

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM

FACULTÉ DES SCIENCES  
Département de Biologie

43/02

**Mémoire**  
Pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie  
Option : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

**Thème**

M84/02

**Effets des AGPI n-3 exogènes sur la prolifération  
des lymphocytes T et la composition en  
acides gras des membranes chez les diabétiques.**

*Présenté par* Mlle Saker Meriem

*Soutenu le*  
*Devant le jury composé de*

Mr D. Chabane-sari	Professeur	, Université de Tlemcen	Président
Mr B. Benabadji	Professeur	, Université de Tlemcen	Examineur
Melle O. Gaouar	Maître de conférence,	Université de Tlemcen	Examineur
Mr S. Zaoui	Chargé de Cours,	Université de Tlemcen	Examineur
Mme H. Merzouk	Maître de conférence,	Université de Tlemcen	Promoteur

M84/02  
←

Année Universitaire : 2002 - 2003

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN

FACULTÉ DES SCIENCES

Département de Biologie

مكتبة كلية العلوم  
ملحقة البيولوجيا

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie

Option : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Thème

Imprimé sous le N° 8/1323  
Date le 2007-04-25  
Case .....

**Effets des AGPI n-3 exogènes sur la prolifération  
des lymphocytes T et la composition en  
acides gras des membranes chez les diabétiques.**

*Présenté par* Mlle Saker Meriem

*Soutenu le*

*Devant le jury composé de*

Mr D. Chabane-sari	Professeur	, Université de Tlemcen	Président
Mr B. Benabadji	Professeur	, Université de Tlemcen	Examineur
Melle O. Gaouar	Maître de conférence,	Université de Tlemcen	Examineur
Mr S. Zaoui	Chargé de Cours,	Université de Tlemcen	Examineur
Mme H. Merzouk	Maître de conférence,	Université de Tlemcen	Promoteur

Case .....

## **RESUME :**

Le but de ce travail est de déterminer les effets des acides gras poly insaturés eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) sur la lymphoprolifération, sur la composition en acides gras des membranes des lymphocytes et sur la sécrétion des Interleukines 2, *in vitro*.

Les cellules T sont isolées à partir du sang de sujets témoins et diabétiques de type I et de type II de la région de Tlemcen. Ces cellules sont incubées en présence d'acides gras poly insaturés à différentes concentrations, puis stimulées par un agent mitogène (la concanavaline A) pendant 48 heures. A la fin du traitement, le surnageant sert au dosage de l'Interleukine 2, et les cellules sont utilisées pour déterminer la composition en acides gras des phospholipides membranaires. La lymphoprolifération est déterminée par le comptage des cellules et par le dosage des protéines.

Les tests de transformation lymphoblastique révèlent une diminution de la prolifération cellulaire, basale ou stimulée par la concanavaline A, chez les diabétiques comparés aux témoins. De plus, les acides gras poly insaturés n-3 (AGPI n-3) (EPA, DHA) réduisent la lymphoprolifération aussi bien chez les témoins que chez les diabétiques.

D'un autre côté, les AGPI n-3 entraînent une modification de la composition en acides gras des phospholipides membranaires. En effet, l'analyse des acides gras des phospholipides par chromatographie en phase gazeuse (CPG) montre une augmentation des pourcentages en EPA et DHA et une diminution de celui de l'acide arachidonique. Ceci suggère que l'EPA et le DHA se substituent à l'acide arachidonique au niveau de la position *sn*2 du glycérol.

Pour ce qui est de la sécrétion des Interleukines 2, la stimulation des cellules T par la concanavaline A induit une augmentation significative de l'Interleukine 2 en comparaison avec les cellules non stimulées ; les AGPI n-3 diminuent sensiblement cette sécrétion, notamment chez les diabétiques.

Ces résultats démontrent que l'effet immunosuppresseur des AGPI n-3 peut moduler l'activité des lymphocytes T au cours du diabète.

## الخلاصة:

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد أدوار الأحماض الدهنية غير المشبعة ( EPA ) و ( DHA ) على انتشار الظواهر اللمفية وذلك على تركيب الأحماض الدهنية على مستوى أغشية الكريات البيضاء وكذا على إفرازات اللوكينات تجريبيا.

عزلت الخلايا T من دم الشواهد التجريبية وكذا من دم المصابين بداء السكري من النوع I و II بمنطقة تلمسان ، حضنت الخلايا بإضافة الأحماض الدهنية غير المشبعة بتراكيز مختلفة ، تم تنشيطها بإضافة الكونكافالين A لمدة 48 ساعة ، وبانتهاء المعالجة فإن المحلول يخضع إلى تحديد نسب الإنترلوكينات 2 وتستخدم الخلايا في تحديد تراكيب كل من الأحماض الدهنية والفوسفوليبيدات الغشائية.

بينت مختلف الاختبارات تناقصا في التكاثر الخلوي الأساسي أو المحفز بواسطة الكونكافالين أ عند المصابين بداء السكري مقارنة بالشاهد ، إضافة إلى فإن الأحماض الدهنية غير المشبعة تنقص التكاثر الخلوي عند المرضى وبعينات الشاهد.

من جهة أخرى فإن AGPI n-3 يحدث تغيرا في تراكيب الأحماض الدهنية والفوسفوليبيدات الغشائية ، كما أن تحاليل الأحماض الدهنية والفوسفوليبيدات بواسطة الفصل الكروماتوجرافي بالمرحلة الغازية (CPG) يبين ارتفاعا في النسب المثوية لكل من EPA و DHA وتناقصا في نسب حمض الأراشيدونيك ، مما يمكن القول بأن EPA و DHA تعتمد على الحمض المذكور على مستوى موقع sn2 للجليسيرول.

وفيما يخص إفراز الإنترلوكينات 2 فإن تحفيز الخلايا T بواسطة الكونكافالين A تؤدي إلى ارتفاع محسوس في مستوى الإنترلوكينات مقارنة مع الخلايا التي لم يتم تحفيزها ، وأن AGPI n-3 تنقص بصفة ملحوظة هذه الإفرازات خاصة عند المرضى بداء السكري.

تبين هذه النتائج أن أثر AGPI n-3 كمحفز مناعي يمكنه التحكم في نشأة الخلايا البيضاء T عند المرضى بداء السكري.

# DEDICACES

*Au seul être qui m'est cher, merci pour avoir été là et surtout pour avoir  
été toi même.  
Je ne le dédie qu'a toi Hichem.*

## ***REMECIEMENTS***

A madame MERZOUK Haféda, Maître de conférences à la faculté des sciences de Tlemcen, j'exprime ma gratitude et ma sincère reconnaissance pour son inestimable aide, ses judicieux conseils, sa grande patience et sa confiance.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur CHAABANE SARI Daoudi, Professeur à la faculté des sciences de Tlemcen, pour sa compréhension et pour avoir bien voulu présider le jury.

Je tiens à remercier Monsieur ZAOUÏ Salah, Chargé de Cours et Chef du département de Biologie, ainsi que Mademoiselle GAOUAR Ouassila, Maître de Conférences et ~~Directrice~~ de la pédagogie du même département, pour avoir bien voulu examiner et enrichir ce travail, et aussi pour toute leur aide logistique.

Mes remerciements vont également au Professeur BENABADJI Bakir, Chef de service du laboratoire de bactériologie du CHU de Tlemcen, et Chef du département de pharmacie, pour son aimable compréhension et l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'évaluer ce travail.

Je ne pourrais omettre de remercier Monsieur KHAN Naïm Akhtar, Professeur à la faculté des sciences de Dijon, et Monsieur HICHAMI Azziz, Maître de Conférences appartenant à la même faculté, pour leur chaleureux accueil, leur disponibilité, et leur précieuse aide.

Je remercie aussi tous ceux qui ont contribué de près ou de loin avec leur aide à l'élaboration de ce travail.

Enfin, je remercie mes parents, qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude et toute ma reconnaissance pour leur soutien et leur patience durant toute ma scolarité.

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

- AA* : Acide arachidonique
- AG* : Acide gras
- AGE* : Acides gras essentiels
- AGMI* : Acides gras mono insaturés
- AGPI* : Acides gras poly insaturés
- AGS* : Acides gras saturés
- BB* : Bio breeding
- CD* : classe de différenciation ou cluster de différenciation
- CLT* : Cellule lymphocytaire T
- CMH* : Complexe majeur d'histocompatibilité
- Con A* : Concanavaline A
- CPA* : Cellule présentatrice d'antigènes
- DAG* : Diacylglycerol
- DHA* : Acide docosahexaénoïque
- DID* : Diabète insulino-dépendant
- DNID* : Diabète non insulino-dépendant
- EPA* : Acide eicosapentaénoïque
- ERK* : Extracellularly regulated kinase
- FAS-L* : Fas-Ligand
- HTA* : Hypertension artérielle
- IL-1* : Interleukine 1
- IL-2* : Interleukine 2
- INF $\gamma$*  : Interféron  $\gamma$
- Ins* : Insuline
- MAI* : maladie auto-immune
- MAPK* : Mitogen activated protein kinase
- MCV* : Maladies cardiovasculaires

**MEK:** MAPK kinase- ERK kinase

**NK:** Natural killer

**NO:** Monoxyde d'azote

**NOD :** non obese diabetic (diabétique non obèse)

**PGE1 :** Prostaglandine de la serie E 1

**PGE2 :** Prostaglandine de la serie E 2

**PKC :** Protéine kinase C

**TCGF :** T cell growth factor (facteur de croissance des cellules T)

**TGF $\beta$ :** Transforming growth factor  $\beta$

**Th1:** T helper de type 1

**Th2 :** T helper de type 2

**TNF $\alpha$  :** Tumor necrosis factor  $\alpha$  (facteur nécrosant de tumeurs)



## ***LISTE DES TABLEAUX***

***Tableau I :*** Caractéristiques de la population étudiée.

***Tableau II :*** Conditions socio-économiques de la population étudiée

## ***ANNEXES***

***Tableau III :*** Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (pourcentages pondéraux) isolés des diabétiques et des témoins. (Etat initial).

***Tableau IV :*** Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (Pourcentages pondéraux) après stimulation par la concanavaline A (Con A).

***Tableau V :*** Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (Pourcentages pondéraux) après incubation en présence de Con A et d' EPA à 30µM.

***Tableau VI :*** Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (Pourcentages pondéraux) après incubation en présence de Con A et de DHA à 30µM.

***Tableau VII :*** Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes isolés des patients diabétiques et des sujets témoins. (IL-2, Pg/ml).

***Tableau VIII :*** Prolifération basale ou stimulée par la con A (nombre de cellules  $\times 10^5$  /puit) en présence et en absence de l'insuline et des AGPI n-3 (EPA, DHA) à différentes concentrations (15µM ou 30µM) des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins

***Tableau IX :*** Teneurs en protéines des lymphocytes (µg/puit) après prolifération basale ou stimulée par la con A en présence ou en absence de l'insuline et des AGPI n-3 (EPA, DHA) à différentes concentrations (15µM ou 30µM) des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins.

***Tableau XX :*** Nomenclature des acides gras

## ***LISTE DES FIGURES***

***Figure N° 1 :*** Origine commune et différenciation des cellules sanguines.

***Figure N° 2 :*** Maturation et différenciation des lymphocytes T.

***Figure N° 3:*** Mécanismes moléculaires de la coopération des lymphocytes T et des lymphocytes B pour la production d'anticorps et importance du CMH.

***Figure N° 4 :*** Les mécanismes de l'installation du diabète insulino-dépendant auto-immun.

***Figure N° 5 :*** Biosynthèse des différents acides gras par les désaturases et les élongases.

***Figure N° 6 :*** Analogie structurale des AGPI de la famille n-3 et de l'acide  $\alpha$  linoléique précurseur des AGPI de la famille n-6

***Figure N° 7 :*** Isolement des lymphocytes grâce au ficoll.

***Figure N° 8 :*** Principe du dosage des IL-2 par méthode ELISA.

***Figure N° 9 :*** Prolifération basale ou stimulée par la Con A en présence ou en absence d'insuline chez les patients diabétiques et chez les témoins.

***Figure N° 10 :*** Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) sur la prolifération stimulée par la Con A des lymphocytes chez les diabétiques et chez les témoins.

***Figure N°11 :*** Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) sur la prolifération stimulée par la Con A en présence de l'insuline chez les diabétiques et chez les témoins.

**Figure N°12 :** Teneurs en protéines des lymphocytes après prolifération basale ou stimulée par la Con A en présence ou en absence d'insuline chez les patients diabétiques et chez les témoins.

**Figure N°13 :** Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) sur les teneurs en protéines des lymphocytes après stimulation par la Con A chez les patients diabétiques et chez les témoins.

**Figure N°14 :** Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) à différentes concentrations et en présence d'insuline sur les teneurs en protéines des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins.

**Figure N°15 :** Composition en AGS (16:0 et 18:0) et AGMI (16:1 et 18:1) des phospholipides des membranes lymphocytaires à l'état initial, en présence de Con A et des acides gras poly insaturés (EPA et DHA) à 30µM.

**Figure N° 16 :** Composition en 18:2 (n-6) et en 20:4 (n-6), des phospholipides des membranes lymphocytaires en état initial, en présence de Con A et des acides gras poly insaturés (EPA et DHA) à 30µM.

**Figure N° 17 :** Composition en DHA (20:5n-3) et en EPA (22:6n-3) des phospholipides des membranes lymphocytaires à l'état initial, en présence de Con A et des acides gras poly insaturés (EPA et DHA) à 30µM.

**Figure N° 18 :** Taux d'interleukine-2 (IL-2) en pg/ml produite par les lymphocytes en stimulation basale, en présence de Con A et après ajout d'insuline.

**Figure N° 19 :** Taux d'interleukine-2 (IL-2) en pg/ml en présence des AGPI produite par les lymphocytes des patients diabétiques et des sujets témoins, en présence des AGPI.

**Figure N° 20 :** Taux d'interleukine-2 (IL-2) en pg/ml en présence des AGPI et de l'insuline produite par les lymphocytes isolés des patients diabétiques et des sujets témoins, en présence des AGPI et de l'insuline.

# INTRODUCTION

Normalement, le système immunitaire défend l'organisme. La cible de toute réaction immunitaire est un « antigène », une molécule étrangère provenant d'une bactérie ou d'un autre envahisseur. Les « cellules spécialisées » telles que les macrophages, parcourent l'organisme en ingérant les antigènes qu'elles rencontrent et les fragmentant en « peptides antigéniques ». Les particules de ces peptides se fixent sur les molécules du « complexe majeur d'histocompatibilité » (CMH) et se répartissent à la surface de la cellule. D'autres globules blancs du sang, appelés « lymphocytes » expriment des molécules réceptrices qui leurs permettent de reconnaître les différentes combinaisons CMH peptide. (Silverstein, 1989).

En fait, la spécialisation du système immunitaire ne se borne pas à sa division en lymphocytes B et T. Les lymphocytes T eux-mêmes se scindent en deux sous populations ; les lymphocytes T CD4 (auxiliaires qui sécrètent les « lymphokines » ou signaux chimiques, qui mobilisent d'autres composants du système immunitaire), et les lymphocytes T CD8 (tueurs) qui une fois activés tuent les cellules infectées, limitant ainsi la propagation d'un mal. En raison de leur nature meurtrière, ils sont également appelés lymphocytes T cytotoxiques. (Nossal, 1989).

Ils ont un rôle bénéfique non seulement dans l'attaque des agents infectieux, mais également dans l'attaque des cellules cancéreuses, et les tiennent ainsi en échec au moins temporairement. (Roitt, 1991).

D'autres expériences montrent en revanche que le comportement de ces mêmes lymphocytes n'est pas toujours aussi bénéfique. Quand le système immunitaire se dérègle, les lymphocytes peuvent s'attaquer aux cellules de l'organisme qu'ils sont sensés défendre, provoquant ainsi une maladie auto-immune (MAI). (Rose et Mackey, 1992 ; Von Boehmer, 1991).

Dans le système immunitaire de chaque individu, il y a un phénomène de tolérance qui se définit comme l'absence d'agression pathogène vis-à-vis des constituants du soi, et c'est une propriété acquise au cours du développement lors de la différenciation des lymphocytes T et B. Mais tout individu est exposé à des maladies auto immunes (MAI) dues à des lymphocytes T et/ou des lymphocytes B spécifiques d'auto antigènes, c'est-à-dire d'épitopes ou de peptides faisant partie des constituants naturels de l'organisme. La présence de lymphocytes T et B auto réactifs est une caractéristique tout à fait normale de tout organisme. (Arnold et coll., 1993).

Malheureusement, il y a des lésions dues à la mise en jeu d'une réaction immunitaire vis-à-vis des constituants du soi. Certaines maladies chroniques, dont le diabète de type I surtout sont dues à l'effet pathogène des lymphocytes auto réactifs. (Bach, 1994).

Les influences génétiques et les facteurs déclenchants liés à l'environnement peuvent entraîner l'effondrement de la régulation immunologique normale. Alors les lymphocytes T ou B ou les deux à la fois, réagissent avec des auto- antigènes en attaquant les propres cellules de l'organisme, ce qui entraîne des maladies auto-immunes dévastatrices. Certains désordres de ce type proviennent d'une erreur de ciblage des anticorps, pour d'autres maladies auto-immunes, ce sont les lymphocytes T qui sont responsables de la maladie. (Rose et Mackey, 1992).

Le diabète s'accompagne de modifications importantes du système immunitaire. (Delovitsch et Singh, 1997) ce qui aggrave les complications vasculaires du diabétique.

En outre, l'importance des lymphocytes T dans la survenue du diabète auto immun est actuellement bien établie (Marrack et Kappler, 1993 ; Nossal, 1993). De plus, plusieurs études montrent que la fonction des lymphocytes T, notamment la sécrétion des « cytokines », est altérée au cours du diabète du type I et type II (Chang et Shaio., 1995 ; Rabinovitch, 1999 ).

L'incidence des infections est élevée chez les diabétiques de type I ou de type II (Itoh, 1989). Ceci est dû à des anomalies du système immunitaire.

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur l'immuno-modulation par les acides gras poly insaturés, notamment de la famille n-3, acide eicosapentaénoïque (EPA, C20 : 5 n-3) et acide docosahexaénoïque (DHA, C22 : 6 n-3) qui sont considérés comme immunosuppresseurs. Les mécanismes d'action pourraient être liés à une modification de la sécrétion des cytokines ou de la composition en acides gras des lipides des membranes des lymphocytes T. (Harbige, 1998). Ainsi les effets immunosuppresseurs des acides gras poly insaturés (AGPI) n-3 peuvent être exploités dans la prévention et le traitement du diabète sucré.

Dans ce travail, nous déterminons les effets in vitro des AGPI n-3 sur la prolifération des lymphocytes T et sur la composition en acides gras de leur membrane. L'étude est réalisée à la fois sur les patients atteints de diabète insulino-dépendant et de diabète non insulino-dépendant. De plus, ce travail permet d'identifier des anomalies au niveau des lymphocytes T des diabétiques par comparaison à ceux isolés à partir de sujets sains témoins.

Notre objectif principal est d'approfondir nos connaissances sur les altérations du système immunitaire associées au diabète, et de démontrer que les AGPI n-3 peuvent améliorer les stratégies de prévention et de traitement du diabète.

