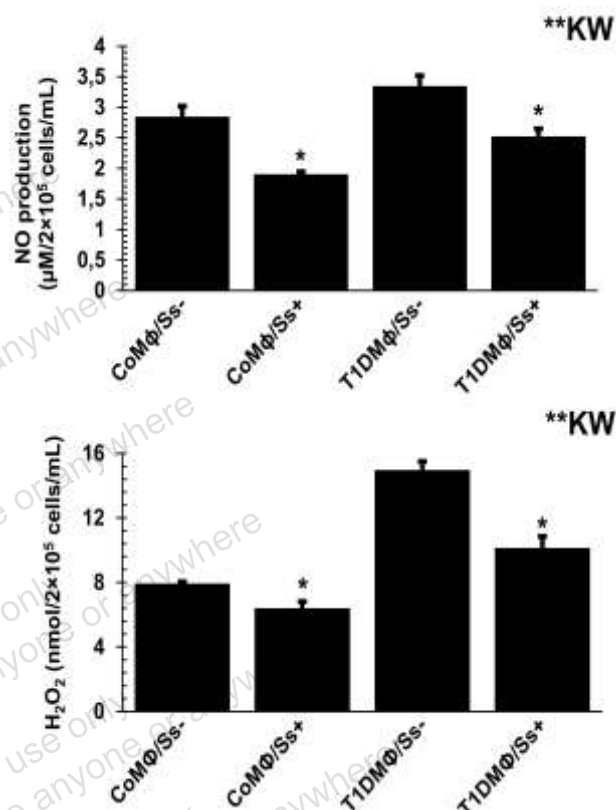


Fig. (4). Effect of sodium selenite on human Mφs respiratory burst at the onset of type 1 diabetes. The respiratory burst was performed by measurements of NO production and H_2O_2 release. The levels of NO production were measured by the sensitive Griess reaction. H_2O_2 levels were measured by the adapted method of Pick and Keisar. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of five independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 20$ in each group). **Abbreviations:** Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite, NO: nitric oxide, H_2O_2 : hydrogen peroxide. Statistical differences highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between CoMφ/Ss- and CoMφ/Ss+ or between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, ****KW:** $p < 0.01$.

3.4. Ss Treatment has a Marked effect on the Modulation of M1-like (iNOS Activity), but Appears to have a Slight Effect on M2-Like (ARG1 activity) at the Onset of T1D

As shown in Fig. (5), T1D Mφs exhibited decreased levels of ARG1 activity and increased levels of iNOS activity than in control Mφs, but the differences were not significant for the two comparisons ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, Ss treatment induced upregulation of ARG1 activity whether in control Mφs or T1D Mφs, but the difference was not significant when comparing between T1D Mφs (respectively, $p < 0.05$ and $p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Conversely, Ss treatment

induced a significant downregulation of iNOS activity in both control and T1D Mφs (for the two comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). For multiple comparisons by the Kruskal-Wallis test, the p -value was less than 0.05 for ARG1 activity and less than 0.01 for iNOS activity.

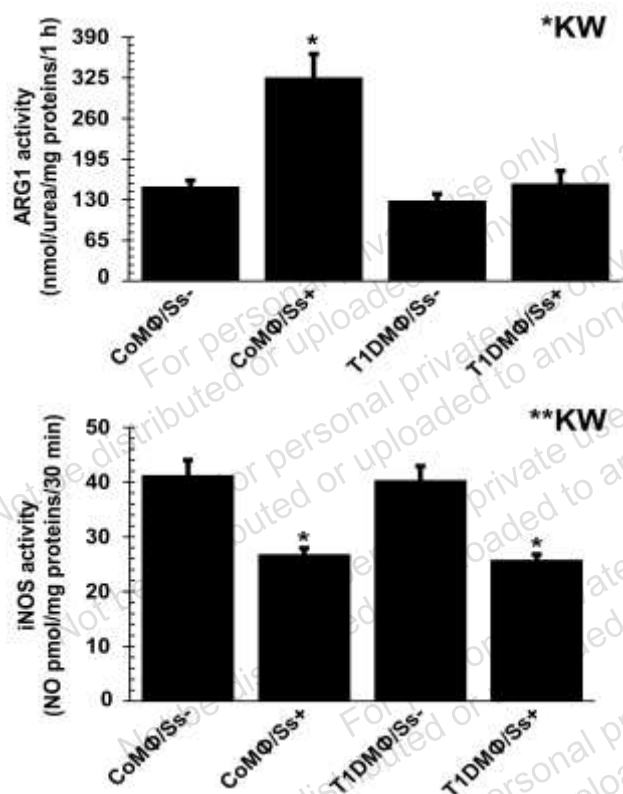


Fig. (5). Effect of sodium selenite on M1-like(iNOS activity) and M2-like(ARG 1 activity) human Mφs at the onset of type 1 diabetes. ARG1 activity was measured in Mφ cell lysates using a spectrophotometric technique based on the determination of the production of urea. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of five independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 20$ in each group). iNOS concentrations were obtained by normalization relative to the protein concentration (data are presented as the average of iNOS activity with SEM). **Abbreviations:** ARG1: arginase 1, iNOS: inducible nitric oxide synthase, NO: nitric oxide, Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between CoMφ/Ss- and CoMφ/Ss+ or between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, * $p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, **KW: $p < 0.01$.

3.5. Ss Induces Downregulation of $i\text{Ca}^{2+}$ Levels in Proinflammatory M1-like Mφs at the Onset of T1D

We observed in Fig. (6) that the levels of $i\text{Ca}^{2+}$ were significantly increased in T1D Mφs as compared to healthy control Mφs ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, Ss

treatment markedly downregulated $i\text{Ca}^{2+}$ levels in both T1D Mφs and control Mφs (for the two comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). For multiple comparisons using the Kruskal-Wallis test, the p -value was less than 0.01.