### ***1-3 Les différents types de diabète sucré :***

Le système immunitaire est directement responsable de 2 formes de diabète : le diabète par auto anticorps anti- récepteur de l'insuline, dont l'observation est exceptionnelle, et le diabète insulino-dépendant qui résulte de la destruction sélective des cellules  $\beta$ . (Boitard et Bach, 2002).

#### ***Diabète par auto anticorps anti-récepteur de l'insuline :***

Il est caractérisé par une insulino-résistance sévère, des épisodes d'hypoglycémie sont parfois rapportés chez ces malades. Les auto- anticorps ont une double action ; dans un premier temps, ils miment l'action de l'insuline provoquant une hypoglycémie et dans un second temps, ils bloquent le récepteur et induisent une insulino résistance et une hyperglycémie. (Bach et Chatenoud, 2001).

#### ***Diabète insulino-dépendant ou de type I :***

Sa prévalence suit dans les pays occidentaux un gradient nord-sud. La moitié des cas apparaît avant l'âge de vingt ans. Il s'agit d'une maladie auto-immune au cours de laquelle sont détectés, par immunofluorescence indirecte, des auto- anticorps reconnaissant des antigènes cytoplasmiques des cellules endocrines des îlots de Langerhans (anticorps anti-cellules d'îlots). Les auto- anticorps reconnaissent des antigènes exprimés par les cellules insulino-sécrétrices mais également par les autres cellules endocrines de l'îlot de Langerhans (cellule à glucagon, polypeptide pancréatique, somatostatine). Plusieurs auto- antigènes des cellules  $\beta$  sont la cible des auto anticorps et des lymphocytes T au cours du diabète : Glutamate décarboxylase, insuline et pro insuline, tyrosine phosphatase (IA2).....Il n'existe actuellement aucun argument dans la maladie humaine permettant d'identifier l'auto antigène éventuellement responsable de l'activation initiale du système immunitaire contre les cellules endocrines de l'îlot. (Caillat-Zuckman, 1999).

La prévalence des auto- anticorps anti- insuline au moment de la découverte clinique du diabète atteint 50 à 70% chez l'enfant et 30 à 50% chez l'adulte. La prévalence des auto-anticorps anti- glutamate décarboxylase est plus élevée, proche de 90%. Le syndrome hyperglycémique est, en fait, un événement tardif dans l'histoire naturelle de la maladie.



Il n'apparaît que lorsque plus de 70 à 90% des cellules  $\beta$  ont été détruites. Chez les sujets encore normo- glycémiques qui développeront ultérieurement un diabète, les auto-anticorps peuvent être détectés jusqu'à 10 ans avant l'apparition du diabète. La valeur prédictive positive de titres élevés d'anticorps anti- cellules d'îlots est supérieure à 90%. La valeur prédictive des anticorps anti- glutamate décarboxylase, insuline et tyrosine phosphatase remplacera dans l'avenir la technique de référence que constitue la détection des anticorps anti- cellules d'îlots par immuno- fluorescence indirecte (Carel et coll., 1999).

### *Le diabète non insulino-dépendant ou de type II :*

Ce type de diabète est également appelé diabète de la maturité car il apparaît souvent après la cinquantaine, ou diabète gras. Il est plus fréquent que le précédent. En effet, il représente plus de 80% de l'ensemble des diabètes, et c'est l'association d'une prédisposition génétique et de certains facteurs d'environnement qui mènent à l'éclosion d'un diabète de type II. (Zimmet et Lefebvre, 1996).

Le diabète représente un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires (MCV), qui sont la première cause de mortalité dans le monde, et la cause de plus de 50% de décès chez les diabétiques. (Calmarza et Vella, 1999; Kanters et coll., 2001; Mero et coll., 2000; Verges., 1999). Le facteur physiopathologique propre au diabète non insulino-dépendant (DNID) est l'insulinorésistance accompagnée d'hyperinsulinisme qui perturbe le métabolisme glucidique et lipidique, entraînant des atteintes vasculaires du diabète. (Mykkänen et coll., 1997; Yki-Jarvinen., 1995).

## II IMMUNOLOGIE :

L'immunologie a toute la beauté et la fascination, mais aussi toutes les complexités et incertitudes de la recherche biologique. (Zinkernagel, 2000)

L'immunologie a connu depuis le début de ce siècle, qui vit sa naissance, des progrès rapides faisant appel aux techniques et aux concepts les plus modernes de la biochimie et de la biologie cellulaire. Après la période des grandes vaccinations où Pasteur et son école jouèrent un rôle déterminant, ce furent les découvertes des anticorps, du complément et de leurs fonctions qui occupèrent les immunologistes jusqu'en 1940. Les vingt années qui suivirent furent celles de l'analyse structurale et génétique des immunoglobulines. Ces vingt dernières années sont celles de l'immunologie cellulaire et de l'immunogénétique. (Janeway et coll., 2001)

### **II-1 Définition :**

Le terme *immunité* (du latin *immunis*, libre de....), s'adressait initialement à la résistance des individus vis-à-vis des infections, s'est élargie aujourd'hui à l'ensemble des réactions tendant à éliminer des substances étrangères. Par extension, on désigne aussi sous ce nom l'ensemble des facteurs hormonaux et cellulaires, spécifiques ou non de la substance introduite, qui protègent l'organisme contre les agressions infectieuses et parasitaires et les proliférations malignes. (Male et coll., 1996 ; Townsend et coll., 1999).

L'arsenal de cellules qui coopèrent pour défendre l'organisme contre les agents infectieux provient d'un petit nombre de cellules présentes chez le fœtus dès la neuvième semaine. En quelques cycles de différenciation, toutes les cellules du système immunitaire se développent : les cellules souches identiques à elles et de nombreuses cellules spécialisées : les lymphocytes *B*, les lymphocytes *T* tueurs, les lymphocytes *T* auxiliaires, les macrophages,.....etc.(Nemazee, 2000).

## **II-2 Les cellules lymphocytaires T et B :**

Lorsqu'elles se différencient, les cellules reçoivent du génome et de leur environnement des signaux qui en font des lignées cellulaires capables de reconnaître les antigènes étrangers et de combattre efficacement les intrus. (Kagi et coll., 1996 ; Rajewski et coll., 1993).

von Boehm et al

Les cellules souches donnent naissance à deux grandes lignées de lymphocytes (et aux autres cellules sanguines). (Figure N°1).

L'une d'elles, celle des lymphocytes *B* (B pour Bourse de Fabricius, qui chez les oiseaux, joue le même rôle que la moelle osseuse chez les humains) (Banchereau et Rousset, 1997 ; Burrows et Cooper 1997), provient de la moelle osseuse et produit des anticorps qui se fixent aux antigènes étrangers, les signalant ainsi des cellules destructrices du système immunitaire ; ces lymphocytes luttent contre les agents pathogènes extracellulaires, telles les bactéries. (Mefre et coll., 2000). L'autre lignée celle des lymphocytes *T*, est issue du thymus : les lymphocytes *T* neutralisent les agents pathogènes intracellulaires tel le bacille de la tuberculose (Bradley et Watson, 1996 ; Marrack et Kappler, 1997) ; ils sécrètent également des molécules nommées lymphokines, qui dirigent l'activité des lymphocytes *B*, des autres lymphocytes *T* et de différents composants du système immunitaire. (Cerotoni et Tschopp, 1997 ; Mingari et coll., 1998 ; Mullbacher et coll., 1996).

La bourse de Fabricius et le thymus ont des fonctions distinctes, chacun d'eux semblant être à l'origine d'une classe particulière de cellules du système immunitaire. (Liu et coll., 1997).

Une fois formés, les lymphocyte *B* migrent vers la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes intestinaux ; quand ils rencontrent un antigène étranger, c'est à dire la signature moléculaire d'envahisseurs microbiens ou viraux, ils entrent en action. Les lymphocytes traquent sans arrêt les antigènes étrangers dans les systèmes vasculaire et lymphatique de l'organisme, s'arrêtant périodiquement dans les organes lymphoïdes. (Kershaw et coll., 1995 ; Mullbacher et Flynn., 1996).

Récemment, l'apoptose a été reconnu comme le phénomène basique qui assure une bonne différenciation des lymphocytes et l'élimination des cellules auto- réactives, le mécanisme permet de croire au maintient d'une tolérance et limite la non continuité de la réponse immune. (De Maria et Tesli, 1998).

Les lymphocytes *T* sont produits dans le thymus par les cellules souches qui ont quitté la moelle osseuse. (**Figure N°2**). Les cellules en cours de maturation passent par des étapes successives que l'on différencie par les protéines exprimées à la surface. (Schevac et coll., 2000).

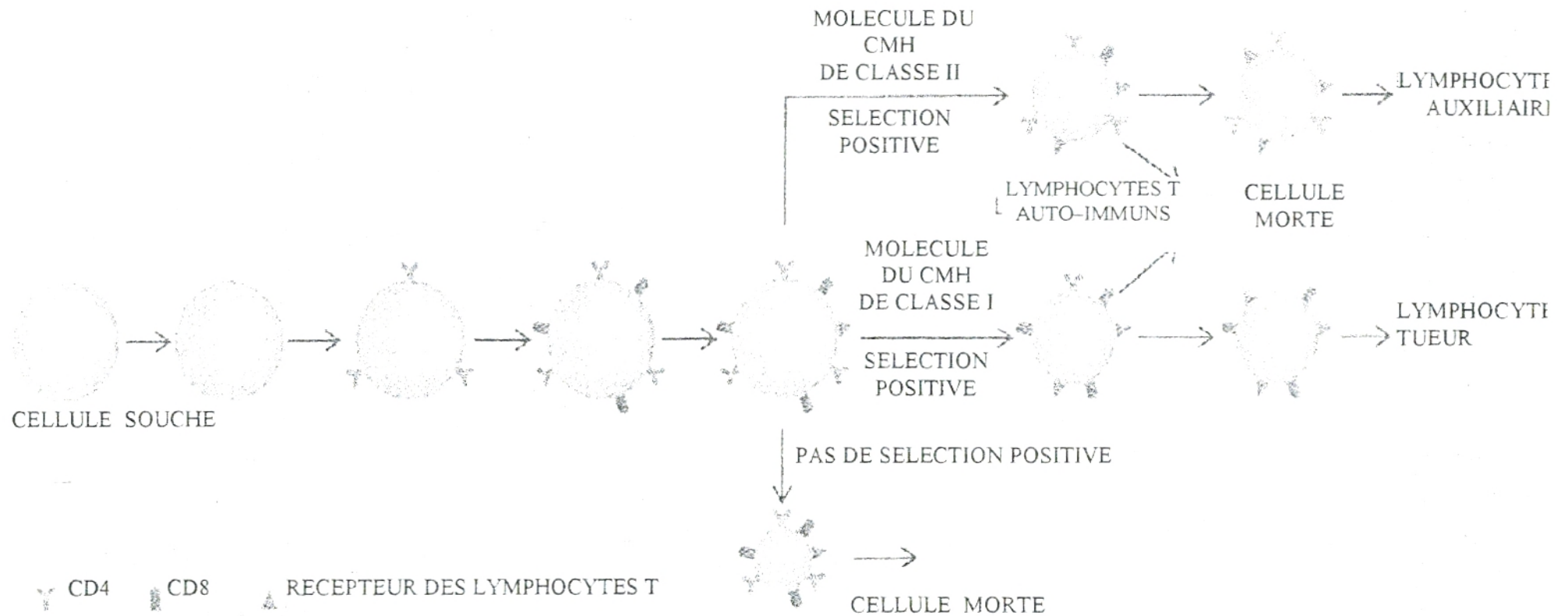


Figure N° 2 : Maturation et différenciation des lymphocytes T. (Nossal, 1993)

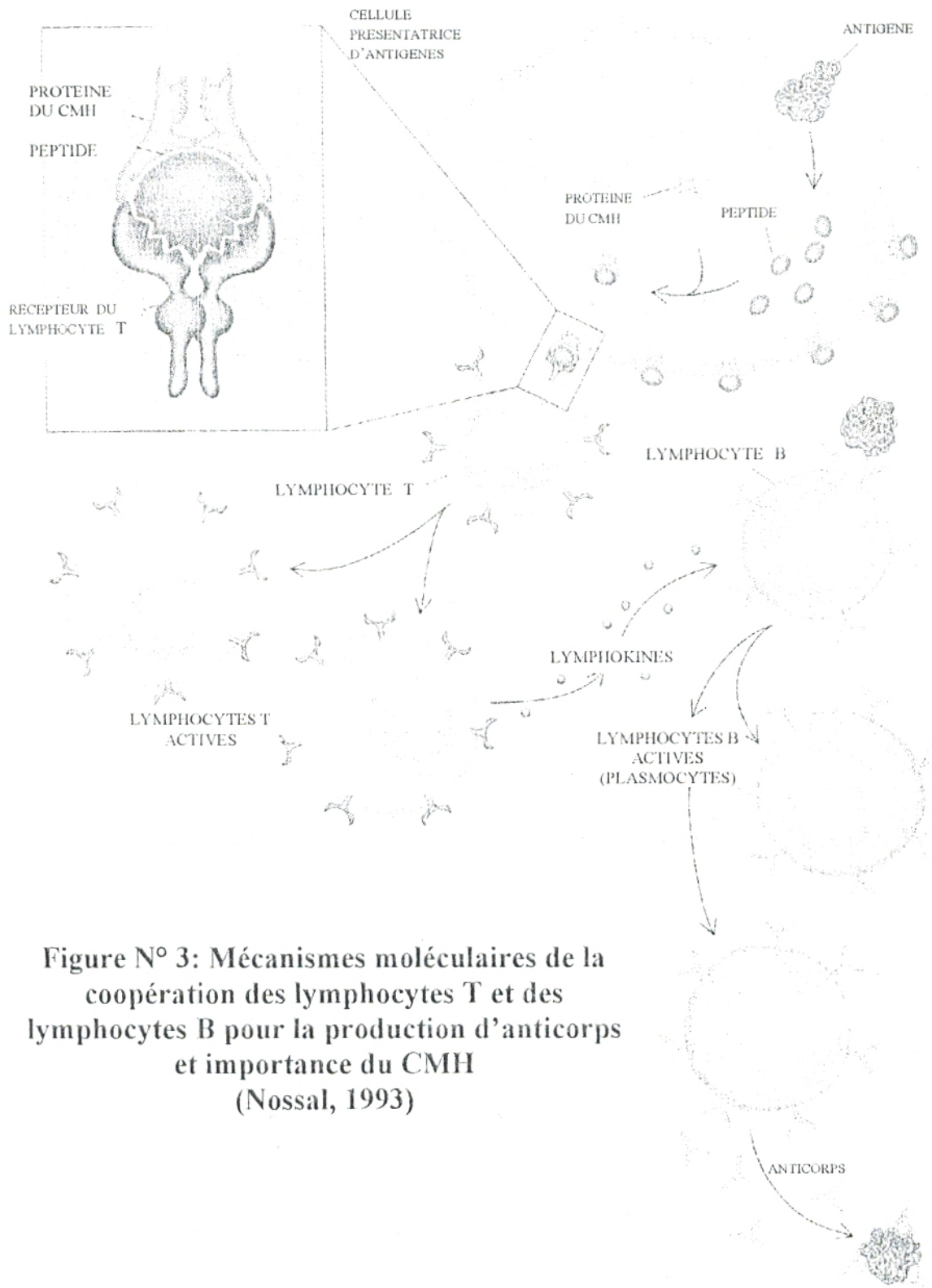
Les lymphocytes dont les récepteurs se lient aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, portées par des cellules adjacentes, deviennent des lymphocytes T auxiliaires, et ceux dont les récepteurs se lient aux molécules de classe I deviennent essentiellement des lymphocytes T tueurs ( les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I sont présentes sur toutes les cellules de l'organisme ; celles de classe II, seulement sur les cellules qui présentent les antigènes aux lymphocytes T). (Kuniyasu et coll., 2000 ; Takahashi et coll., 2000).

Les lymphocytes qui ne se lient à aucune molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, ou qui se lient aux auto- antigènes, meurent.

Les lymphocytes T et B coopèrent de façon continue pour assurer la défense de l'organisme. (Figure N° 3).

La première étape implique l'internalisation de l'antigène par le récepteur spécifique qu'est l'immunoglobine de surface. Suite à cette internalisation l'antigène va être dégradé sous forme de peptides et présenté aux lymphocytes T spécifiques par les molécules d'histocompatibilité de classe II exprimés à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes. De leur côté, les lymphocytes T auxiliaires spécifiques sont activés par l'antigène présenté sous forme de peptides et attirés par les lymphocytes B.(Coffman, 1993 ; Sakaguchi, 2000).

Ceci déclenche la production de diverses cytokines, c'est l'activation des lymphocytes B, résultant de l'action conjointe des cytokines et des signaux transduits par les récepteurs membranaires spécialisés qui aboutit à leurs prolifération et leurs différenciation en cellules productrices d'anticorps.



**Figure N° 3: Mécanismes moléculaires de la coopération des lymphocytes T et des lymphocytes B pour la production d'anticorps et importance du CMH (Nossal, 1993)**

### **II-3 Introduction aux maladies auto-immunes (MAI) :**

Les réactions immunitaires n'ont pas toujours un rôle favorable puisqu'elles peuvent entraîner des réactions d'hypersensibilité, par exemples sous la forme d'une anaphylaxie ou d'une maladie auto-immune quand un dérèglement du système immunitaire l'amène à réagir contre les propres tissus de l'organisme. (Paul, 1999).

Les cellules endocrines sont une cible privilégiée du système immunitaire au cours des maladies auto-immunes. (Hahn et coll., 1995 ; Kagi et coll., 1995).

Certaines maladies endocriniennes auto-immunes sont fréquentes, la prévalence du DID considéré comme tel, atteint 1 à 2 % en Finlande ou en Sardaigne, même si elle est un peu plus faible dans d'autres pays comme la France (0.2 à 0.4%).

Les manifestations cliniques des maladies endocriniennes auto-immunes traduisent l'interaction des effecteurs du système immunitaire mis en jeu avec le tissu. (O'Rourke et Mescher, 1993).

Les modifications du tissu cible sont caractérisées par un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes et de cellules présentatrices de l'antigène (macrophages, cellules dendritiques ...). (Maloy et Powrie, 2001)

Le DID est une MAI multifactorielle pour laquelle la susceptibilité naît des facteurs génétiques et environnementaux. L'hérédité est polygénique mais le génotype du CMH demeure le plus fort des déterminants génétiques (Bandelac, 1987 ; Tisch et McDevitt, 1996).

Pour le DID, la présence de lymphocytes T en amont est remarquable. La prédominance des lymphocytes T CD4 ou CD8 au sein de l'infiltrat varie selon le stade de la maladie auquel est analysé le tissu atteint. Pour le DID, la prédominance des lymphocytes T CD8 correspond vraisemblablement à un stade tardif de la maladie auto-immune, et à ce moment les lésions tissulaires peuvent aboutir à la disparition plus ou moins complète des cellules cibles de la réaction auto-immune. (Abbas et coll., 1996 ; Reiner et Seder, 1995 ; Scott, 1993 ; Seder et Legros, 1992).