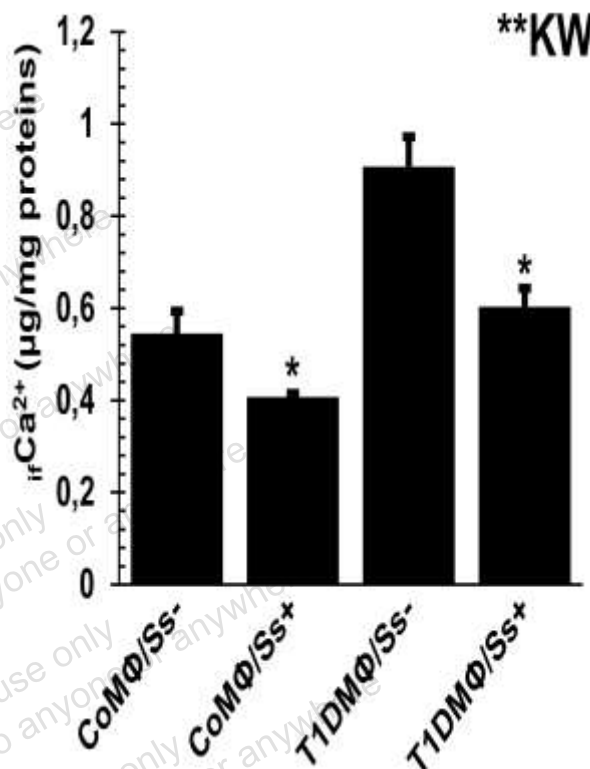


Fig. (6). Effect of sodium selenite on $i\text{Ca}^{2+}$ in human Mφ at the onset of type 1 diabetes. Intracellular free calcium ion levels were biochemically measured by the orthocresolphthalein (OCP) complexone method. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of five independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 20$ in each group). **Abbreviations:** $i\text{Ca}^{2+}$: intracellular free calcium ions, Mφ: macrophage, CoMφ/Ss-: control Mφ untreated with sodium selenite, CoMφ/Ss+: control Mφ treated with sodium selenite, T1DMφ/Ss-: type 1 diabetes Mφ untreated with sodium selenite, T1DMφ/Ss+: type 1 diabetes Mφ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between CoMφ/Ss- and CoMφ/Ss+ or between T1DMφ/Ss- and T1DMφ/Ss+, * $p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, **KW: $p < 0.01$.

3.6. Ss Ameliorates Phagocytosis and Pathogen-killing Capacity of Proinflammatory M1-like Mφs at the Onset of T1D

As shown in Fig. (7), phagocytosis appeared to be similar between T1D Mφs and healthy control Mφs; whereas, pathogen killing was decreased in T1D Mφs than in control Mφs, but the difference was not significant (for the two comparisons, $p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). However, both phagocytosis and pathogen-killing capacity were markedly upregulated in Ss-treated T1D Mφs, but phagocytosis was markedly

downregulated in Ss-treated control M ϕ s (for the two comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). For multiple comparisons by the Kruskal-Wallis test, the p -value was less than 0.05 for both phagocytosis and pathogen killing.

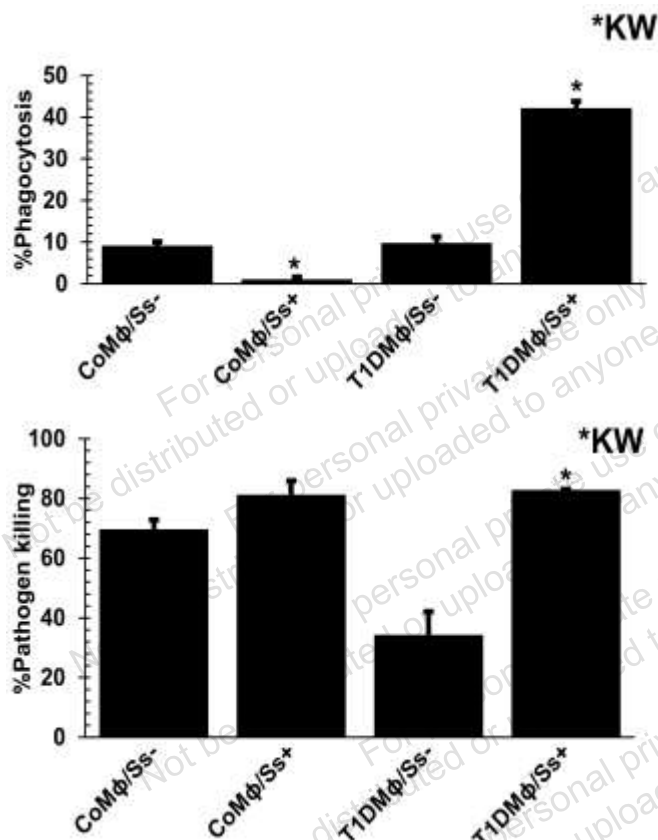


Fig. (7). Effect of sodium selenite on human M ϕ phagocytosis and pathogen killing at the onset of type 1 diabetes. The bactericidal activity of M ϕ s was assayed using the antibiotic protection method. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls (n = 16 in each group). **Abbreviations:** M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss-: control M ϕ untreated with sodium selenite, CoM ϕ /Ss+: control M ϕ treated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss-: type 1 diabetes M ϕ untreated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss+: type 1 diabetes M ϕ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisk indicates a significant difference between CoM ϕ /Ss- and CoM ϕ /Ss+ or between T1DM ϕ /Ss- and T1DM ϕ /Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, *KW: $p < 0.05$.

3.7. Ss Immunomodulates the Balance of Proinflammatory “M1-Like” M ϕ Versus Anti-Inflammatory “M2-Like” M ϕ at the Onset of T1D

As illustrated in Fig. 8, the M1:M2 ratio was increased in T1D M ϕ s than in healthy control M ϕ s, as demonstrated by the ratios of iNOS activity-to-ARG1 activity, IL-1 β -to-IL-10 and TNF- α -to-IL-10, but the difference did not reach a significant level for iNOS activity-to-ARG1 activity ratio (respectively, $p > 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test).

Additionally, Ss treatment induced downregulation of the M1:M2 ratio in all groups of T1D M ϕ s (for all comparisons, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). When using the Kruskal-Wallis test, the p -value was less than 0.01 for iNOS activity-to-ARG1 activity and IL-1 β -to-IL-10, and less than 0.05 for TNF- α -to-IL-10.

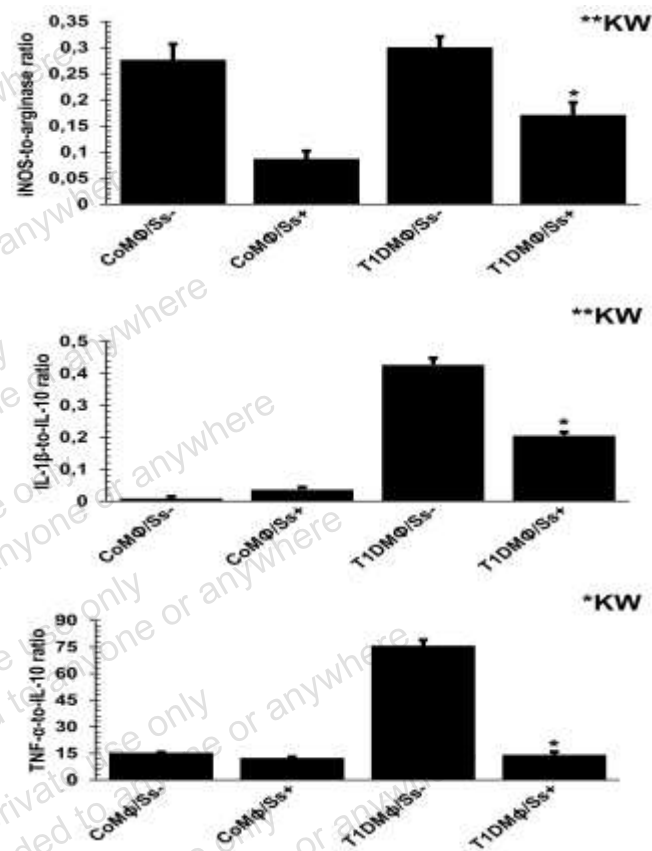


Fig. (8). Effect of sodium selenite on the balance of proinflammatory “M1-like” versus anti-inflammatory “M2-like” M ϕ s at the onset of type 1 diabetes. The M1-like/M2-like dichotomy was estimated by the ratios of iNOS activity-to-ARG1 activity, IL-1 β -to-IL-10 and TNF- α -to-IL-10. M1: classically activated, proinflammatory/killer M ϕ s, M2: alternatively activated, anti-inflammatory/regulatory M ϕ s. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM). **Abbreviations:** M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss-: control M ϕ untreated with sodium selenite, CoM ϕ /Ss+: control M ϕ treated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss-: type 1 diabetes M ϕ untreated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss+: type 1 diabetes M ϕ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between T1DM ϕ /Ss- and T1DM ϕ /Ss+, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, *KW: $p < 0.05$, **KW: $p < 0.01$.

3.8. Ss Downregulates Proinflammatory M1-Like M ϕ s Activation-Associated CD14 Expression at the Onset of T1D

As we see in Fig. (9), CD14 expression levels were upregulated in T1D M ϕ s than in healthy control M ϕ s, but the difference was not statistically significant ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Conversely, the expression levels of CD14

were downregulated in Ss-treated M ϕ s, whether in the control or T1D group, but the difference was significant only in T1D M ϕ s (respectively, $p > 0.05$ and $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). For multiple comparisons, the p -value was less than 0.05 by the Kruskal-Wallis test.

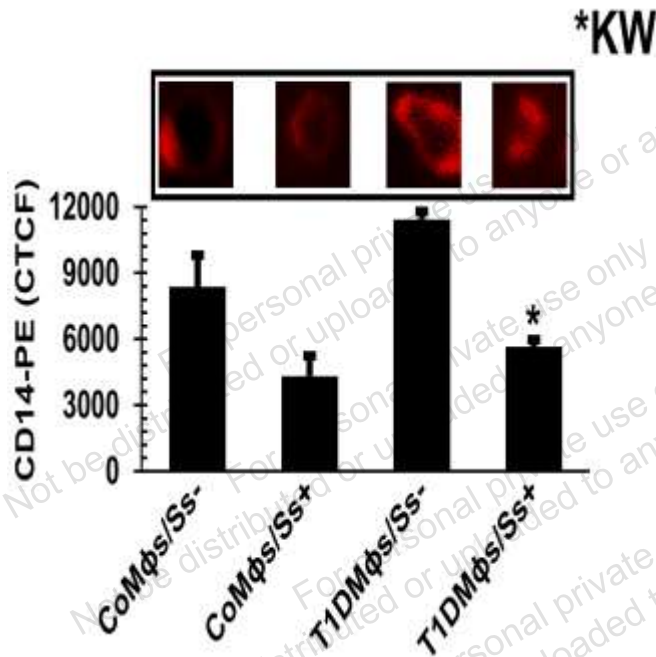


Fig. (9). Effect of sodium selenite on M1-like M ϕ s activation-associated CD14 expression at the onset of human type 1 diabetes. The CD14 expression of M ϕ s was assayed by direct immunofluorescence thanks to Fluid Cell Imaging Station and then analyzed with ImageJ software. The fluorescence intensity is relative to the respective background of each cell as follows: corrected total cell fluorescence (CTCF) = integrated density - (area of selected cell \times mean fluorescence of background readings). The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM) of four independent experiments performed on cell samples isolated from four volunteers with T1D and four healthy controls ($n = 16$ in each group). **Abbreviations:** CD14: cluster of differentiation 14, CD14-PE: monoclonal antibody to CD14 phycoerythrin conjugated, M ϕ : macrophage, CoM ϕ /Ss⁻: control M ϕ untreated with sodium selenite, CoM ϕ /Ss⁺: control M ϕ treated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss⁻: type 1 diabetes M ϕ untreated with sodium selenite, T1DM ϕ /Ss⁺: type 1 diabetes M ϕ treated with sodium selenite. Statistical difference highlighted among two groups are performed by Mann-Whitney U test. Asterisks indicate a significant difference between T1DM ϕ /Ss⁻ and T1DM ϕ /Ss⁺, $*p < 0.05$. Statistical difference between all groups are determined by a non-parametric Kruskal-Wallis (KM) test with pairwise multiple comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, *KW: $p < 0.05$. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

4. DISCUSSION

We demonstrated herein that Ss downregulates proinflammatory M1-like M ϕ s subjected to global/extended activation, and immunomodulates necroinflammation, phagocytosis, respiratory burst and M1-like/M2-like dichotomy at the onset of human T1D.