La contribution génétique la mieux établie est celle apportée par le complexe majeur d'histocompatibilité. (Bottazzo, 1985).



## **Génétique du système HLA :**

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), ou système HLA chez l'homme est localisé sur le bras court du chromosome 6, où il occupe une région de 3600 kilo bases. (Steinman, 1993) .La région HLA totalement séquencée en 1999 (Nature, 1999), porte plus de 200 gènes codant pour des produits très divers, ce qui en fait la région du génome humain la plus riche en gènes exprimés.

Le CMH est par convention subdivisé en 3 régions, dont les gènes codent pour des produits qui diffèrent par leur localisation, leur structure et leur fonction.

*La région de classe 1* : la plus télomérique, contient des gènes de classe 1 dits classique HLA-A, B et C ainsi que des gènes HLA dits non classiques. (Garboczi et Coll., 1996).

*La région de classe 2* : la plus centromérique contient des gènes de classe 2, DR, DQ, DP, ainsi qu'une série de gènes codant pour des produits intervenants dans les voies de présentation antigénique. (Brown et coll., 1993).

*La région de classe 3* : intermédiaire, ne contient pas de gènes d'histocompatibilité, mais des gènes codant pour des produits intervenants dans la réponse immunitaire : certains facteurs du complément et des facteurs nécrosant des tumeurs (TNF  $\alpha$  et  $\beta$ ). (Parham., 1999). Au total 40% des gènes du CMH jouent un rôle dans la réponse immune.

Ce regroupement de gènes de l'immunité dans une même région n'est sans doute pas le fruit du hasard mais serait le reflet d'une co-évolution fonctionnelle. (Forbes et Towdsdale, 1999).

### III LES CYTOKINES :

Grâce à l'essor des différentes techniques immunologiques, biochimiques et génétiques, les connaissances sur les cytokines et leur rôle au cours des réponses immunitaires ont connu un développement considérable. L'importance des cytokines dans la physiopathologie des maladies du système immunitaire est de plus en plus évidente ainsi que leur très vastes potentialités thérapeutiques.

En plus de leurs effets pharmacologiques, les cytokines ont le plus souvent une activité sur la croissance et la différenciation cellulaire. (Cavaillon, 1996).

#### **III-1 Définition :**

Les réponses immunitaires résultent de la coopération entre sous populations cellulaires distinctes (lymphocyte T, lymphocyte B, macrophage ....) qui communiquent entre elles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires et d'un réseau constitué de facteurs solubles appelés « cytokines ».

La diversité d'origine des cytokines a d'abord posé un problème de terminologie. Le terme de « lymphokine » s'appliquait initialement aux facteurs produits par les lymphocytes et celui de « monokine » désignait les facteurs produits par les macrophages ou les monocytes. Puis le mot « interleukine » est apparu pour regrouper les lymphokines ou les monokines ayant pour cellules cibles d'autres leucocytes ou autres, comme c'est le cas pour l'interleukine 1. C'est dans ce contexte qu'a été proposé le terme plus général de « cytokines » qui tient le mieux compte de la réalité biologique. (Farrah et Smith, 1992).

Les cytokines sont de puissants agents pharmacologiques impliqués à la fois dans les réactions immunitaires et inflammatoires. Elles modulent les capacités fonctionnelles de nombreux types cellulaires et jouent un rôle essentiel au cours du développement de la réponse immune en contrôlant l'activation, la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules T et B. (Cavaillon, 1996).

### **III-2 Les cellules productrices de cytokines :**

Au cours de la réponse immunitaire, le lymphocyte T constitue une source importante de cytokines.

Leur production est induite après stimulation en présence d'antigènes ou de mitogènes (concanavaleine A, phytohémagglutinine)

S'il est clairement établi que les lymphocytes T, et surtout les  $CD4^+$ , représentent la source principale des cytokines, les sous populations T impliquées dans ce phénomène sont diverses et semblent varier en fonction du stimulus.

Les T auxiliaires  $CD4^+$  (helper) productrices de cytokines reconnaissent l'antigène en association avec les molécules de classe II du CMH.

Les clones de cellules Th1 (T helper de type 1) qui produisent de manière préférentielle de l'interleukine (IL-2) et de l'interféron ( $INF\gamma$ ), sont impliqués dans l'activation des macrophages. En revanche les clones Th2 (T helper de type 2), qui synthétisent préférentiellement de l'IL-4, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13, privilégient la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, d'où leur rôle clé dans l'immunité humorale. (Dong et Flavell, 2001).

Les Th1 et Th2 qui représentent le stade ultime de la différenciation, suite à l'action du mitogène, dérivent de la cellule Th0 qui a la propriété de synthétiser simultanément les cytokines de type Th1 et Th2. (Male et coll., 1996). On distingue également en amont des cellules Th 0, les cellules Th p (T helper ou auxiliaires précurseurs) qui sont en fait des gènes vierges de toutes stimulations ne produisant que de l'IL- 2. (Monsmann et coll., 1996).

Les gènes  $TCDS^+$  sont également capables de produire des cytokines bien qu'en plus faibles quantités que les  $TC4^+$ . Ces cytokines agissent de manière autocrine. (Monsmann et coll., 1997).

### **III-3 Caractéristique des cytokines:**

On ne les trouve pas dans les gènes au repos et elles ne sont produites que lors de l'activation par l'antigène ou des substances mitogènes.

Certaines sont exprimées non seulement sous la forme soluble mais également sous la forme membranaire et agissent comme des récepteurs de surface comme le TNF. (Asnagli et coll., 2001).

Les cytokines agissent sur leurs cibles comme des hormones peptidiques pour aboutir à leur effet spécifique. (Prolifération, différenciation). (Mantovani et coll., 1997).

### **III-4 Interleukine 2 (IL-2).**

Initialement appelée TCGF pour *T Cell Growth Factor* car elle permet la croissance des cellules T activées en culture à long terme. Cette cytokine représente un élément primordial dans la cascade des cytokines produites au cours des réponses immunitaires à médiation cellulaire.

Sa production est restreinte au lymphocyte T. Elle induit la prolifération des cellules T en se fixant sur un récepteur membranaire de forte affinité composé de 3 chaînes polypeptidiques ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) distinctes. (Moser et Loetscher, 2001).

Au niveau des lymphocytes T, l'IL-2 agit non seulement comme un facteur de croissance des gènes T activées, mais elle induit également la production d'autres cytokines. (Bendtzen et coll., 1998).

Elle augmente l'activité des cellules NK, et a un rôle dans la prolifération des lymphocytes B.

Son rôle majeur dans l'activation des fonctions des cellules T et NK, explique les résultats encourageants obtenus suite à son administration pour l'immunothérapie des tumeurs et du sida. (Yokoyama, 1998).

## IV MECANISME D'INDUCTION DU DIABETE :

Le diabète insulino-dépendant est une maladie chronique de l'enfance causée par la perte progressive des cellules pancréatiques  $\beta$  productrices d'insuline, provoquant un état d'hypo-insulinémie et d'hyperglycémie (Bach, 1995 ; Tisch et coll., 1996).

Connaître les mécanismes impliqués dans l'initiation de l'auto-immunité spécifique aux cellules  $\beta$  et la progression de leur destruction, résultant de la collaboration entre les macrophages et les cellules T, en association avec les auto-antigènes des cellules  $\beta$ , des antigènes du CMH de classe I et II sont essentiels pour vaincre la maladie. (Yoon et coll., 1995 ; Yoon et coll., 1997).

### ***IV-1 Rôle des macrophages dans cette auto-immunité :***

Plusieurs études démontrent que la majeure partie de la population cellulaire qui infiltre les îlots durant les premiers stades du diabète sont les macrophages et les cellules dendritiques (Kolb et coll., 1986 ; Ziegler, 1992). Ces cellules précèdent l'invasion des îlots par les lymphocytes T, les cellules NK et les lymphocytes B (Lee et coll., 1988).

Les macrophages jouent le rôle important dans l'initiation du diabète (Lee et coll., 1988 ; Oschilewski et coll., 1985).

Parmi les rôles clés que jouent les macrophages ; la présentation restreinte des antigènes aux cellules T helper grâce aux molécules du CMH de classe II reste le plus important. (Appels et coll., 1989 ; Unuaue et coll., 1984.).

La réponse immune aux antigènes spécifiques présents sur les cellules  $\beta$  du pancréas implique l'activation des cellules T helper, un événement qui ne prend place que si les cellules T helper interagissent avec les antigènes présentés sur la surface des macrophages ou tout autre cellule présentatrice de l'antigène comme la cellule dendritique. (Bach, 2000 ; Unuaue et coll., 1987).

Ceci suggère que la présentation des auto-antigènes spécifiques aux cellules  $\beta$  par les macrophages et/ou les cellules dendritiques aux cellules T helper peut être l'étape initiale au développement d'une destruction des cellules  $\beta$  spécifique au diabète insulino-dépendant auto-immun. (Koik et coll., 1987 ; Nagata et Yoon, 1992 ; Yoon et coll., 1999).

#### **IV-2 Rôle des cellules T dans la destruction des cellules $\beta$ :**

Au début du DID, les cellules T sont abondantes parmi les cellules infiltrant les îlots. (Gepts, 1981 ; Hannien et Coll., 1992).

Des études utilisant des souris diabétiques non obèses (NOD) démontrent que la plupart des cellules infiltrant les îlots sont des cellules T. (Edouard et Coll., 1993 ; Koëvary et coll., 1983). Par ailleurs, des substances anti-cellules T préviennent la survenue du diabète chez ces souris. (Christiansen et coll., 1993 ; Ogawa et coll., 1985 ; Semp et coll., 1991).

Les cellules T sont essentielles mais non suffisantes pour induire le diabète. La collaboration des macrophages et des cellules dendritiques reste importante (Hutchings et coll., 1990 ; Ihm et Yoon, 1990 ; Jørgensen et coll., 1994 ; Lo et coll., 1993).

Le DID requiert à la fois les TCD 4+ et les TCD 8+. (Bandelac, 1988 ; Bandelac et coll., 1987 ; Christiansen et coll., 1993 ; Miller et coll., 1988 ; Thivolet et coll., 1991 ; Yagi et coll., 1992).

Toujours est il que les rôles spécifiques que jouent les CD8+ et CD4+ demeurent obscures. (Miyazaki et coll., 1985 ; Mori et coll., 1986).

Alternativement, les cellules T CD4+ diabétogènes subissent l'activation et la différenciation en des cellules effectrices pour la libération des auto- antigènes des cellules  $\beta$ . Ce phénomène a pour résultat leur destruction à médiation cellulaire par les cellules T CD8+. Cette hypothèse est appuyée par des recherches effectuées sur des souris diabétiques (Christiansen et coll., 1993 ; Kartz et coll., 1993 ; Wicker et coll., 1994).

Les cellules TCD8+ détruisent sélectivement les cellules  $\beta$  in vitro, alors que les TCD4+ se lient étroitement à elles. (Nagata et Yoon, 1992).

### **IV-3 Rôle des cytokines dans la destruction des cellules $\beta$ :**

Les médiateurs biochimiques de la cytotoxicité comme les cytokines, perforines et protéases peuvent aussi sélectivement détruire les cellules  $\beta$ . (Mandrup-Pulsen et coll., 1985 ; Pankewycz et coll., 1995).

Récemment, une étude sur le rôle des cytokines dans le DID a démontré que l'interleukine 1(IL-1) est sélectivement cytotoxique aux cellules  $\beta$  du pancréas in vitro. (Bendtzen et coll., 1986 ; Sandler et coll., 1991 ; Southern et coll., 1990).

Il a été suggéré que les récepteurs de l'IL-1 sont présents sur les cellules  $\beta$  (Eirizik et coll., 1991), et que la liaison IL-1 au récepteur IL-1 induit une nouvelle transcription de l'ARN m et d'une deuxième synthèse protéique. (Eirizik et coll., 1991 ; Hughes et Coll., 1990).

La destruction produite par l'IL-1 est potentialisée par le facteur de la Nécrose tumorale (TNF) (Mandrup-Poulsen., 1987). Le TNF $\alpha$  inhibe la libération de l'insuline. In vitro, les études démontrent que l'effet cytotoxique des cytokines interleukine 6 (IL-6), TNF, lymphotoxine, et l'interféron (INF $\gamma$ ) sur les îlots est cumulatif. (Rabinovitch et coll., 1989 ; Sandler et coll., 1990).

Au cours de la dernière décennie, le rôle des cytokines Th1 et Th2 dans la pathologie du diabète a été étudiée d'une manière très étendue (Rothe et coll., 1994 ; Fox et Danska, 1997).

En général, les cytokines Th1 comme les IL-2 et INF $\gamma$  semblent activer l'immunité induisant ainsi le développement d'un DID, pendant que les cytokines Th2 telles que les IL-4 et les IL-10 ont un rôle suppresseur de l'activité immune, prévenant ainsi d'un DID.

L'accélération du diabète est corrélée avec l'augmentation de l'expression des INF $\gamma$  (Rothe et coll., 1994). Ces derniers ont été décelés dans l'infiltrat lymphatique d'un diabète récent chez des patients (Somoza et coll., 1994), et une baisse de l'expression des IL-4 dans les cellules sanguines mononucléaires de la périphérie a été remarquée chez ces patients (Berman et coll., 1996).

D'autres études ont suggéré un rôle important des IL-2 dans la pathologie du DID.

Cependant, le rôle des cytokines Th1 et Th2 dans la pathologie de ce dernier d'un point de vue auto-immun reste controversé. (Wogensen et coll., 1994). Par exemple, l'administration de l'IL-2 aux rats (BB) accélérât l'expression de la maladie. (Kolb et coll., 1986). Mais dans d'autres études, elle réduit l'incidence de la maladie chez ces rats (BB) et les souris diabétiques non obèses (NOD). (Burstein et coll., 1987 ; Serreze et coll., 1989). Il n'en reste pas moins que le rôle individuel d'une cytokine dans le développement d'un DID est très complexe.

#### ***IV-4 Rôle des radicaux libres dans la destruction des cellules $\beta$ :***

Le mécanisme repose sur l'interaction de la molécule (Fas-Ligand), (Fas-L : qui est une des voies d'activation moléculaire transmettant le signal d'apoptose, c'est une protéine de surface qui une fois en contact avec son Ligand induit l'apoptose de la cellule à la surface de laquelle elle est exprimée), exprimée par les lymphocytes T cytotoxiques activés et de Fas-CD95 exprimée par la cellule cible. Les cellules  $\beta$  humaines n'expriment pas Fas de façon constitutionnelle. (Corbett et McDaniel, 1992 ; Faust et coll., 1996.).

En revanche l'IL-1 peut induire l'expression de Fas par ces dernières purifiées secondairement à la production de monoxyde d'azote (NO : Toxique en excès), elle-même liée à l'activation de la NO- synthase.

L'insuline est un des auto- antigènes responsable de l'activation des fonctions des Lymphocytes T, de la production des cytokines et du développement du DID (Tchorzewski H. et coll., 2001).



#### **IV-5 Collaboration des macrophages avec les lymphocytes T dans l'initiation et la progression de la destruction des cellules $\beta$ en conjonction avec les molécules du CMH de la classe I et de la classe II :**

Une des fonctions clé du macrophage est la présentation de l'antigène aux cellules T helper via les molécules du CMH de la classe II. (Unuaue et coll., 1984 ; Unuaue et coll., 1987).

Ainsi, les auto- antigènes des cellules  $\beta$  (comme l'expression retardée des auto-antigènes dans la cellule  $\beta$ ) qui font que la cellule est reconnue comme un non soi. (Ko et coll., 1991 ; Ko et coll., 1994).

Les macrophages ont un rôle dans la présentation des auto- antigènes aux cellules T helper grâce aux molécules de la classe II du CMH. (Unuaue, 1984 ; Unuaue et coll., 1987).

Ainsi, antérieurement au développement d'une insulinite, il peut y avoir des changements sur les cellules  $\beta$  (tel que l'expression retardée de leur auto- antigène), qui font que la cellule est reconnue comme un non soi. (Ko et coll., 1991 ; Ko et coll., 1994).

De plus, il est suggéré que les auto- antigènes des cellules  $\beta$ , sont libérés par un revirement spontané des cellules  $\beta$ , ou par la lésion de ces dernières par des facteurs environnementaux (infections virales...) aboutissant à leur présentation par les macrophages. (Yoon, 1995 ; Yoon, 1996).

Ainsi, la présentation des auto- antigènes spécifiques aux cellules  $\beta$  par les macrophages aux T CD4+ peut être l'étape initiale au développement du diabète auto-immun. **(Figure n°4)**

Durant ce procédé, les macrophages activés sécrètent l'IL-12, l'IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines. L'IL-12 active les cellules Th1 de type CD4+, qui à leur tour sécrètent L' INF $\gamma$  et l'IL-2.

La sécrétion de L'INF $\gamma$  génère des macrophages cytotoxiques parmi les macrophages au repos. Ces macrophages cytotoxiques sécrètent de L'IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  et des radicaux libres qui sont des substances toxiques aux cellules  $\beta$ .

Simultanément, L'IL-2 et d'autres cytokines libérées des cellules Th1 de type CD4+ activent les cellules T CD8+ pré- cytotoxiques. Ces substances peuvent aussi induire la migration des cellules T CD8+ pré- cytotoxiques périphériques vers les îlots inflammés sans doute par induction de l'expression des récepteurs spécifiques sur les cellules endothéliales.

Les cellules T CD8+ pré- cytotoxiques portant les récepteurs spécifiques à l'antigène des cellules  $\beta$  se différencient en cellules T CD8+ cytotoxiques qui répondent à la reconnaissance des peptides spécifiques des cellules  $\beta$  liés aux molécules du CMH de la classe I en présence des cellules T CD 4+ helper. (Cella et coll., 1997 ; Kurts et coll., 1998)

Les cellules T CD8+ cytotoxiques provoquent des lésions dans les cellules  $\beta$  par la libération des perforines (protéines) et de granzym (sérine estérases) après avoir reconnu les peptides- CMH classe I à la surface des cellules aboutissant à une mort cellulaire certaine, et/ou par l'apoptose à médiation cellulaire par le biais de la protéine Fas. (Albert et coll., 1998 ; Kwon et coll., 1999 ; O'Brien et coll., 1997).

Les T CD8+ ne peuvent migrer vers les îlots du pancréas ou y provoquer des lésions sans la présence des cellules Th1 de type CD4+ et des macrophages. (Ingulli et coll., 1997 ; Matsue et coll., 1999).

De cette façon, Les macrophages activés, les CD4+ et les CD8+ agissent synergiquement pour détruire les cellules  $\beta$ , en association avec les auto- antigènes spécifiques des cellules  $\beta$  et les molécules de la classe I et II du CMH. (Bach et coll., 1995 ; Rossini et coll., 1993.).

Le tout aboutissant au développement d'un diabète insulino- dépendant auto- immun. (Green et Flavell, 1999 ; Ridge et coll., 1998).

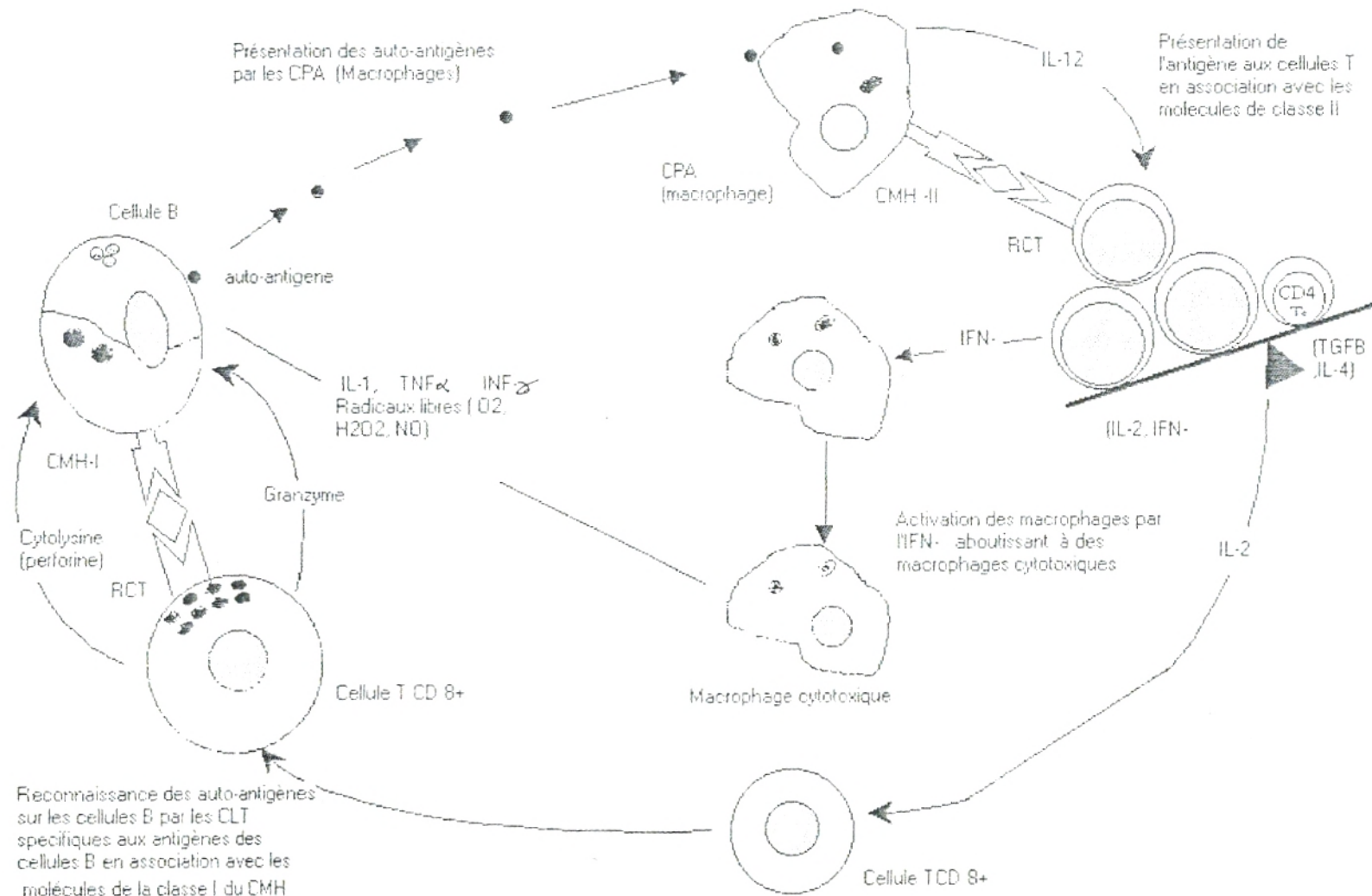


FIG N° 4 : Les mécanismes de l'installation du diabète insulino-dépendant auto-immun. (Yoon et coll., 1997)

## V Effets des acides gras et des lipides alimentaires sur les cellules du système immunitaire

L'acide palmitique peut être allongé jusqu'à l'acide stéarique, un substrat de la  $\Delta^9$ -désaturase, donnant ainsi de l'acide oléique (18 :1n-9). Les animaux ne possèdent pas les enzymes  $\Delta^{12}$ - ou  $\Delta^{15}$ -désaturase qui produisent les acides linoléique (18 :2n-6) et  $\alpha$ -linoléique (18 :3n-3) respectivement ; ces enzymes se trouvent dans les plantes qui contiennent donc des proportions élevées d'acides gras poly insaturés n-6 et/ou n-3 (AGPI). Etant donné que ces acides gras sont nécessaires pour la structure et la fonction de la membrane, ils doivent être consommés dans le régime des animaux, et sont donc appelés acides gras essentiels. (Calder, 1996).

Aussi bien les animaux que les plantes possèdent les enzymes pour allonger et désaturer les acides désaturés palmitoléique, oléique, linoléique et  $\alpha$ -linoléique. Les actions de ces enzymes font apparaître quatre familles distinctes de AGPI existant (n-7, n-9, n-6 et n-3). (**Figure N° 5**). Les acides gras agissent comme des substrats énergétiques et comme constituants de la membrane. (Calder, 1999).

Les acides dihomo- $\gamma$ -linoléique, arachidonique et eicosapentaénoïque sont des précurseurs des éicosanoïdes et les acides myristique et palmitique peuvent être attachés à certaines protéines de façon covalente. De plus, certains acides gras insaturés agissent comme des messagers intracellulaires seconds. Les éicosanoïdes sont des régulateurs importants du développement et des fonctions des lymphocytes T et B, des cellules NK et des macrophages.

Dans les conditions normales, la plupart des éicosanoïdes sont dérivés de l'acide arachidonique. Cependant, lorsque des niveaux élevés de AGPI n-3 sont consommés dans l'alimentation, il se produit moins d'éicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique. A la place, des éicosanoïdes sont formés à partir de l'acide éicosapentaénoïque. Ceci peut être avoir une signification fonctionnelle, étant donné que les éicosanoïdes produits à partir de l'acide éicosapentaénoïque sont d'habitude moins puissants biologiquement que ceux formés à partir de l'acide arachidonique.

Les acides gras insaturés inhibent un certain nombre de fonctions immunes de la cellule *in vitro*, y compris la prolifération des lymphocytes T et B, et la cytotoxicité médiée par les cellules NK et T cytotoxiques, et la production de cytokines par des lymphocytes et des macrophages. (Hung et coll., 1999). L'acide éicosapentaénoïque semble être le plus puissant inhibiteur de ces activités, bien que d'autres AGPI n-3 et AGPI n-6 soient aussi des inhibiteurs. Ces effets des AGPI semblent être indépendants des éicosanoïdes. La supplémentation en AGPI n-3 de l'alimentation d'animaux de laboratoire ou de l'homme résulte dans la suppression de la prolifération des lymphocytes T et B, de l'activité des cellules NK et de la production de cytokines dérivées de cellules T, toutes testées par la suite *in vitro*. (Prisco et coll., 1998)

Les régimes riches en AGPI n-6 (acide soit linoléique, soit  $\gamma$ -linoléique), ou en acides gras monoinsaturés n-9 affectent également les fonctions lymphocytaires ; une suppression de la prolifération lymphocytaire et des activités cytotoxologiques ont souvent été observées. (Poisson, 1991). Les résultats d'études de manipulations diététiques de ce genre sur la production de cytokines dérivées de macrophages sont moins clairs, avec un certain nombre de résultats contradictoires qui ont été reportés. (Calder, 1999). Ainsi, il apparaît que les lipides de l'alimentation peuvent exercer des effets immuno-modulateurs.



Fig. N° 5 : Biosynthèse des différents acides gras par les désaturases et les élongases. (Calder, 1996)

Les lipides jouent un rôle significatif dans le fonctionnement normal et pathologique des cellules du système immunitaire. (Dvorak et coll., 1983 ; Goetzl et coll., 1995 ; Henning et coll., 1996 ; Hopkins et coll., 1981 ; Pushkareva et coll., 1995 ; Roper et coll., 1990 ; Schlager et coll., 1983 ; Shipman et coll., 1988).

En plus des besoins physiologiques des cellules du système immunitaire pour les AGE, la modulation de ces derniers peut affecter le processus normal, et le processus pathologique. (Calder, 1996 ; Harbige, 1998 ; Henning et coll., 1996).

Les mécanismes biochimiques et immunologiques par lesquels les AG affectent l'immunité et l'auto-immunité ont pendant longtemps demeuré obscures. Récemment, il a été démontré que l'immunorégulation se fait par la nutrition. (Harbige, 1998).

Plusieurs études ont montré l'effet préventif des AGPI n-3 (Stampfer et coll., 2000) vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (MCV). (Bonaa et Coll., 2000). Les eskimos et les japonais montrent une incidence faible aux maladies cardiovasculaires (MCV) comparés aux autres populations. (Bang et coll., 1976 ; Robertson et coll., 1998).

En fait contrairement aux AGS et le cholestérol impliqués dans l'athérosclérose, les AGPI n-3 (EPA et DHA) sont considérés comme des agents vasodilatateurs et anti-hypertensifs. (Wesley, 1998).

Plusieurs mécanismes de l'action des AGPI n-3 impliquant la baisse de la pression artérielle (PA) ont été proposés.

Dans un model expérimental de Spontaneously hypertensive rats (rats SHR), un régime à base d'EPA atténue le développement de l'hypertension artérielle (HTA) chez les jeunes et vieux animaux. (Frenoux et coll., 2001 ; Singer et coll., 1990).

Dans une autre étude expérimentale sur les humains, un régime à base d'EPA diminue la pression sanguine, l'agrégation plaquettaire, et améliore la concentration des lipides plasmatiques. (Yosefy et coll., 1996).

En plus des effets anti-hypertensifs, les AGPI ont un effet immunosuppresseur. (Calder, 1999 ; McMurray et coll., 2000). Des études épidémiologiques ont démontré la diminution de l'incidence inflammatoire chez les eskimos et les japonais. (Simopoulos et coll., 1991).

En effet, un régime riche en AGPI n-3 a un effet thérapeutique anti-inflammatoire chez les gens atteints d'arthrite rhumatoïdale. (Kremer, 1991).

En outre, l'administration de triacylglycérol contenant de l'EPA en intraveineuse à des volontaires en bonne santé a supprimé l'activité des NK chez ces derniers. (Yamashita et coll., 1991).

L'acide arachidonique (AA) libéré des phospholipides membranaires durant l'activation cellulaire est métabolisé par la voie des cyclooxygénases en prostaglandines (PG) et thromboxanes, et par la voie 5-lipoxygénase en leukotriennes.

Ces dérivés sont connus pour agir comme des médiateurs dans la régulation de plusieurs systèmes physiologiques incluant le système immunitaire.

Les prostaglandines de la série E (PGE) sont des médiateurs des réponses inflammatoires aiguës et influencent les fonctions immunologiques. (Kunkel et coll., 1984 ; Leung et coll., 1980 ; Webb et coll., 1980)

La production de leukotriennes en excès peut exacerber l'arthrite rhumatoïdale, l'asthme et le psoriasis. (Davidson et coll., 1983 ; Drazen et coll., 1987 ; Fogh et coll., 1986)

L'EPA et le DHA peuvent agir comme des inhibiteurs de l'AA (Corey et coll., 1983 ; Lee et coll., 1984 ; Lokesh et coll., 1988 ; Yoshino et coll., 1987).

L'EPA a une analogie structurale avec l'AA, est métabolisé en une série de PG, de thromboxanes et de leukotriennes qui d'un point de vue structural ne diffèrent que par l'addition d'une double liaison de ceux dérivés de l'AA. (Figure N°6).

Les effets physiologiques de ces produits d'EPA diffèrent des métabolites produits par l'AA. (Lee et coll., 1984 ; Leitch et coll., 1984).



D'un autre coté, le DHA est essentiel pour le développement fonctionnel du système nerveux, y compris la rétine.

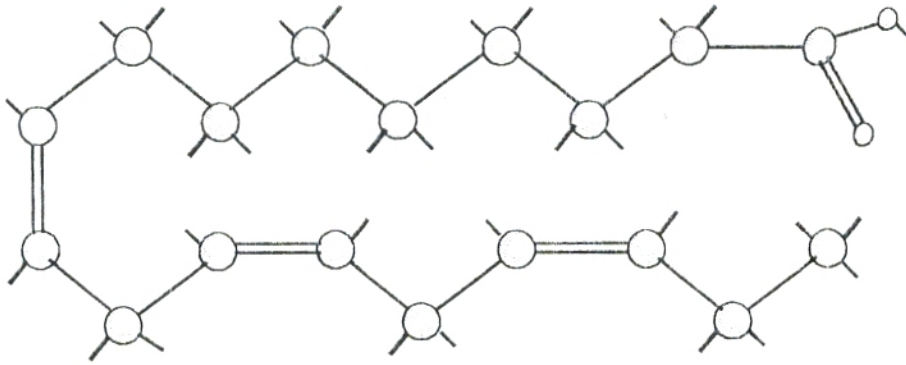
Le DHA a d'autres effets biomédicaux comme la réduction de l'agrégation plaquettaire et l'augmentation des effets des traitements anti-cancérigènes. (Guffy et coll., 1984 ; Von Schacky et Weber , 1985).

Le DHA inhibe non seulement l'infiltration des CD4+ mais aussi l'expression de l'ARNm pour l'INF $\gamma$ , l'IL-6, l'IL-1  $\beta$  et l'IL-2. (Tomobe et coll., 2000). Le DHA diminue aussi l'expression des CD4 et CD8 sur les T circulants. (Sasaki et coll., 2000).

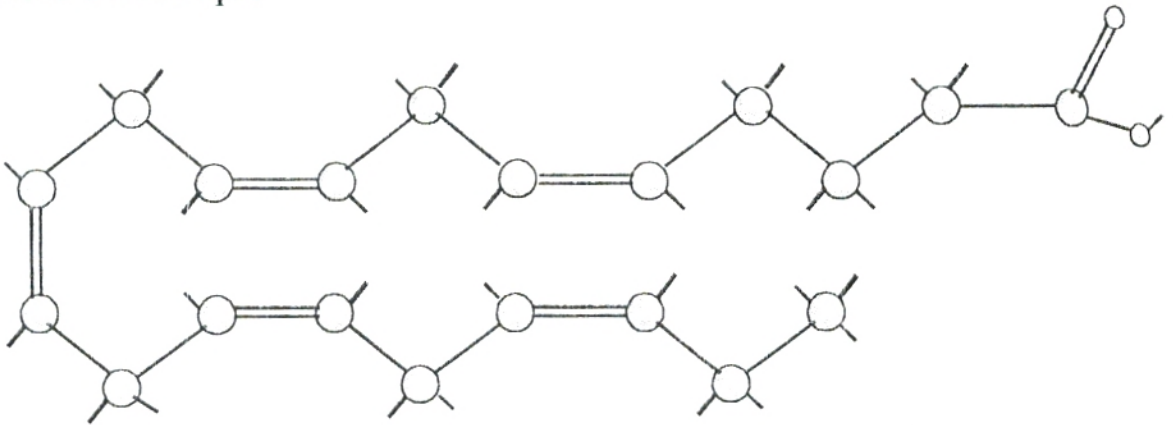
Les AGPI n-3 et surtout l'EPA déplacent l'acide arachidonique (AA) des phospholipides membranaires , ce qui implique que les effets des AGPI n-3 sur les cytokines pro- inflammatoires sont indirectes, ceci démontre l'importance du métabolisme de l'AA sur leur régulation. (Harbige, 1998).

Les effets des AGPI n-6, sur la fonction immunitaire, sont moins étudiés que ceux des AGPI n-3.

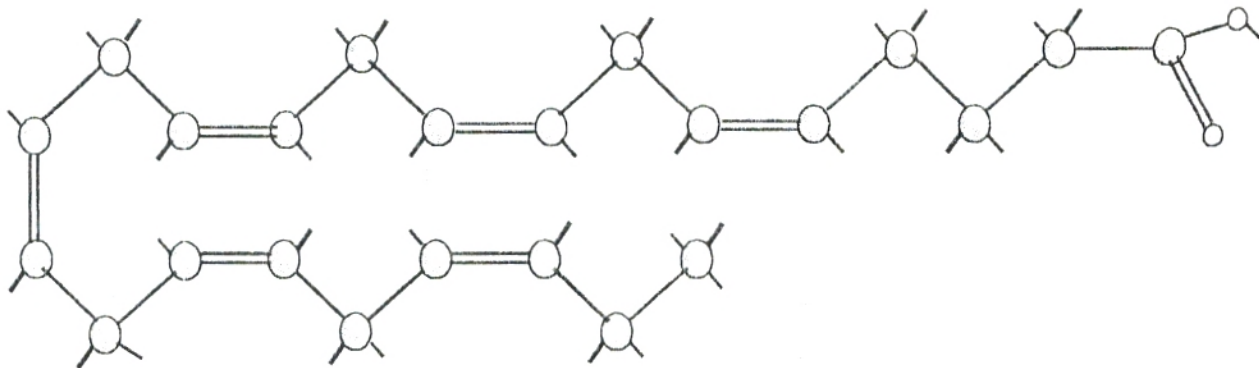
La consommation de l'acide  $\gamma$  linoléinique a augmenté le taux de TGF $\beta$  et diminué celui de l'IL-4 et de l'IL-10. (Harbige et Fisher, 1997). Ceci est en accord avec les effets des PGE1 et PGE2 sur l'IL-4 et l'IL-10. (Harbige et coll., 1997).



Acide  $\alpha$  linoléique



Acide eicosapentaénoïque



Acide docosahexaénoïque

**FIG. N° 6 : Analogie structurale des AGPI de la famille n-3 et de l'acide  $\alpha$  linoléique précurseur des AGPI de la famille n-6 (Poisson, 1991)**

La substitution des AGPI n-6 dans les phospholipides des membranes plasmiques, a réduit la production des eicosanoïdes n-6 et l'inhibition de l'activité des lipoxygénases et des cyclooxygénases (Simopoulos et coll., 1991).

Deux modèles différents de la sécrétion des cytokines par les cellules T amènent à des réponses fonctionnelles différentes. (Mosmann et Coffman, 1989) :

- Les cellules Th1 produisent de l'IL-2, de l'INF $\gamma$  et du TNF $\beta$ , non synthétisés par les cellules Th2, ces dernières produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10
- Les cellules Th1 augmentent l'activité inflammatoire, alors que les cellules Th2 synthétisent des cytokines qui aident les lymphocytes B à se développer en cellules produisant des anti- corps.
- Plus tard, des cellules Th3 ont été caractérisées (Weiner, 1997), et elles produisent le transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), aident les Immunoglobulines A (IgA) et ont des propriétés suppressives.
- L'équilibre de la production des cytokines par les cellules Th1, Th2 et Th3 affecte le type de la réponse immunitaire générée.

Les eicosanoïdes affectent ces mécanismes d'immunorégulation (Phipps et coll., 1991) et peuvent ainsi expliquer en partie les relations complexes entre le système immunitaire, les eicosanoïdes et les AGPI.