4.1. Effect of Ss on Necroinflammation and M2-Like Regulatory/Anti-Inflammatory Cytokine IL-10

Immune cells, including M1 M ϕ s, but not M2 M ϕ s, are more susceptible to death by necrosis and necroptosis, resulting in the release of increased levels of LDH and dead cell proteases [42]. Notably, the production of proinflammatory cytokines in response to intracellular content released as a result of plasma membrane rupture characterizing necrosis represents one of the main markers of the inflammatory response referred to as necroinflammation [43]. Hence, in our study, we observed that Ss induced both downregulation of necroinflammation, as demonstrated by decreased necrosis and M1-like proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , and increased IL-10 production by remaining non-necrotic M ϕ s.

IL-1 β exerts its cytotoxic effect on β -cells by increasing the expression of pro-apoptotic proteins, such as the first apoptosis signal (Fas/CD95). Their circulating concentration has been upregulated in newly-diagnosed type 1 diabetic patients [44]. TNF- α has been shown to inhibit insulin secretion [45], as well as upregulate the expression of major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules, thereby accelerating β -cells apoptosis, and subsequently inducing islet infiltrating antigen-presenting cells (APCs), including M ϕ s [46]. Additionally, TNF- α blockade has been shown to prevent non-obese diabetic (NOD) mice against disease development [47]. Conversely, IL-10 has the ability to inhibit the production and the release of immune mediators, and limits inflammatory responses by inhibiting M ϕ activation [48]. So, IL-10 deficiency can result in increased pancreatitis [49]. Globally, our results are in agreement with those of a previous study carried out on U937-derived M ϕ s exposed to H₂O₂, as a damage signal of injury and inflammation, demonstrating that Ss treatment induced a downregulation of proinflammatory cytokines, including both IL-1 β and TNF- α [50]. They are also in accordance with those reporting that IL-10 production is downregulated at the beginning of T1D [33, 51, 52]. Nevertheless, to the best of our knowledge, there is no similar study allowing comparison with our results. *In fine*, we postulated here that Ss treatment might play a potent modulating role of necroinflammatory response mediated-M1-like M ϕ s at the recent-onset T1D.

4.2. Effect of Ss on M ϕ Respiratory Burst

It has been reported that respiratory burst plays a crucial role in the pathogenesis of T1D and its complications [53]. Activated phagocytes, like M ϕ s, produce high levels of ROS and RNS in T1D, including H₂O₂ and NO production, which is in accordance with our outcomes [3, 54]. It has been reported that high NO production is induced by various M ϕ proinflammatory cytokines, including IL-1 β and TNF- α , through the induction of iNOS expression by activating the transcription factors NF- κ B and STAT-1 [55]. Like NO, H₂O₂ produced by M ϕ s can also be toxic to β -cells and cause their damage, thereby contributing potentially to the pathogenesis of T1D [56]. In our study, we observed that Ss treatment markedly downregulated both NO production and H₂O₂ levels, which is consistent with various studies [23, 50, 57]. Nevertheless, the comparison with other studies remains limited, knowing that there are no studies on the effect of Ss on the

production of NO and H₂O₂ by human Mφs during T1D, although today it has become one of the major research topics due to its role in protecting cells and well-documented immune functions.

4.3. Effect of Ss on Phagocytosis and Pathogen Capacities

Phagocytosis represents one of the best markers of overall functional phenotypic activities. It has been reported that Mφ phagocytosis is compromised in T1D [58]. In the current study, we observed that Ss has a reversing effect on both phagocytic activity and pathogen killing in T1D Mφs. Our results argue for the Ss action on Mφs phenotypic switching under inflammatory conditions. Although the anti-inflammatory effects of Ss are well documented [59, 60], their effects on the proinflammatory M1-like Mφs during T1D seem to be explored here for the first time, which should pave the way for further mechanistic investigations.

4.4. Effect of Ss on M1-Like_(iNOS) and M2-Like_(ARG1), and the Dichotomy of “M1-Like” Mφs Versus “M2-Like” Mφs

Of great interest, the upregulation of ARG1 activity may play a potent immunoregulatory role at the onset of T1D, as this results in reduced bioavailability of L-arginine for iNOS and the subsequent NO production. This appears to be an essential mechanism of “inflammation-associated immunosuppression” [33]. In our study, we observed that although ARG1 activity appears to be slightly upregulated in Ss-treated T1D Mφs, Ss remarkably reduced iNOS levels, which is consistent with both *in vivo* and *in vitro* studies [61, 62]. Moreover, a strong switch to the anti-inflammatory M2_(ARG1) phenotype would not always seem desirable in different inflammatory conditions, especially in viral infections, as has been recently reported in the COVID-19 pandemic [63]. Therefore, it should be pointed out that T1D can be caused by molecular mimicry, as the result of viral infection, which might enhance autoimmunity [64]. Of note, in some cases, interpreting results appear difficult, especially in situation where two immune variables with opposing effects increase or decrease simultaneously. Therefore, the best way to determine which variable dominates the other is to measure the ratio of the two variables. Thus, the ratio of iNOS/ARG1 activities would be more informative than iNOS or ARG1 activity determined alone. Also of note, M1-like/M2-like Mφ dichotomy also refers to the proinflammatory/anti-inflammatory cytokines ratio, which corresponds to the Th1/Th2 polarization of helper T-cells, respectively. So, in the current study, we observed that in the absence of Ss treatment, the ratios of iNOS to-ARG1 activity, IL-1β-to-IL-10 and TNF-α-to-IL-10 were markedly increased in T1D Mφs; while, all of these ratios were markedly decreased in Ss-treated Mφs. Hence, our results are in agreement with those of previous studies demonstrating that Ss has anti-inflammatory properties and it is able to phenotypic switch of proinflammatory/killer M1-like toward anti-inflammatory/regulatory M2-like dominant Mφs [65].

4.5. Effect of Ss on $_{i}Ca^{2+}$

As a ubiquitous second messenger, $_{i}Ca^{2+}$ can affect several biological activities of Mφ, such as cytokines production, phagocytosis, phagosome-lysosome fusion and pathogen killing [66], as well as ROS generation and respiratory burst [67].

$_{i}Ca^{2+}$ levels should therefore be used as a potent control for each biomarker of functional activities of Mφs. In the current study, we observed that Ss treatment markedly downregulated $_{i}Ca^{2+}$ levels, confirming results regarding phagocytosis related to anti-inflammatory M2-like Mφs [68], respiratory burst, cytokines production, and cell surface marker of Mφ activation CD14. These results corroborate our recent study on human LPS-activated GM-CSF monocyte-derived Mφs (GM-MDM) [24].