En outre, l'équilibre entre les AG membranaires et les eicosanoïdes influence les réactions inflammatoires. (Calder, 1996 ; Henning et coll., 1996; Lefkowitz, 1988; Ross, 1993; Tate et coll., 1989; Terano et coll., 1984).

Plusieurs investigations ont montré une réduction de l'expression moléculaire du CMH II après administration d'AGPI n-3 (Huang et coll., 1992 ; Sherrington et coll., 1995). Ce qui empêche les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) de présenter l'antigène aux cellules T.

Donc, une consommation d'huile de poisson chez les humains réduit l'expression des molécules DR du CMH II sur les monocytes de la périphérie ce qui retient sur les CPA. (Hughes et coll., 1995). Chez l'homme, cette même consommation réduit le pourcentage des CD4+ et augmente celui des CD8+. (Meydani et coll., 1993).

## VI- Voie des MAP kinases :

L'EPA et le DHA suppriment la production des PGE2 dérivés de l'AA. (Surette et coll., 1995).

La PGE2 est en elle-même un agent anti- prolifératif pour les lymphocytes T. (Huang, 1989). Le DHA et l'EPA influencent la génération des seconds messagers des lipides intracellulaires. Le diacylglycerol (DAG), un activateur physiologique de la protéine Kinase C (PKC) est un nouveau second messenger intracellulaire et semble promouvoir la prolifération des lymphocytes T. (Jolly et coll., 1997).

La PKC est impliquée dans l'expression du gène, la croissance, la différenciation, et l'exocytose. (Nishizuka, 1995). Son activation requiert le DAG comme activateur et la phosphatidylsérine (PS) comme cofacteur. (Madani et coll., 2001).

La production du DAG est assurée par l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) catalysé par la phospholipase C. La seconde phase de la génération du DAG est associée à une hausse de l'activation de la phospholipase D catalysant l'hydrolyse du phosphatidylcholine (PC), produisant ainsi du phosphatidate qui peut être transformé en DAG grâce à l'action d'une phosphohydrolase. (Khan et Hichami, 1999 ; Sebdalt et coll., 1992).

L'activation de la PKC par le DAG est stéréospécifique et requiert le *sn-1,2* DAG. La présence des AGPI en position *sn-2* du DAG semble importante dans cette activation. Ces derniers remplacent et réduisent le contenu membranaire en AA, ce qui affecte l'activité de la PKC directement ou via la production du DAG après hydrolyse. (Madani et coll., 2001).

Dans les cardiomyocytes, l'addition du DHA module la contraction cellulaire via la production du DAG contenant cet AGPI et son action sur la PKC. (Bordoni et coll., 1992). D'un autre coté, l'EPA incorporé au DAG réduit les complications vasculaires associées au diabète. (Kuroki et coll., 1998).

La mitogen activated protein kinase (MAPK), les extracellularly regulated kinases 1 et 2 (ERK1/ERK2) et la MAPK kinase- ERK kinase 1/2 (MEK 1/2) sont toutes des voies qui jouent un rôle important et crucial dans la communication de signaux extracellulaires dans le nucleus où il y a régulation de l'expression génique. (Robbins et coll., 1994 ; Whitehurst, 2000).

Les ERK 1/2 peuvent être doublement phosphorylés et activés par un duo de kinases spécifiques MAPK kinase-ERKkinase 1/2 (HEK 1/2).

Les substrats des MEK 1/2 sont ERK1 et ERK2.

L'EPA et le DHA semblent moduler l'activation des MAPK dans le sens ou à contre sens des MEK 1/2.

D'un autre côté, l'AA augmente l'activité des enzymes MAPK, et cette compétition ne peut qu'être bénéfique pour la maladie auto- immune : MAI (Denys et coll., 2001 ; Khan et Hichami, 2000)

**MATERIEL ET  
METHODES**

## I Population étudiée :

Cette étude porte sur deux populations d'adultes :

L'une comprenant des sujets diabétiques et l'autre des sujets non diabétiques considérés comme témoins.

La sélection des sujets se fait par le personnel du centre des diabétiques de Sidi Chaker de Tlemcen. Les deux formes de diabète sont prises en considération ; l'une dépendante de l'insuline : diabète de type I, et l'autre non dépendante ; diabète de type II.

- Dans le diabète de type I : Les facteurs pris en considération sont la présence d'une hyperglycémie, d'une polyurie, d'une polydipsie, d'une polyphagie, d'une asthénie, d'un amaigrissement et d'une glycosurie.
- Dans le diabète de type II : Le diagnostic repose sur la présence d'une surcharge pondérale, d'une hyperglycémie à jeun et post-prandiale, ou d'autres manifestations associées au diabète comme les infections.....

Les caractéristiques des malades sélectionnés sont soigneusement notées par le personnel et comprennent : l'âge, le poids, la taille, la durée du diabète, le traitement utilisé (insuline, hypoglycémiant oraux, suivi diabétique) et les complications associées (atteinte rénale, infection urinaire, hypertension artérielle, rétinopathie, insuffisance cardiaque ..... ) et l'étude des antécédents personnels et familiaux. (Voir questionnaire en annexe)

Les caractéristiques de la population étudiée sont représentées dans le tableau I :

Tableau I : Caractéristiques de la population étudiée.

	Nombre	Age (ans)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Durée du diabète (ans)	Glycémie	Traitement		
						Insuline	Hypoglycémiant	Régime
T 20-40 M	12	26.66 ± 2.886	21.6 ± 2.142	/	0.95±0.06	/	/	/
T 20-40 F	12	29 ± 1	22.06 ± 0.542	/	0.90±0.05	/	/	/
DID M	12	36 ± 1.732	23.913 ± 2.08	18.661 ± 8.583	2.15±0.12	100	/	/
DID F	12	30.33 ± 9.291	23.79 ± 3.225	8.33 ± 3.785	1.98±0.20	100	/	/
T 40-60 M	12	51 ± 11.532	25.91 ± 1.099	/	1.06±0.10	/	/	/
T 40-60 F	12	48 ± 7.81	26.02 ± 4.406	/	1.12±0.05	/	/	/
DNID M	12	59 ± 1	26.353 ± 1.38	15 ± 5	1.86±0.14	/	33.33	66.66
DNID F	12	53.33 ± 5.7	29.29 ± 3.2	10 ± 2	2.07±0.11	/	100	/

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type ou le pourcentage. M : masculin, F : féminin, IMC : indice de masse corporelle, poids/taille<sup>2</sup>, T : sujet témoin.

Les sujets masculins et féminins sont divisés en deux fourchettes d'âge :

1. 20 – 40 ans pour le diabète de type I
2. 40 – 60 ans pour le diabète de type II

Les témoins, sujets volontaires, sont choisis selon ces mêmes tranches d'âge, selon le même sexe et d'un poids et d'une taille proche de ceux des malades correspondants. (Tableau I).



## **II Enquête socioéconomique :**

Une enquête sur les conditions socioéconomiques des sujets est réalisée selon le questionnaire donné en annexe. Cette enquête concerne la situation familiale, le nombre d'enfants, l'habitat, l'activité physique, le nombre de sujets fumeurs, le niveau d'instruction, le salaire, les causes d'apparition du diabète, les antécédents familiaux et les complications associées au diabète.

## **III Prélèvements sanguins :**

Ils se font à jeun, au niveau de la veine du pli du coude, sur des tubes avec un anticoagulant (héparine ou EDTA). On prélève 4 ml de sang et on isole les lymphocytes le jour même du prélèvement

## **IV Analyse des paramètres immunologiques :**

### ***IV-1 Isolement des lymphocytes :***

Se fait grâce au ficoll, dont la densité est supérieure à celle des lymphocytes, ce qui permet à ces derniers de s'isoler en forme d'anneau. (Voir annexe). Après une centrifugation, il est facile de les récupérer à l'interface entre le plasma et le ficoll. Après l'élimination du plasma par aspiration douce, l'anneau qui contient les cellules sanguines mononucléaires est aspiré à son tour en évitant de prélever le ficoll. (fig. 7)

La grande recommandation est d'éviter de mélanger le sang au ficoll au début de la manipulation, afin d'avoir une séparation nette des deux phases.

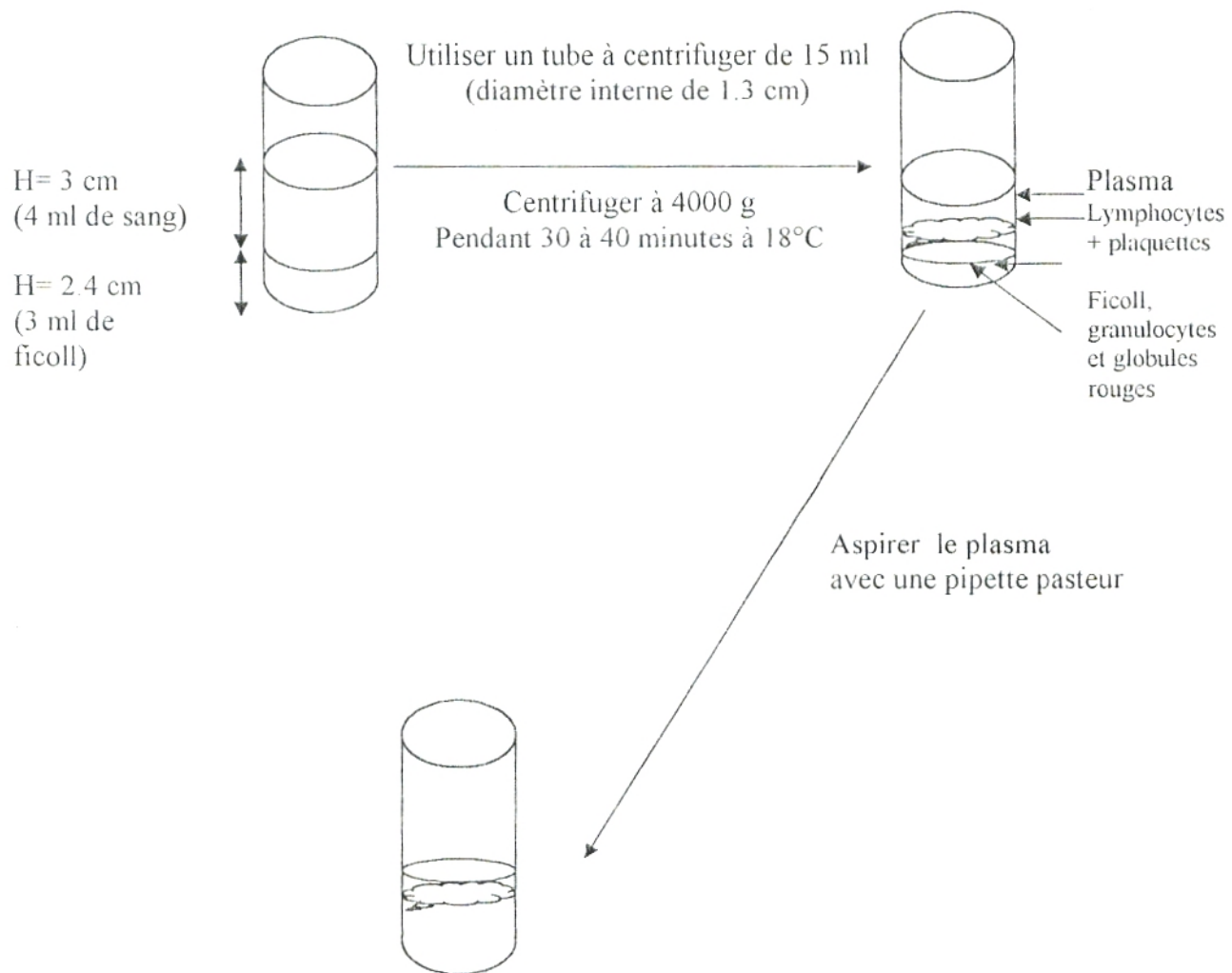


Fig. N°7 : Isolement des lymphocytes grâce au ficoll

Remarques :

1 – Il faut respecter les rapports en volume (ficoll/sang ;  $\frac{3}{4}$ , V/V) sinon on risque une contamination avec les globules rouges.

2 - Le plasma peut être utilisé pour des dosages.

Après cela, les lymphocytes sont lavés avec une solution saline pour éliminer les contaminants (plaquettes, plasma, ficoll,.....).

Pour le lavage, on procède de la façon suivante :

L'anneau contenant les lymphocytes est transféré dans un tube à centrifuger propre à l'aide d'une pipette pasteur. 6ml de solution saline équilibrée composée à son tour d'un mélange de deux solutions qui sont : la *solution A* :

D – glucose anhydre : 0.1% (concentration =1g/l)

CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O :  $5 \times 10^{-5}$  M (concentration =0.0074g/l)

MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O :  $9.8 \times 10^{-4}$  M (concentration =0.1992g/l)

KCl :  $5.4 \times 10^{-3}$  M (concentration =0.4026g/l)

Tris : 0.145 M (concentration =17.565g/l)

pH à 7.6

Et de la *solution B* : Na Cl : 0.14M (concentration =8.19g/l) (1 volume de solution A/ 9 volumes de solutions B) sont ajoutés.

Après mélange et centrifugation à 100g pendant 10 minutes à 18° C, le surnageant est enlevé. L'opération est recommencée deux fois, et les lymphocytes sont prêts à l'emploi.

Le culot lavé est repris dans 200µl de milieu de culture : RPMI (dont la composition est donnée en annexe). Ensuite 20µl de cellules sont prélevés et complétés à 1 ml avec du RPMI. Une goutte de bleu trypan (colorant permettant de distinguer les cellules vivantes) est ajoutée, la numération cellulaire est effectuée sur la chambre quadrillée de la cellule de Malassez. Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellule/ml et est ainsi préparée pour les différentes incubations.

#### **IV-2 Test de transformation lymphoblastique (TTL) :**

Cette étude porte sur les lymphocytes T dont l'agent mitogène spécifique est la concanavaline A. Les lymphocytes sont mis en culture dans un milieu approprié RPMI 1640 aux quelles sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), un acide aminé (L glutamine 2 mM) et les antibiotiques (Streptomycine 100µg/ml ; Pénicilline 100UI/ml) en présence de la concanavaline A (5µg/ml) et de l'insuline (5µg/ml).

Les cellules sont placées dans les plaques de culture 96 puits « Numc- ELISA » à fond plat. Les essais sont réalisés en triple. Les cellules sont incubées en présence d'acides gras poly insaturés (AGPI) de la série n-3 ; acide eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) à des concentrations finales de 15 et 30 µM afin d'évaluer leur effets sur la prolifération des Lymphocytes. Une solution mère d'EPA et de DHA à 10 mM dans l'éthanol absolu est préalablement préparée et est gardée à -20°C jusqu'à utilisation. A partir de cette solution mère, deux solutions à 300µM et 150µM sont utilisées pour les différentes incubations.

Les incubations sont réalisées de la façon suivante :

Dans chaque puit, 140 µl de suspension cellulaire ( $1,4 \times 10^5$  cellules/puit) sont déposés. Par la suite, différents réactifs sont ajoutés sous un volume de 20µl :

Puit 0 : suspension cellulaire + 60µl RPMI.

Puit 1 : suspension cellulaire + concanavaline A (concentration finale 5µM)+40 µl RPMI.

Puit 2 : suspension cellulaire + con A + insuline (concentration finale 5µM) + 20 µl RPMI

Puit 3 : suspension cellulaire + con A + DHA<sub>A</sub> (concentration finale 30µM)+ 20 µl RPMI

Puit 4 : suspension cellulaire + con A + DHA<sub>B</sub> (concentration finale 15µM)+ 20 µl RPMI

Puit 5 : suspension cellulaire + con A + EPA<sub>A</sub> (concentration finale 30µM)+ 20 µl RPMI

Puit 6 : suspension cellulaire + con A + EPA<sub>B</sub> (concentration finale 15µM) + 20 µl RPMI

Puit 7 : suspension cellulaire + con A + insuline + DHA<sub>A</sub> (concentration finale 30µM)

Puit 8 : suspension cellulaire + con A + insuline + DHA<sub>B</sub> (concentration finale 15µM)

Puit 9 : suspension cellulaire + con A + insuline + EPA<sub>A</sub> (concentration finale 30µM)

Puit 10 : suspension cellulaire + con A + insuline + EPA<sub>B</sub> (concentration finale 15µM)

Les puits sont complétés à 200µl (volume final) avec du milieu RPMI 1640, si nécessaire.

Les plaques sont mises à incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 48 heures. A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans des tubes secs.

La détermination de la prolifération se fait par comptage des cellules et dosage des protéines. Après centrifugation, les cellules servent à la détermination de la composition en acides gras des membranes des lymphocytes. Le surnageant sert au dosage de l'interleukine 2.

#### **IV-3 Dosage des protéines :**

Se fait selon la méthode de Lowry et coll. (1951) :

Après récolte et centrifugation des cellules, 50 µl de tampon de lyse (NaOH 0.5N) sont ajoutés au culot cellulaire. 20µl sont par la suite prélevés et serviront au dosage des protéines.

Pour la gamme étalon , l'albumine sérique bovine (SBA) utilisée comme standard, (sigma chemical company, Saint Louis, MO) est préparée à partir d'une solution mère de 1 mg/ml.

Le dosage est réalisé grâce au réactif A qui est constitué de :

- 0.05 g de SO<sub>4</sub>Cu anhydre
- 0.1 g de tartrate de potassium
- 10 g de carbonate de sodium
- 2 g de NaOH

Ces composants sont dissous dans 100 ml d'eau distillée.

L'ajout du réactif de Folin donne une coloration proportionnelle à la quantité en protéines présentes dans l'échantillon. La lecture est réalisée à 695 nm.

#### **IV-4 Détermination de la composition en acides gras des phospholipides membranaires :**

Une prise aliquote de lymphocytes initiaux ou stimulés sert à la détermination de la composition en acides gras des phospholipides membranaires. L'extraction des lipides se fait selon Bligh et Dyer (1959) ; grâce à un mélange méthanol/chloroforme/ NaCl 2M (1/1/0.9 ; V/V/V).

La séparation des phospholipides se fait par :

##### Chromatographie sur couche mince : (CCM)

L'extrait lipidique est déposé sur les plaques de gel de silice (G 60, Merck, Allemagne). La migration se fait grâce à un mélange d'hexane, d'éther diéthylique, et d'acide acétique (90/30/1.V/V/V).Après migration, la révélation se fait grâce aux vapeurs d'iode. Les phospholipides qui demeurent au niveau du dépôt, sont grattés et récupérés dans un tube en verre sovièrel.

La composition en acides gras des phospholipides est déterminée par :

##### La Chromatographie en phase gazeuse : (CPG)

Après addition d'une quantité connue de standard interne (acide héptadécanoïque : 17 : 0,  $C_{17}H_{34}O_2$  dilué dans du benzène à 2mg/ml), les acides gras sont saponifiés grâce à l'addition de NaOH méthanolique, puis sont méthylés par le Bromotrifluoromethanol (BF3). La séparation des différents acides gras est réalisée par la suite par chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire en pyrex de 39 m de longueur et 0.3 mm de diamètre interne, remplie avec du carbowax 20 M, Applied Sciences Labs, State College, PA).Le chromatographe est équipé d'un injecteur de type ROS et d'un détecteur à ionisation de flamme relié à un intégrateur - calculateur Enica 21 (Delsi instruments, France). L'identification des acides gras est réalisée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des standards d'acides gras (Elysiam, USA). La surface des pics d'acides gras est proportionnelle à leur quantité ; elle est calculée à l'aide d'un intégrateur.

#### **IV-5 Dosage des Interleukines 2 (IL2) :**

Il se fait selon le protocole du kit ELISA (Bender MedSystems) pour IL2

Le principe est illustré comme suit :

## **Analyse statistique :**

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard.

Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes est réalisée par le test « t » de Student entre les différents groupes de même sexe (malades DID ou DNID et leurs témoins respectifs), ou entre deux incubations différentes dans le même groupe.

Les moyennes sont considérées comme significativement différentes quand  $P < 0.05$ .

**RESULTATS ET  
INTERPRETATION**



## I – Evaluation des conditions socio-économiques de la population étudiée (tableau II) :

Les témoins âgés de 20 à 40 ans de la population étudiée, femmes et hommes confondus sont célibataires, alors que tous les hommes atteints de diabète de type I (DID) sont mariés. Concernant les femmes diabétiques insulino-dépendantes, 33.3% sont célibataires et 66.6% sont mariées.

Les témoins âgés entre 40 et 60 ans de la population étudiée sont mariés. Il en va de même pour les hommes mariés diabétiques non insulino-dépendants (diabète de type II ou DNID). Les femmes diabétiques non insulino-dépendantes (DNID) sont soit mariées (66.6%), soit divorcées (33.3%).

Le nombre d'enfants est de 2 à 4 pour 66.6% des hommes DID, et plus de 5 pour 33.3% d'entre eux. Chez les femmes DID, ces mêmes chiffres sont inversés.

Pour la population plus âgée, les patients DNID ont tous plus de 5 enfants quelque soit leurs sexes. Chez leurs témoins respectifs, 66.6% des hommes ont entre 2 et 4 enfants, et 33.3% en ont plus de 5. Chez les femmes témoins, 33.3% n'ont pas d'enfants ou 1 seul, 33.3% ont entre 2 et 4, et 33.3% ont plus de 5 enfants.

On remarque aussi que 100% des témoins âgés de 40 à 60 ans occupent des villas, et 66.6% des femmes DNID ainsi que 33.3% des hommes DID habitent des maisons collectives.

L'activité physique semble intense chez les femmes DID et quasi inexistante chez les hommes DNID.

Le niveau d'instruction est très bas chez les femmes DNID, moyen chez les femmes DID et les hommes DNID et relativement élevé chez les hommes DID.

Le niveau de vie est faible chez les hommes et les femmes DID ainsi que chez les hommes DNID à 33.3%, et moyen chez toutes les femmes DNID.

On note que 66.6% des hommes diabétiques et 100% des femmes diabétiques ignorent les causes d'apparition de leur pathologie.

66.6% des hommes et femmes DID et 33.3% des DNID ont des antécédents familiaux de la maladie.

Tableau II : Conditions socio-économiques de la population étudiée

	T 20-40 M	T 20-40 F	DID M	DID F	T 40-60 M	T 40-60 F	DNID M	DNID F
<b>Situation familiale (%)</b>								
• Célibataires	100	100	0	33.3	0	0	0	0
• Mariés	0	0	100	66.6	66.6	100	100	66.6
• Divorcés	0	0	0	0	33.3	0	0	33.3
<b>Nombre d'enfants (%)</b>								
• 0-1	0	0	0	0	0	33.3	0	0
• 2-4	0	0	66.6	33.3	66.6	33.3	0	0
* >5	0	0	33.3	66.6	33.3	33.3	100	100
<b>Habitat(%)</b>								
• villa	66.6	33.3	0	33.3	33.3	100	66.6	0
• appartement	33.3	66.6	66.6	66.6	66.6	0	33.3	33.3
• maison collective	0	0	33.3	0	0	0	0	66.6
<b>Activité (%)</b>								
• Intense	66.6	66.6	0	0	0	66.6	66.6	33.3
• Moyenne	33.3	0	66.6	33.3	33.3	0	33.3	33.3
• Faible	0	33.3	33.3	66.6	66.6	33.3	0	33.3
<b>Cigarette (fumeurs %)</b>	66.6	0	66.6	0	100	0	33.3	0
<b>Causes d'apparition du diabète</b>								
• Choc émotionnel	/	/	33.3	0	/	/	33.3	0
• Inconnues	/	/	66.6	100	/	/	66.6	100
<b>Antécédents familiaux</b>								
• DID	0	0	66.6	66.6	33.3	0	33.3	0
• DNID	0	0	0	0	0	33.3	33.3	33.3
<b>Niveau scolaire (%)</b>								
• Primaire	0	0	33.3	33.3	0	0	66.6	100
• Moyen	0	0	0	33.3	0	0	0	0
• Secondaire	0	0	0	33.3	33.3	33.3	0	0
• Universitaire	100	100	66.6	0	66.6	66.6	33.3	0
<b>Salaire (%)</b>								
• Faible	0	0	33.3	33.3	0	0	33.3	0
• Moyen	33.3	100	66.6	66.6	66.6	100	66.6	100
• Elevé	66.6	0	0	0	33.3	0	0	0
<b>Complications associées</b>								
• Ménopause	-	-	-	-	-	33.3	-	66.6
• HTA	0	0	0	6	0	0	33.3	33.3
• Cardio-vasculaires	0	0	0	6.6	0	0	0	0
• Rétinopathie	0	0	0	0	0	0	0	33.3
• Néphropathie	0	0	0	0	0	0	33.3	0

## 2-Effets des AGPI (n-3) sur la lymphoprolifération in vitro chez les patients diabétiques et chez les témoins :

### 2-1- Le nombre de cellules = indice de la lymphoprolifération.

#### 2-1-1 : Prolifération basale ou stimulée par la Con A, en présence ou en absence de l'insuline. (Figure 9)

Les lymphocytes des DID et des DNID augmentent de manière nette et significative en présence de Con A par rapport à l'incubation initiale (sans l'agent mitogène).

Un supplément d'insuline cependant potentialise l'effet de la Con A ou une augmentation de la prolifération est constatée.

✗ La différence entre les patients et leurs témoins respectifs reste significative. Ainsi, la prolifération des lymphocytes est significativement réduite chez les diabétiques comparés aux témoins, quelque soit les incubations, et quelque soit le type de diabète.

#### *Chez les diabétiques de type I :*

- a) Avant la stimulation par les agents mitogènes, la prolifération basale des lymphocytes faible avec une différence significative entre les DID et leurs témoins.
- b) Une fois incubés avec les agents mitogènes, Con A puis Con A + Insuline, la lymphoprolifération augmente de 6 fois pour la Con A seule chez les DID.
- c) Le nombre de cellules par puit augmente encore de 20% dès l'ajout de l'Insuline pour les DID. Malgré cela, les lymphocytes des témoins semblent plus sensibles aux agents mitogènes.

En effet, la lymphoprolifération augmente de 8 fois avec la Con A, et de 10 fois avec Con A + Insuline, chez les témoins.

#### *Chez les diabétiques de type II :*

- a) La prolifération des lymphocytes des témoins est plus importante que celle des DNID, quelque soit l'incubation.
- b) En présence de Con A, les lymphocytes des DNID sont stimulés significativement tout comme ceux des témoins. La Con A et l'insuline stimulent d'une façon plus importante la lymphoprolifération chez les DNID et chez les témoins.
- c) Dans ce cas, la différence entre témoins et DNID est significative et les témoins ont 2 fois plus de lymphocytes que les DNID.

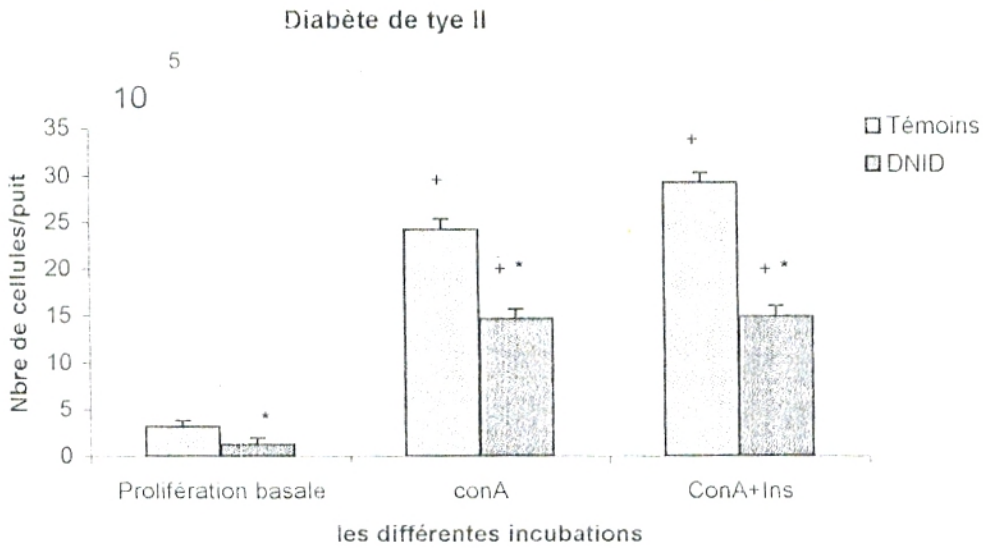
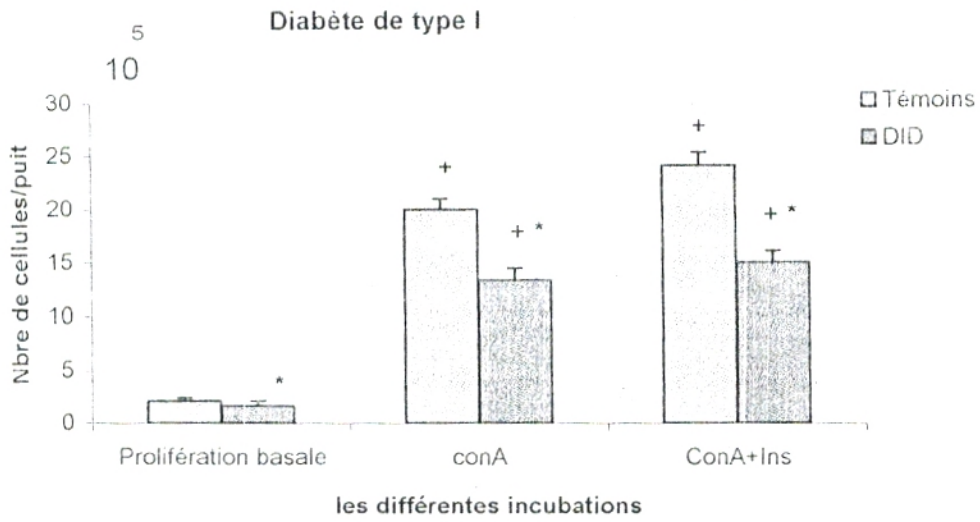


FIG 9: Prolifération basale ou stimulée par la concanavoline A (con A) en présence ou en absence d'insuline chez les patients diabétiques et chez les témoins

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \* $P < 0.05$  ; + $P < 0.05$  entre les différentes incubations.

**2- 1-2 : Effets des AGPI n-3 (EPA, DHA) sur la prolifération stimulée par la Con A des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins. (Figure 10)**

Le DHA et l'EPA provoquent une diminution significative de la lymphoprolifération chez les témoins et chez les diabétiques. L'effet immunosuppresseur est plus marqué chez les patients quelque soit leur type de diabète. De plus, la réponse à l'EPA et au DHA est dose dépendante.

En effet, l'effet immunosuppresseur des EPA et DHA à une concentration de 30 $\mu$ M est plus important qu'avec 15 $\mu$ M.

L'EPA semble plus efficace que le DHA quelque soit la population étudiée.

*Chez les diabétiques de type I :*

- a) Le DHA à 15 $\mu$ M diminue la prolifération des lymphocytes de manière très significative.
- b) Le DHA à 30 $\mu$ M a plus d'effet, et fait chuter la prolifération de manière plus nette.
- c) L'EPA à 30 $\mu$ M a un effet immunosuppresseur plus important qu'à 15 $\mu$ M. L'incubation en présence de l'EPA à 30 $\mu$ M est la plus efficace quant à la réduction des cellules lymphocytaires.

Dans tous les puits, la différence entre DID et témoin est significative.

*Chez les diabétiques de type II :*

- a) En se referant à l'incubation en présence de Con A, les AGPI ont un effet immunosuppresseur quelque soit leur concentration, avec un effet plus marqué à 30 $\mu$ M.
- b) L'EPA est encore plus efficace que le DHA chez les DNID ainsi que leurs témoins.
- c) L'EPA à 30 $\mu$ M semble être l'incubation la plus efficace.

Chez les DNID, la lymphoprolifération est significativement réduite comparée à celle des témoins.

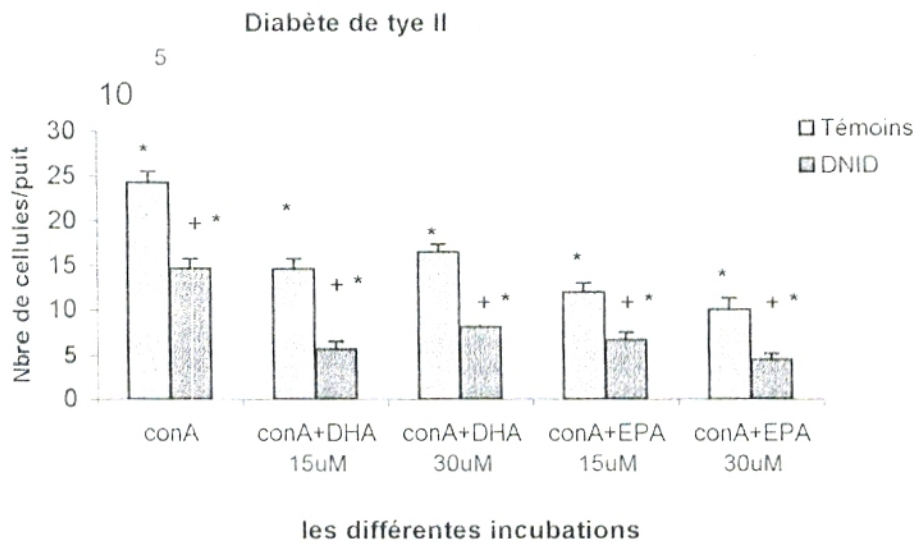
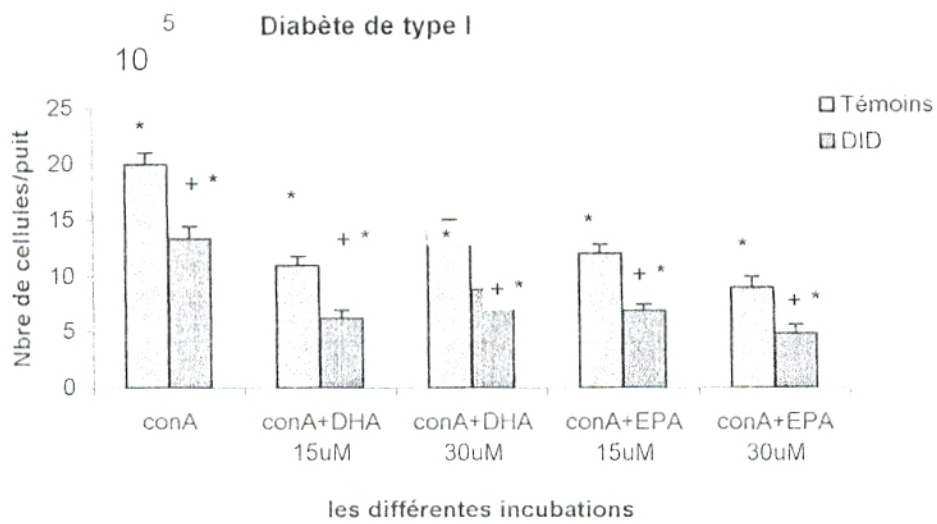


FIG 10: Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) sur la prolifération stimulée par la concanavaleine A (con A) des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \* $P < 0.05$  ; + $P < 0.05$  entre les différentes incubations.

**2- 1-3 : Effets des AGPI n-3 (DHA et EPA) sur la prolifération stimulée par la Con A des lymphocytes en présence de l'insuline chez les patients diabétiques et chez les témoins. (Figure 11)**

L'insuline n'altère pas l'action immunomodulatrice des AGPI.

En présence d'insuline, la lymphoprolifération est significativement faible chez les patients par rapport à leurs témoins quelque soit le type de diabète.

*Chez les diabétiques de type I :*

Comparé au puit contenant la Con A et l'Insuline, le puit contenant en plus du DHA à 15 $\mu$ M subit une réduction significative du nombre de lymphocytes. Ce nombre est encore faible en présence de DHA à 30 $\mu$ M.

L'EPA réduit encore plus la prolifération cellulaire, particulièrement chez les patients DID comparés à leurs témoins.

*Chez les diabétiques de type II :*

La présence du DHA à 15 $\mu$ M réduit la prolifération des lymphocytes des témoins à moitié (-50%), mais l'effet est moindre chez les DNID dont la réduction est d'un tiers (-33%).

Comme pour le DID, l'EPA à 30 $\mu$ M est l'AG à avoir réduit le plus le taux de lymphocytes dans le puit.