4.6. Effect of Ss on M1-Like Mφ Activation-Associated CD14 Expression

It has been reported that activated M1 Mφ phenotype is characterized by the increased expression of toll-like receptor (TLR) CD14 co-receptor, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein expressed primarily on the surface of myeloid cells. It performs multiple functions as the initiation of TLR-dependent signaling, suggesting that it may function to regulate M1-like/M2-like Mφ plasticity [69]. A previous study reported that the disease frequency was significantly decreased in CD14-deficient male and female non-obese diabetic (NOD) mice compared with their relatives [70]. In the current study, we showed that Ss downregulated the CD14 expression, suggesting that Ss behaves as a negative controller agent preventing the activation of proinflammatory M1-like Mφ function, which is facilitated by high expression of the co-receptor CD14 [71]. Mechanistically, Ss would have negative effects on the activation pathways of Mφs, which would consequently decrease the level of their CD14 expression.

CONCLUSION

In conclusion, we demonstrated that Ss may be able to reverse the extended extracellular inflammatory activation spectrum of M1-like Mφs, while inducing a shift of phenotypic functional activities to anti-inflammatory M2-like Mφs. This provides a novel therapeutic approach using Ss to promote the anti-inflammatory function of Mφs at the disease onset, which might result in profound protection of β-cells against prominent proinflammatory M1-like macrophage-induced injury. In terms of perspectives, the current study should pave the way for a wide range of investigations, including, but not limited to, (i) study of intracellular signaling pathways, kinetics and mode of action of Ss during M1-M2 polarization, (ii) measure the effects of Ss on the regulation of calcium channels activity in T1D Mφs, (iii) verify *in vivo* the efficacy of Ss supplementation on the respiratory burst, cytokines production and phagocytosis, (iv) explore the effect of Ss treatment on other markers of Mφ activation and subtypes, as well as on their chemotaxis in the process of inflammation at the recent-onset T1D, and (iv) mechanistic study of Ss effect on the cross-talk between proinflammatory M1-like Mφs and β-cells. Finally, although the reservoir of insulin-producing beta-cells is not yet completely damaged at the T1D onset, which makes it easier to offer immunomodulatory therapies in patients with recent-onset T1D than in pre-diabetic subjects, it would be wiser to plan such therapeutic strategies for patients with a family history of T1D or tenacious autoantibodies, and who have not yet developed T1D, *i.e.*, subjects who are at the pre-diabetes stage. So, the present study would be more interesting if it had been extended to monocyte-derived Mφs isolated at a pre-diabetic stage in order to

avoid any possible limitation, knowing that immunomodulation could have a significant effect on delaying the onset of diabetes, and, consequently, on delaying the possible development of diabetic complications, especially in patients with poor glycemic control. This study would also be even more interesting in the context of a clinical trial where a larger sample size is required.

LIST OF ABBREVIATIONS

ARG1	= Arginase 1
CD14	= Cluster of Differentiation 14
CD14-PE	= Monoclonal Antibody to CD14 Phycoerythrin Conjugated
CoM ϕ /Ss-	= Control M ϕ Untreated with Sodium Selenite
CoM ϕ /Ss+	= Control M ϕ Treated with Sodium Selenite
CTCF	= Corrected Total Cell Fluorescence
H ₂ O ₂	= Hydrogen Peroxide
Ca ²⁺	= Intracellular Free Calcium Ions
IL	= Interleukin
iNOS	= Inducible Nitric Oxide Synthase
KW	= Kruskal-Wallis Test
MDMs	= Monocytes-Derived M ϕ s
M ϕ	= Macrophage
NO	= Nitric Oxide
non-Necr M ϕ s	= Non-Necrotic Macrophages
PE	= Phycoerythrin
PLN	= Pancreatic Lymph Node
SEM	= Standard Error of Mean
Ss	= Sodium Selenite (Na ₂ SeO ₃)
T1D	= Type 1 Diabetes
T1DM ϕ /Ss-	= Type 1 Diabetes M ϕ Untreated with Sodium Selenite
T1DM ϕ /Ss+	= Type 1 Diabetes M ϕ Treated with Sodium Selenite
TBET	= Trypan Blue Exclusion Test
TNF	= Tumor Necrosis Factor

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The local Institutional Review Board/Scientific Council approved the current study (Registration Number DBL NM014).

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals were used in this research. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of institutional and/or research committees and with the 1975 Declaration of Helsinki, as revised in 2013.

CONSENT FOR PUBLICATION

All donors or parents, on behalf of their child, provided informed written consent.

AVAILABILITY OF DATA

Data is available but cannot be accessed online.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

None.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their deepest gratitude to all primary cell sample donors, as well as to the study team members of the Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, for their time and energy.

REFERENCES

- [1] Espinoza-Jiménez, A.; Peón, A.N.; Terrazas, L.I. Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes. *Mediators Inflamm.*, **2012**, *2012*, 815953. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/815953>
- [2] Schwizer, R.W.; Leiter, E.H.; Evans, R. Macrophage-mediated cytotoxicity against cultured pancreatic islet cells. *Transplantation*, **1984**, *37*(6), 539-543. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-198406000-00002> PMID: 6375012
- [3] Meares, G.P.; Fontanilla, D.; Broniowska, K.A.; Andreone, T.; Lancaster, J.R., Jr.; Corbett, J.A. Differential responses of pancreatic β -cells to ROS and RNS. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2013**, *304*(6), E614-E622. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00424.2012> PMID: 23321474
- [4] Van Gassen, N.; Staels, W.; Van Overmeire, E.; De Groef, S.; Sojoodi, M.; Heremans, Y.; Leucx, G.; Van de Castele, M.; Van Ginderachter, J.A.; Heimberg, H.; De Leu, N. Concise review: macrophages: versatile gatekeepers during pancreatic β -cell development, injury, and regeneration. *Stem Cells Transl. Med.*, **2015**, *4*(6), 555-563. <http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2014-0272> PMID: 25848123
- [5] Southern, C.; Schulster, D.; Green, I.C. Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett.*, **1990**, *276*(1-2), 42-44. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80502-A](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80502-A) PMID: 2265709
- [6] Stoffels, K.; Overbergh, L.; Giulietti, A.; Kasran, A.; Bouillon, R.; Gysemans, C.; Mathieu, C. NOD macrophages produce high levels of inflammatory cytokines upon encounter of apoptotic or necrotic cells. *J. Autoimmun.*, **2004**, *23*(1), 9-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2004.03.012> PMID: 15236748
- [7] Hoffmann, P.R.; Berry, M.J. The influence of selenium on immune responses. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*(11), 1273-1280. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700330> PMID: 18384097
- [8] Xia, H.; Zhang, L.; Dai, J.; Liu, X.; Zhang, X.; Zeng, Z.; Jia, Y. Effect of selenium and peroxyntrite on immune function of immature dendritic cells in humans. *Med. Sci. Monit.*, **2021**, *27*, e929004. <http://dx.doi.org/10.12659/MSM.929004> PMID: 33684094
- [9] Vunta, H.; Belda, B.J.; Arner, R.J.; Channa Reddy, C.; Vanden Heuvel, J.P.; Sandeep Prabhu, K. Selenium attenuates pro-inflammatory