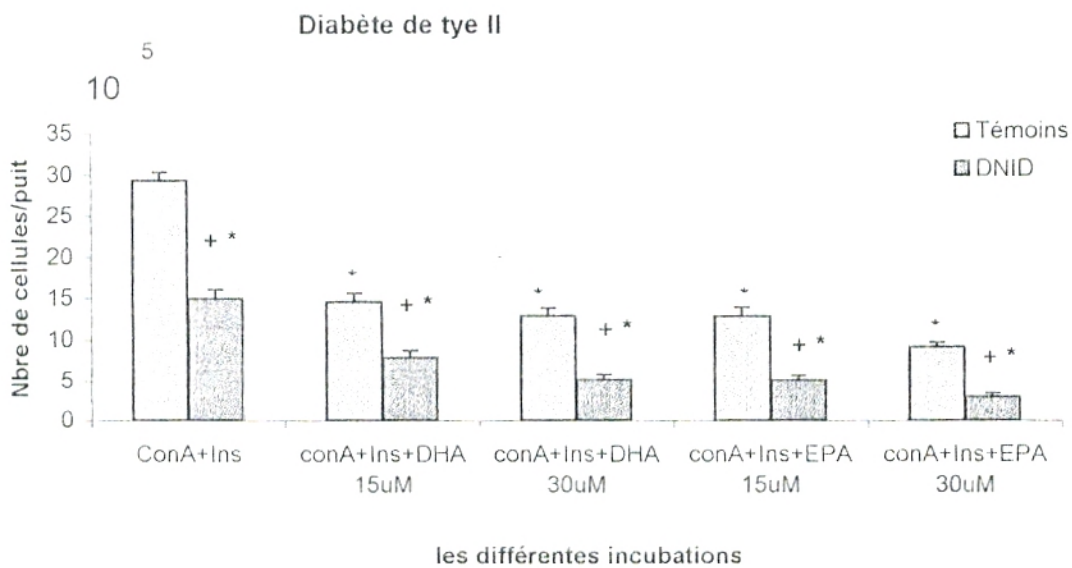
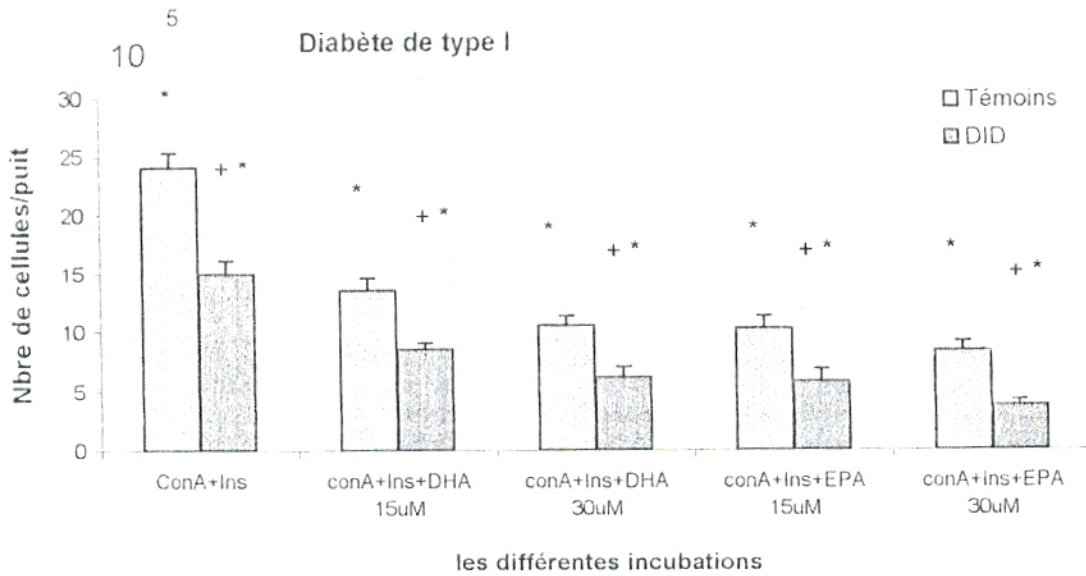


FIG 11: Effets des AGPI n-3 sur la prolifération stimulée par la concanavaleine A (con A) des lymphocytes en présence de l'insuline chez les patients diabétiques et chez les témoins

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \* $P < 0.05$  ; + $P < 0.05$  entre les différentes incubations.



## **2-2 Teneurs en protéines totales = deuxième indice de la lymphoprolifération :**

**2-2-1 : Teneur en protéines des lymphocytes après prolifération basale ou stimulée par la Con A en présence ou en absence de l'insuline chez les patients diabétiques et chez les témoins. (Figure 12)**

La prolifération des lymphocytes exprimée par le contenu des protéines des cellules ( $\mu\text{g}$  protéines/ $10^6$  cellules) suit le même profil que celle exprimée par le nombre de cellules.

*Chez les diabétiques de type I :*

Quelque soit l'incubation, les teneurs en protéines des lymphocytes sont significativement réduites chez les DID comparés aux témoins.

En présence de Con A, les teneurs en protéines sont doublées, chez les DID et leurs témoins marquant ainsi un effet stimulant.

L'insuline potentialise l'effet de la Con A aussi bien chez les diabétiques que chez les témoins.

*Chez les diabétiques de type II :*

Le contenu en protéines des lymphocytes isolés des patients DNID est significatif et faible par rapport à celui des lymphocytes des témoins.

La Con A augmente le taux de protéines chez les diabétiques et chez les témoins.

L'insuline potentialise l'effet de la Con A.

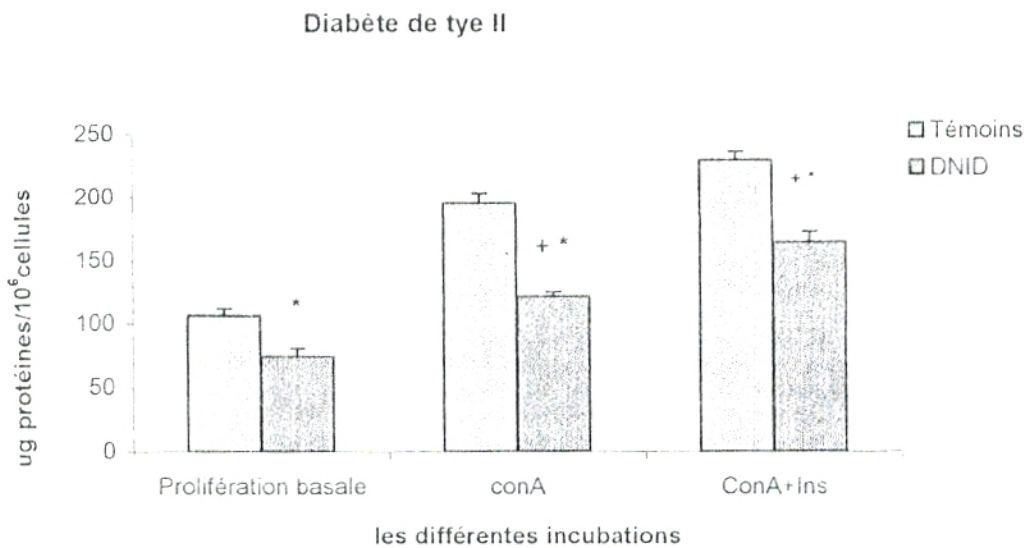
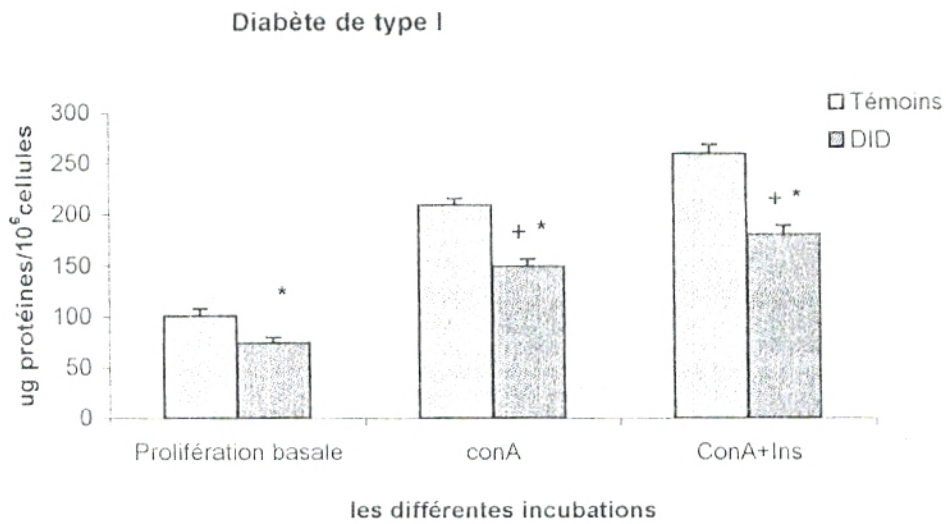


FIG 12: Teneurs en protéines des lymphocytes après prolifération basale ou stimulée par la concanavaline A (con A) en présence ou en absence d'insuline (Ins) chez les patients diabétiques et chez les témoins

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \* $P < 0.05$  ; + $P < 0.05$  entre les différentes incubations.

**2-2-2 : Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) sur les teneurs en protéines des lymphocytes en absence de l'insuline chez les patients diabétiques et chez les témoins. (Figure 13)**

Tout comme le premier indice de la lymphoprolifération (nombre de cellules), les deux AGPI EPA et DHA induisent une réduction des teneurs en protéines des lymphocytes. Cependant, la réduction est moins importante que celle observée pour le nombre de cellules.

Chez les deux types de diabète, la concentration à 30µM semble être la plus significative et la plus Immunosuppressive.

Les deux types de diabète semblent plus sensibles à l'EPA et surtout l'EPA à 30µM.

La différence entre tous les puits est significative dans les deux types de diabète.

La différence entre les diabétiques par rapport à leurs témoins est significative que le diabète soit le type I ou de type II. En effet, le contenu en protéines des lymphocytes est faible chez les diabétiques comparés aux témoins, quelque soit l'incubation.

**2-2-3 : Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) sur les teneurs en protéines des lymphocytes en présence de l'insuline chez les patients diabétiques et chez les témoins. (Figure 14)**

Une baisse significative du taux de protéines des lymphocytes est notée entre le premier puit et ceux contenant les AGPI à différentes concentrations.

Le DHA à 30 µM est plus actif que le DHA à 15µM où la baisse des protéines est plus prononcée avec 30µM et ceci pour les deux types de diabète, tout comme pour les témoins.

Les deux types de diabète semblent plus sensibles à l'EPA et surtout l'EPA à 30µM. La différence entre tous les puits est significative dans les deux types de diabète.

La différence entre les diabétiques par rapport à leurs témoins est significative que le diabète soit le type I ou de type II.

La présence de l'insuline n'affecte pas l'effet immunosupresseur des AGPI EPA et DHA.

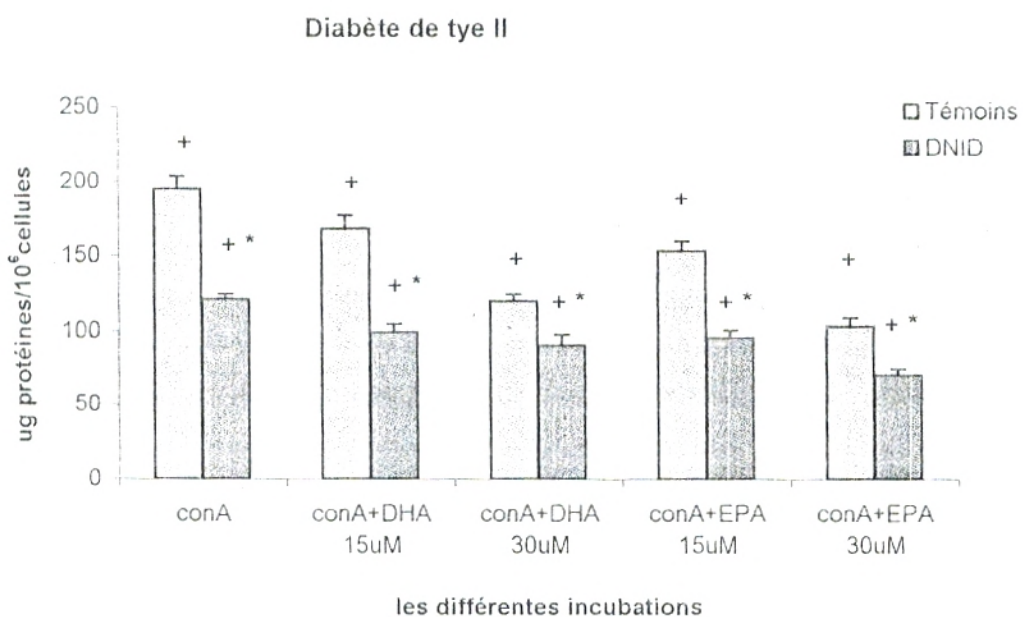
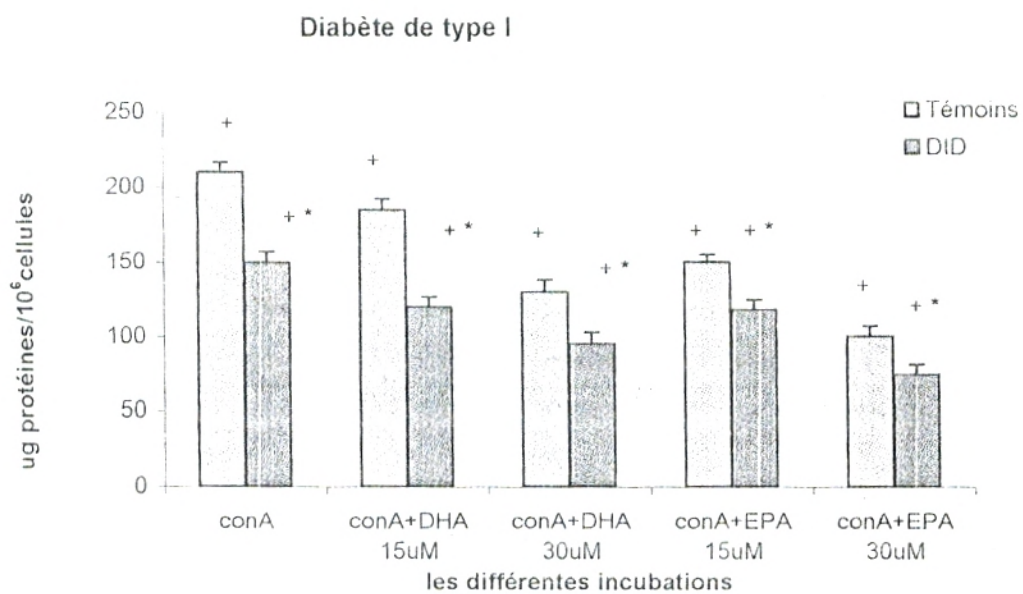


FIG 13: Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) à différentes concentrations sur les teneurs en protéines des lymphocytes après stimulation par la concanavaleine A (con A) chez les patients diabétiques et chez les témoins

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P < 0.05 ; +P < 0.05 entre les différentes incubations.

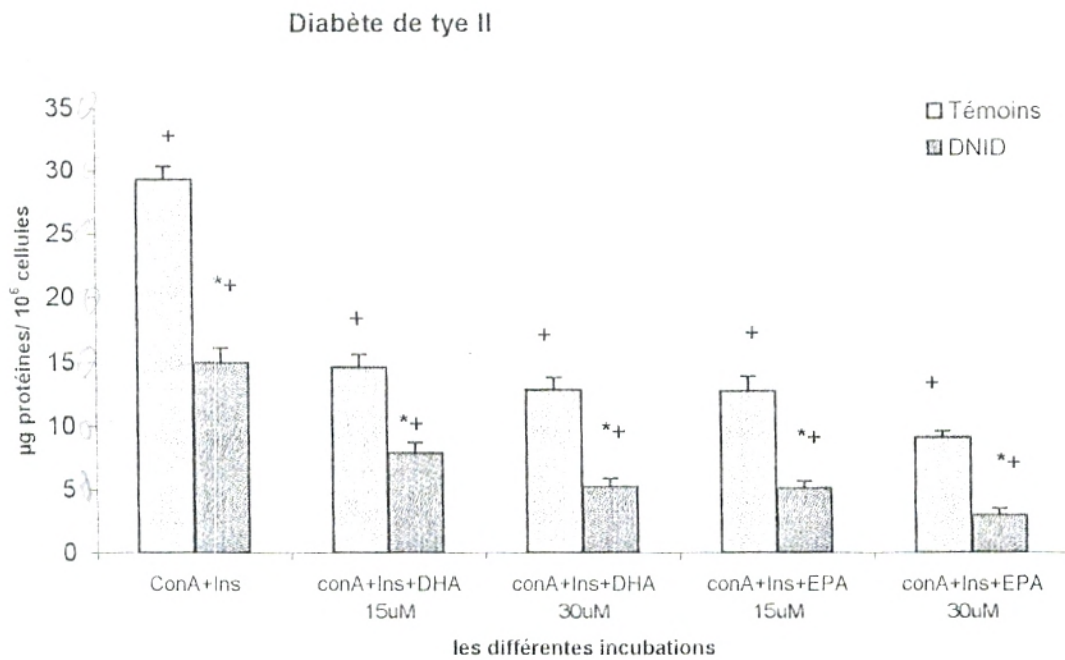
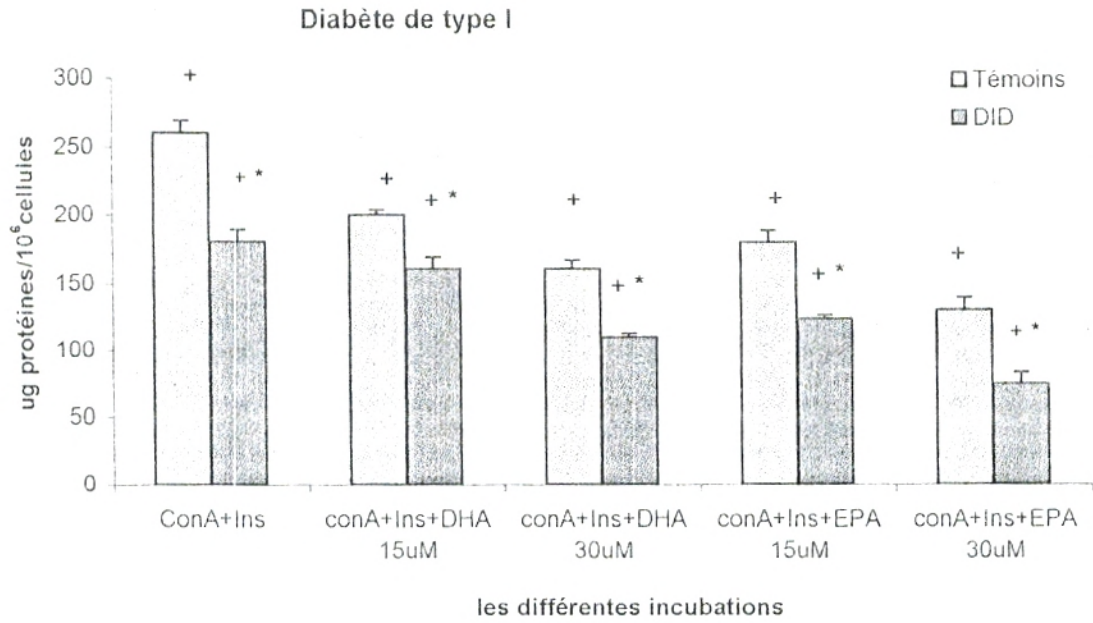


FIG 14: Effets des AGPI n-3 (EPA et DHA) à différentes concentrations en présence de l'insuline (Ins) sur les teneurs en protéines des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P< 0.05 ; +P<0.05 entre les différentes incubations.

### **3- Composition en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins :**

#### **3-1 : Composition initiale en acides gras des phospholipides des lymphocytes (pourcentages pondéraux), isolés des diabétiques et des témoins. (Figures 15 - 16)**

Les DID montrent une augmentation significative du pourcentage en C18 : 2 et une réduction significative du pourcentage en C20 : 4 comparés aux témoins. (Figure 16).

Les DNID montrent une élévation hautement significative du pourcentage en acides gras saturés (AGS) (notamment le C16 : 0) et une diminution du pourcentage en C20 : 4 comparés à leurs témoins. (Figures 15 et 16).

Les taux en C20 : 5 n-3 et C22 : 6 n-3 chez les diabétiques sont similaires à ceux des témoins, quelque soit le type de diabète. (Figure 17).