- gene expression in macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, 52(11), 1316-1323.
<http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700346>
 PMID: 18481333
- [10] Shibata, T.; Kondo, M.; Osawa, T.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Uchida, K. 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277(12), 10459-10466.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110314200>
 PMID: 11786541
- [11] Korwar, A.M.; Shay, A.E.; Basrur, V.; Conlon, K.; Prabhu, K.S. Selenoproteome identification in inflamed murine primary bone marrow-derived macrophages by Nano-Lc orbitrap fusion tribrid mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2019**, 30(7), 1276-1283.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13361-019-02192-9>
 PMID: 30972724
- [12] Nelson, S.M.; Shay, A.E.; James, J.L.; Carlson, B.A.; Urban, J.F., Jr; Prabhu, K.S. Selenoprotein expression in macrophages is critical for optimal clearance of parasitic helminth *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Biol. Chem.*, **2016**, 291(6), 2787-2798.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.684738>
 PMID: 26644468
- [13] Narayan, V.; Ravindra, K.C.; Liao, C.; Kaushal, N.; Carlson, B.A.; Prabhu, K.S. Epigenetic regulation of inflammatory gene expression in macrophages by selenium. *J. Nutr. Biochem.*, **2015**, 26(2), 138-145.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.09.009>
 PMID: 25458528
- [14] Wahl, L.M.; Wahl, S.M.; Smythies, L.E.; Smith, P.D. Isolation of Human Monocyte Populations. *Curr. Protoc. Immunol.*, **2005**, 70(1)
<http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im0706as70>
 PMID: 18432977
- [15] Selvaraj, P.; Prabhu Anand, S.; Harishankar, M.; Alagarasu, K. Plasma 1,25 dihydroxy vitamin D3 level and expression of vitamin D receptor and cathelicidin in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Immunol.*, **2009**, 29(4), 470-478.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10875-009-9277-9>
 PMID: 19219539
- [16] Fedoroff, S.; Richardson, A, Eds.; *Protocols for neural cell culture*, 3rd ed; Humana Press: Totowa, N.J, **2001**.
<http://dx.doi.org/10.1385/1592592074>
- [17] Salles, M.S.V.; Zanetti, M.A.; Junior, L.C.R.; Salles, F.A.; Azzolini, A.E.C.S.; Soares, E.M.; Faccioli, L.H.; Valim, Y.M.L. Performance and immune response of suckling calves fed organic selenium. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **2014**, 188, 28-35.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.11.008>
- [18] Dahmani, Z.; Addou-Klouche, L.; Gizard, F.; Dahou, S.; Messaoud, A.; Chahinez Djebri, N.; Benaissi, M.I.; Mostefaoui, M.; Terbeche, H.; Nouari, W.; Miliiani, M.; Lefranc, G.; Fernandez, A.; Lamb, N.J.; Aribi, M. Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity. *PLoS One*, **2020**, 15(10), e0240982.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0240982>
 PMID: 33108409
- [19] Krausgruber, T.; Blazek, K.; Smallie, T.; Alzabin, S.; Lockstone, H.; Sahgal, N.; Hussell, T.; Feldmann, M.; Udalova, I.A. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.*, **2011**, 12(3), 231-238.
<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1990>
 PMID: 21240265
- [20] Buchacher, T.; Ohradanova-Repic, A.; Stockinger, H.; Fischer, M.B.; Weber, V. M2 polarization of human macrophages favors survival of the intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS One*, **2015**, 10(11), e0143593.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143593>
 PMID: 26606059
- [21] Shiomi, A.; Usui, T.; Mimori, T. GM-CSF as a therapeutic target in autoimmune diseases. *Inflamm. Regen.*, **2016**, 36(1), 8.
<http://dx.doi.org/10.1186/s41232-016-0014-5>
 PMID: 29259681
- [22] Unitt, J.; Hornigold, D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem. Pharmacol.*, **2011**, 81(11), 1324-1328.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.010>
 PMID: 21420389
- [23] Aribi, M.; Meziane, W.; Habi, S.; Boulatika, Y.; Marchandin, H.; Aymeric, J.L. Macrophage bactericidal activities against *Staphylococcus aureus* are enhanced *in vivo* by selenium supplementation in a dose-dependent manner. *PLoS One*, **2015**, 10(9), e0135515.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>
 PMID: 26340099
- [24] Meziane, W.; Mekkaoui, Z.; Hai, I.; Kacimi, K.; Djilali, K.; Touil-Boukoffa, C.; Lefranc, G.; Fernandez, A.; Lamb, N.; Mennechet, F.; Aribi, M. Combination of metformin with sodium selenite induces a functional phenotypic switch of human GM-CSF monocyte-derived macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, **2019**, 73, 212-224.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.004>
 PMID: 31108386
- [25] Campbell, S.C.; Aldibbiat, A.; Marriott, C.E.; Landy, C.; Ali, T.; Ferris, W.F.; Butler, C.S.; Shaw, J.A.; Macfarlane, W.M. Selenium stimulates pancreatic beta-cell gene expression and enhances islet function. *FEBS Lett.*, **2008**, 582(15), 2333-2337.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.038>
 PMID: 18538137
- [26] Miliiani, M.; Nouar, M.; Paris, O.; Lefranc, G.; Mennechet, F.; Aribi, M. Thymoquinone potently enhances the activities of classically activated macrophages pulsed with necrotic jurkat cell lysates and the production of antitumor th1-/m1-related cytokines. *J. Interferon Cytokine Res.*, **2018**, 38(12), 539-551.
<http://dx.doi.org/10.1089/jir.2018.0010>
 PMID: 30422744
- [27] Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **1985**, 150(1), 76-85.
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
 PMID: 3843705
- [28] Aribi, M. Macrophage bactericidal assays. *Methods Mol. Biol.*, **2018**, 1784, 135-149.
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_14
 PMID: 29761396
- [29] Luo, B.; Wang, J.; Liu, Z.; Shen, Z.; Shi, R.; Liu, Y.Q.; Liu, Y.; Jiang, M.; Wu, Y.; Zhang, Z. Phagocyte respiratory burst activates macrophage erythropoietin signalling to promote acute inflammation resolution. *Nat. Commun.*, **2016**, 7(1), 12177.
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12177>
 PMID: 27397585
- [30] Guevara, I.; Iwanejko, J.; Dembińska-Kieć, A.; Pankiewicz, J.; Wanat, A.; Anna, P.; Gołabek, I.; Bartuś, S.; Malczewska-Malec, M.; Szczudlik, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta*, **1998**, 274(2), 177-188.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00060-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00060-6)
 PMID: 9694586
- [31] Blond, D.; Raoul, H.; Le Grand, R.; Dormont, D. Nitric oxide synthesis enhances human immunodeficiency virus replication in primary human macrophages. *J. Virol.*, **2000**, 74(19), 8904-8912.
<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.19.8904-8912.2000>
 PMID: 10982333
- [32] Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods*, **1980**, 38(1-2), 161-170.
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90340-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(80)90340-3)
 PMID: 6778929
- [33] Benghalem, I.; Meziane, W.; Hadjidj, Z.; Ysmail-Dahlouk, L.; Belamri, A.; Mouhadjer, K.; Aribi, M. 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. *Cytokine*, **2017**, 96, 59-70.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.001>
 PMID: 28324804
- [34] Nouari, W.; Ysmail-Dahlouk, L.; Aribi, M. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.*, **2016**, 30, 94-101.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>
 PMID: 26655879
- [35] Corraliza, I.M.; Campo, M.L.; Soler, G.; Modolell, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods*, **1994**, 174(1-2), 231-235.
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90027-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)90027-2)
 PMID: 8083527

- [36] Murray, P.J.; Wynn, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, **2011**, *11*(11), 723-737. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3073> PMID: 21997792
- [37] Chan, F.K.M.; Moriwaki, K.; De Rosa, M.J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.*, **2013**, *979*, 65-70. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7 PMID: 23397389
- [38] Dahou, S.; Smahi, M.C.E.; Nouari, W.; Dahmani, Z.; Benmansour, S.; Ysmail-Dahlouk, L.; Miliani, M.; Yebdri, F.; Fakir, N.; Laoufi, M.Y.; Chaib-Draa, M.; Tourabi, A.; Aribi, M. L-Threoascorbic acid treatment promotes *S. aureus*-infected primary human endothelial cells survival and function, as well as intracellular bacterial killing, and immunomodulates the release of IL-1 β and soluble ICAM-1. *Int. Immunopharmacol.*, **2021**, *95*, 107476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107476> PMID: 33676147
- [39] Belhassena, I.; Nouari, W.; Messaoud, A.; Nouar, M.; Brahim, M.; Lamara, S.A.C.; Aribi, M. Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction atherosclerotic disease. *Int. Immunopharmacol.*, **2020**, *83*, 106349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349> PMID: 32172203
- [40] Jackson, M.; Krasnodembskaya, A. Analysis of mitochondrial transfer in direct co-cultures of human monocyte-derived macrophages (MDM) and mesenchymal stem cells (MSC). *Bio Protoc.*, **2017**, *7*(9), e2255. <http://dx.doi.org/10.21203/BioRx.2255> PMID: 28534038
- [41] Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **2012**, *9*(7), 671-675. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089> PMID: 22930834
- [42] Hao, Q.; Idell, S.; Tang, H. M1 macrophages are more susceptible to necroptosis. *J. Cell. Immunol.*, **2021**, *3*(2), 97-102. <http://dx.doi.org/10.33696/immunology.3.084> PMID: 33959729
- [43] Tonnus, W.; Gemhardt, F.; Latk, M.; Parmentier, S.; Hugo, C.; Bornstein, S.R.; Linkermann, A. The clinical relevance of necroinflammation—highlighting the importance of acute kidney injury and the adrenal glands. *Cell Death Differ.*, **2019**, *26*(1), 68-82. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-018-0193-5> PMID: 30224638
- [44] Aribi, M.; Moulessehou, S.; Kendouci-Tani, M.; Benabadi, A.-B.; Hichami, A.; Khan, N.A. Relationship between interleukin-1 β and lipids in type 1 diabetic patients. *Med. Sci. Monit.*, **2007**, *13*(8), CR372-CR378. PMID: 17660728
- [45] Yoon, J.W.; Jun, H.S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am. J. Ther.*, **2005**, *12*(6), 580-591. <http://dx.doi.org/10.1097/01.mjt.0000178767.67857.63> PMID: 16280652
- [46] Lu, J.; Liu, J.; Li, L.; Lan, Y.; Liang, Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin. Transl. Immunology*, **2020**, *9*(3), e1122. <http://dx.doi.org/10.1002/cti2.1122> PMID: 32185024
- [47] Lee, L.F.; Xu, B.; Michie, S.A.; Beilhack, G.F.; Warganich, T.; Turley, S.; McDevitt, H.O. The role of TNF- α in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: Analysis of dendritic cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*(44), 15995-16000. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0508122102> PMID: 16247001
- [48] O'Farrell, A.M.; Liu, Y.; Moore, K.W.; Mui, A.L. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.*, **1998**, *17*(4), 1006-1018. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.4.1006> PMID: 9463379
- [49] Rajagopalan, G.; Kudva, Y.C.; Sen, M.M.; Marietta, E.V.; Murali, N.; Nath, K.; Moore, J.; David, C.S. IL-10-deficiency unmasks unique immune system defects and reveals differential regulation of organ-specific autoimmunity in non-obese diabetic mice. *Cytokine*, **2006**, *34*(1-2), 85-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2006.04.006> PMID: 16740391
- [50] Okoko, T. Kolaviron and selenium reduce hydrogen peroxide-induced alterations of the inflammatory response. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **2018**, *16*(2), 485-490. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.004> PMID: 30733764
- [51] Rios-Arce, N.D.; Dagenais, A.; Feenstra, D.; Coughlin, B.; Kang, H.J.; Mohr, S.; McCabe, L.R.; Parameswaran, N. Loss of interleukin-10 exacerbates early type-1 diabetes-induced bone loss. *J. Cell. Physiol.*, **2020**, *235*(3), 2350-2365. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.29141> PMID: 31538345
- [52] Ysmail-Dahlouk, L.; Nouari, W.; Aribi, M. 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. *Immunol. Lett.*, **2016**, *179*, 122-130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.002> PMID: 27717877
- [53] Sokolovska, J.; Dekante, A.; Baumane, L.; Pahirko, L.; Valeinis, J.; Dislere, K.; Rovite, V.; Pirags, V.; Sjakste, N. Nitric oxide metabolism is impaired by type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Biom Rep.*, **2020**, *12*(5), 251-258. <http://dx.doi.org/10.3892/br.2020.1288>
- [54] Fatima, N.; Faisal, S.M.; Zubair, S.; Ajmal, M.; Siddiqui, S.S.; Moin, S.; Owais, M. Role of pro-inflammatory cytokines and biochemical markers in the pathogenesis of type 1 diabetes: correlation with age and glycemic condition in diabetic human subjects. *PLoS One*, **2016**, *11*(8), e0161548. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0161548> PMID: 27575603
- [55] Bedoya, F.J.; Salguero-Aranda, C.; Cahuana, G.M.; Tapia-Limonchi, R.; Soria, B.; Tejedro, J.R. Regulation of pancreatic β -cell survival by nitric oxide. *Islets*, **2012**, *4*(2), 108-118. <http://dx.doi.org/10.4161/isl.19822> PMID: 22614339
- [56] Broniowska, K.A.; Oleson, B.J.; McGraw, J.; Naatz, A.; Mathews, C.E.; Corbett, J.A. How the location of superoxide generation influences the β -cell response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **2015**, *290*(12), 7952-7960. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.627869> PMID: 25648890
- [57] Chomchan, R.; Puttarak, P.; Brantner, A.; Siripongvutikorn, S. Selenium-rich ricegrass juice improves antioxidant properties and nitric oxide inhibition in macrophage cells. *Antioxidants*, **2018**, *7*(4), 57. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox7040057> PMID: 29652839
- [58] Geerlings, S.E.; Hoepelman, A.I.M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **1999**, *26*(3-4), 259-265. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x> PMID: 10575137
- [59] Huang, Z.; Rose, A.H.; Hoffmann, P.R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.*, **2012**, *16*(7), 705-743. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4145> PMID: 21955027
- [60] Han, H.W.; Yang, E.J.; Lee, S.-M. Sodium selenite alleviates breast cancer-related lymphedema independent of antioxidant defense system. *Nutrients*, **2019**, *11*(5), 1021. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11051021>
- [61] Dhanjal, N.I.; Sharma, S.; Prabhu, K.S.; Tejo Prakash, N. Selenium supplementation through Se-rich dietary matrices can upregulate the anti-inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *Food Agric. Immunol.*, **2017**, *28*(6), 1374-1392. <http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2017.1343805> PMID: 29563666
- [62] Zeng, J.; Zhou, J.; Huang, K. Effect of selenium on pancreatic proinflammatory cytokines in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Nutr. Biochem.*, **2009**, *20*(7), 530-536. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.012> PMID: 18789669
- [63] Stancioiu, F.; Papadakis, G.; Kteniadakis, S.; Izotov, B.; Coleman, M.; Spandidos, D.; Tsatsakis, A. A dissection of SARS-CoV2 with clinical implications. *Int. J. Mol. Med.*, **2020**, *46*(2), 489-508. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2020.4636> PMID: 32626922
- [64] Filippi, C.M.; von Herrath, M.G. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes*, **2008**, *57*(11), 2863-2871. <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1023> PMID: 18971433

- [65] Nelson, S.M.; Lei, X.; Prabhu, K.S. Selenium levels affect the IL-4-induced expression of alternative activation markers in murine macrophages. *J. Nutr.*, **2011**, *141*(9), 1754-1761.
<http://dx.doi.org/10.3945/jn.111.141176> PMID: 21775527
- [66] Nunes, P.; Demaurex, N. The role of calcium signaling in phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.*, **2010**, *88*(1), 57-68.
<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.01110028>
PMID: 20400677
- [67] Kelly, E.K.; Wang, L.; Ivashkiv, L.B. Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *J. Immunol.*, **2010**, *184*(10), 5545-5552.
<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901293>
PMID: 20400701
- [68] Jaggi, U.; Yang, M.; Matundan, H.H.; Hirose, S.; Shah, P.K.; Sharifi, B.G.; Ghiasi, H. Increased phagocytosis in the presence of enhanced M2-like macrophage responses correlates with increased primary and latent HSV-1 infection. *PLoS Pathog.*, **2020**, *16*(10), e1008971.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008971>
PMID: 33031415
- [69] da Silva, T.A.; Zorzetto-Fernandes, A.L.V.; Cecílio, N.T.; Sardinha-Silva, A.; Fernandes, F.F.; Roque-Barreira, M.C. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*(1), 7083.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07397-0>
PMID: 28765651
- [70] Klötting, N.; Klötting, I.; Jack, R.S. CD14 triggers autoimmune Type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*, **2004**, *47*(1), 151-152.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-003-1251-0>
PMID: 14614560
- [71] Jimenez-Duran, G.; Luque-Martin, R.; Patel, M.; Koppe, E.; Bernard, S.; Sharp, C.; Buchan, N.; Rea, C.; de Winther, M.P.J.; Turan, N.; Angell, D.; Wells, C.A.; Cousins, R.; Mander, P.K.; Masters, S.L. Pharmacological validation of targets regulating CD14 during macrophage differentiation. *EBioMedicine*, **2020**, *61*, 103039.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103039>
PMID: 33038762

DISCLAIMER: The above article has been published, as is, ahead-of-print, to provide early visibility but is not the final version. Major publication processes like copyediting, proofing, typesetting and further review are still to be done and may lead to changes in the final published version, if it is eventually published. All legal disclaimers that apply to the final published article also apply to this ahead-of-print version.