#### **3-2 : Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (pourcentages pondéraux), après stimulation par la con A. (Figures 15 - 16)**

L'incubation en présence de Con A entraîne une diminution des pourcentages en AGS (C16 : 0, C18 : 0), C18 : 2 et C20 : 4, et une augmentation du C18 : 1 par rapport à la composition basale, ceci chez tous les diabétiques et tous les témoins.

En présence de l'insuline dans le milieu d'incubation, la composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes ne diffère pas de celle des lymphocytes en présence de la Con A seule.

Les variations entre diabétiques et témoins restent parallèles à celles observées à l'état initial. En effet, une augmentation du pourcentage du C18 : 2 chez les DID et du pourcentage en AGS chez les DNID ainsi qu'une réduction en C20 : 4 chez les DID et les DNID sont notées comparées aux valeurs de leurs témoins respectifs.

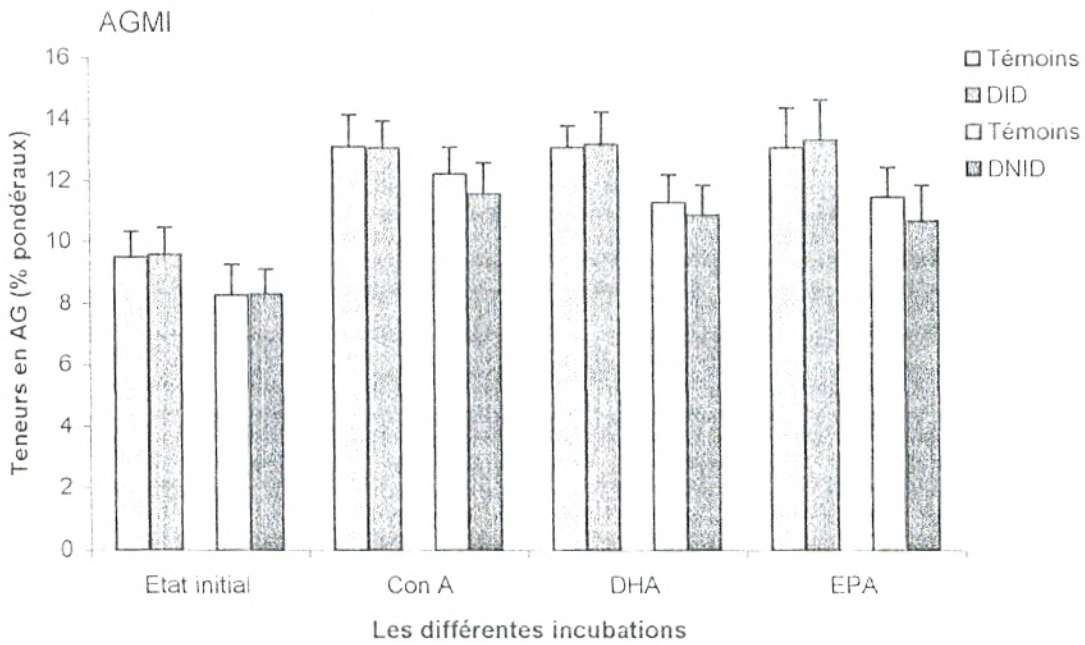
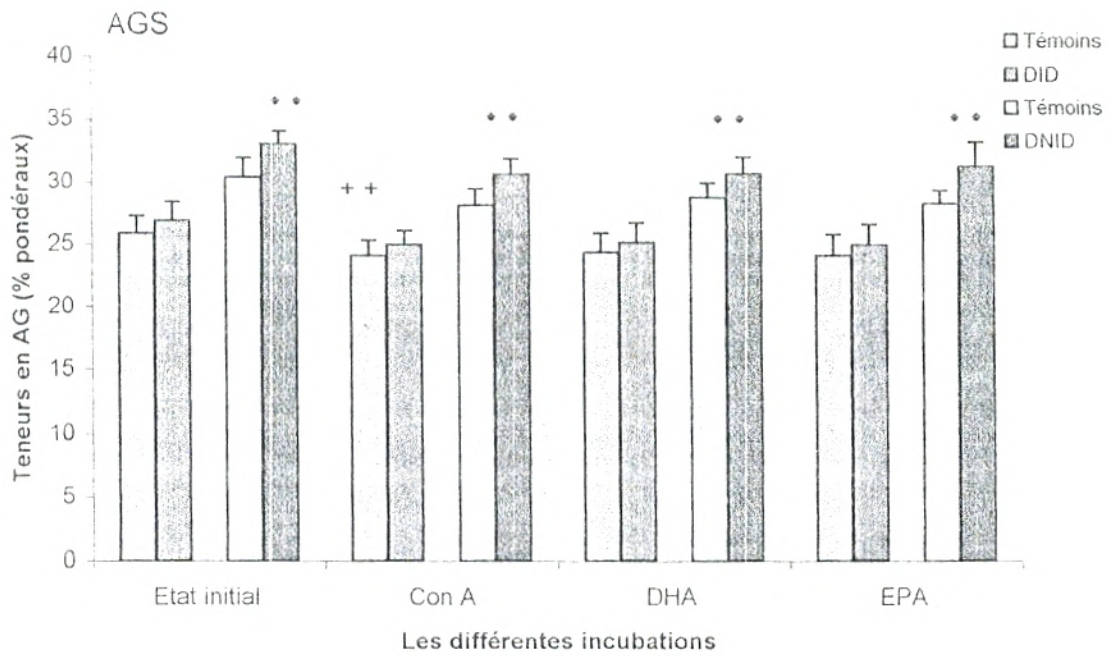


FIG. 15: Composition en Acides gras saturés (AGS: 16:0 et 18:0) et mono insaturés (AGMI 16:1 et 18:1) des phospholipides des membranes lymphocytaires à l'état initial, en présence de con A et des deux acides gras polyinsaturés (DHA et EPA). À 30 $\mu$ M

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P<0.05 ; +P<0.05 entre les différentes incubations.

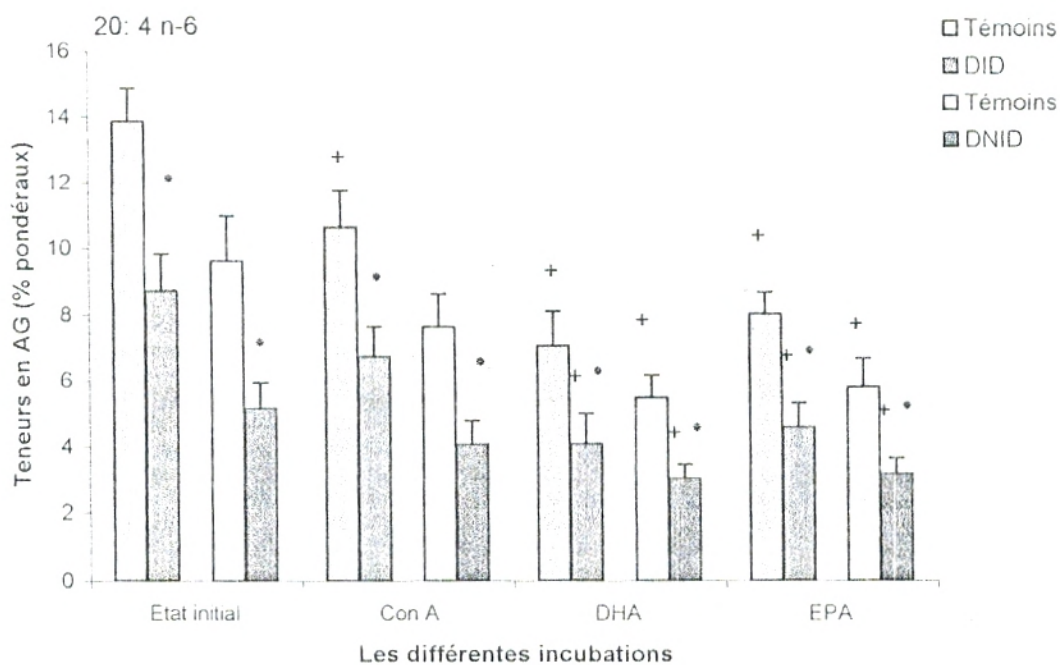
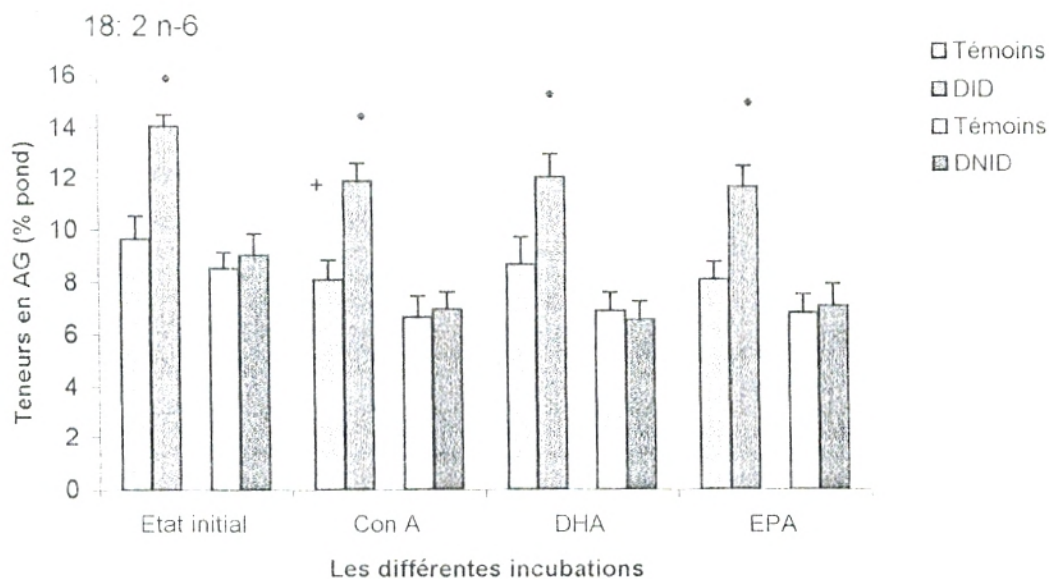


FIG. 16: Composition en acide linoléique 18: 2 (n-6) et en acide arachidonique ( 20: 4 n-6) des phospholipides des membranes lymphocytaires à l'etat initial, en présence de con A, et des deux saturés ( DHA et EPA à 30µM).

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student.\*P< 0.05 ; +P<0.05 entre les différentes incubations.



**3-3 : Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (pourcentages pondéraux), après incubation en présence de con A et EPA à 30µM. (Figures 15 - 17)**

Comme l'effet immunosuppresseur est plus marqué par une concentration de 30µM, seule cette concentration est donc utilisée pour déterminer la composition en AG. L'incubation en présence de l'EPA à 30µM entraîne une augmentation significative de la proportion en EPA (C20 : 5 n-3) et une diminution de celle en acide arachidonique (C20 : 4 n-6) par rapport à la composition en acides gras obtenue après incubation avec la Con A sans AGPI n-3, chez toutes les populations étudiées.

**3-4 : Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (pourcentages pondéraux), après incubation en présence de con A et de DHA à 30µM. (Figures 15 - 17)**

L'incubation en présence de con A et de DHA à 30µM entraîne une augmentation de la proportion en DHA (C22 : 6 n-3) et une réduction de celle en acide arachidonique (C20 : 4 n-6) par rapport à l'incubation en présence de la Con A seule. Cet effet est observé dans tous les groupes étudiés.

**4- Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes isolés des patients diabétiques et des sujets témoins. (IL-2, pg/ml). (Figures 18 - 19)**

Etant donné que l'effet immunosuppresseur des AGPI n-3 est mieux marqué à une concentration finale de 30µM, seule cette concentration est donc utilisée pour déterminer la production d'IL-2 par les lymphocytes.

Avant la stimulation par les agents mitogènes, la production des IL-2 est faible (entre 300 et 800 pg/ml) chez tous les groupes étudiés. Aucune différence significative entre les DID et leurs témoins, ni entre les DNID et leurs témoins, n'est notée. (Figure 18).

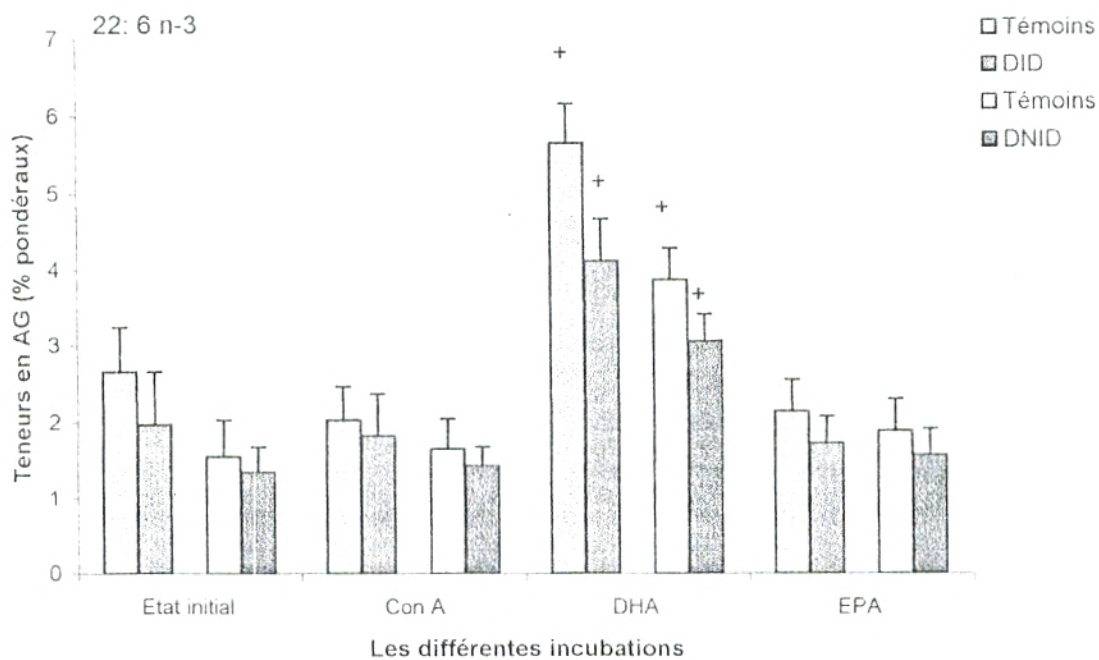
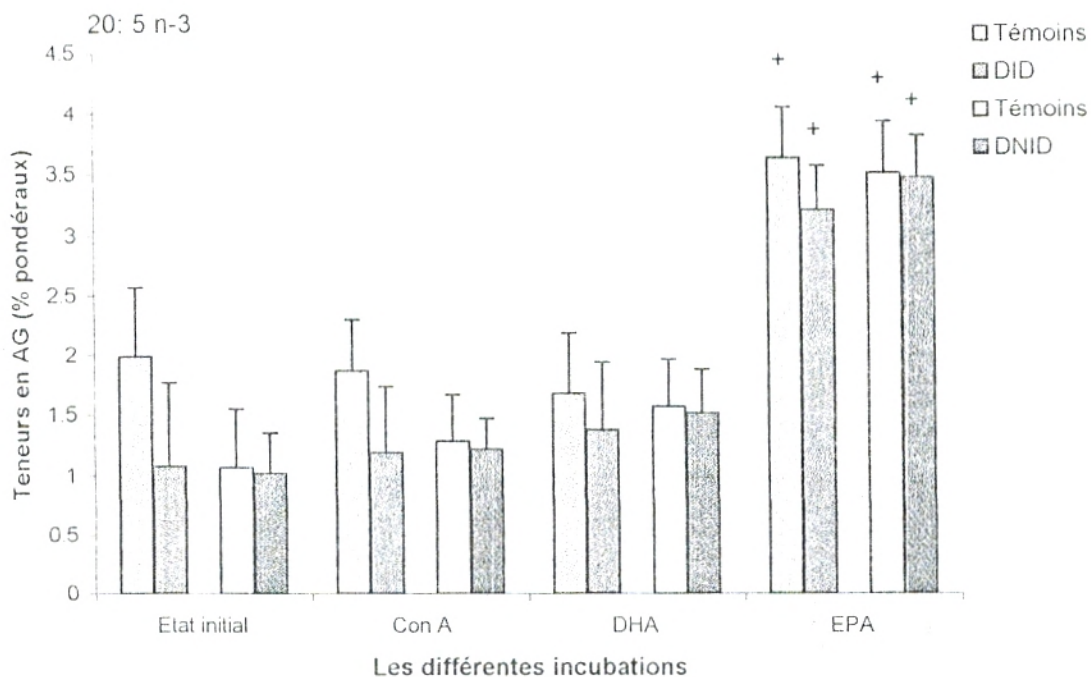


FIG. 17: Composition en DHA (20: 5 n-3) et en EPA (22: 6 n-3) des phospholipides des membranes lymphocytaires à l'état initial, en présence de con A, et des deux acides gras polyinsaturés (DHA et EPA à 30 $\mu$ M).

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P < 0.05 ; +P < 0.05 entre les différentes incubations.

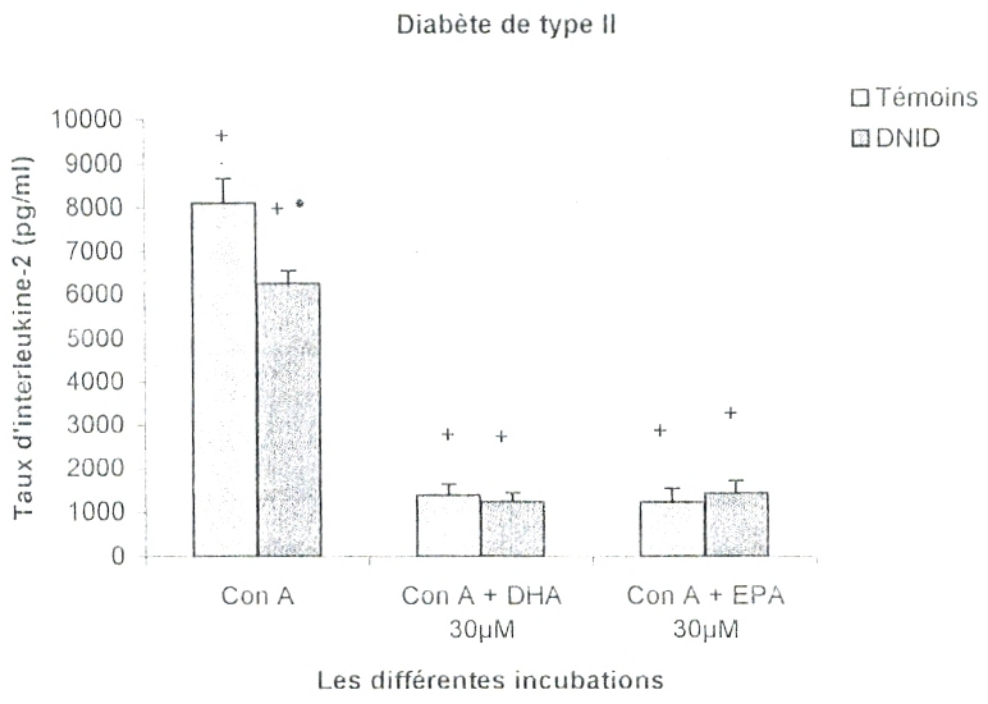
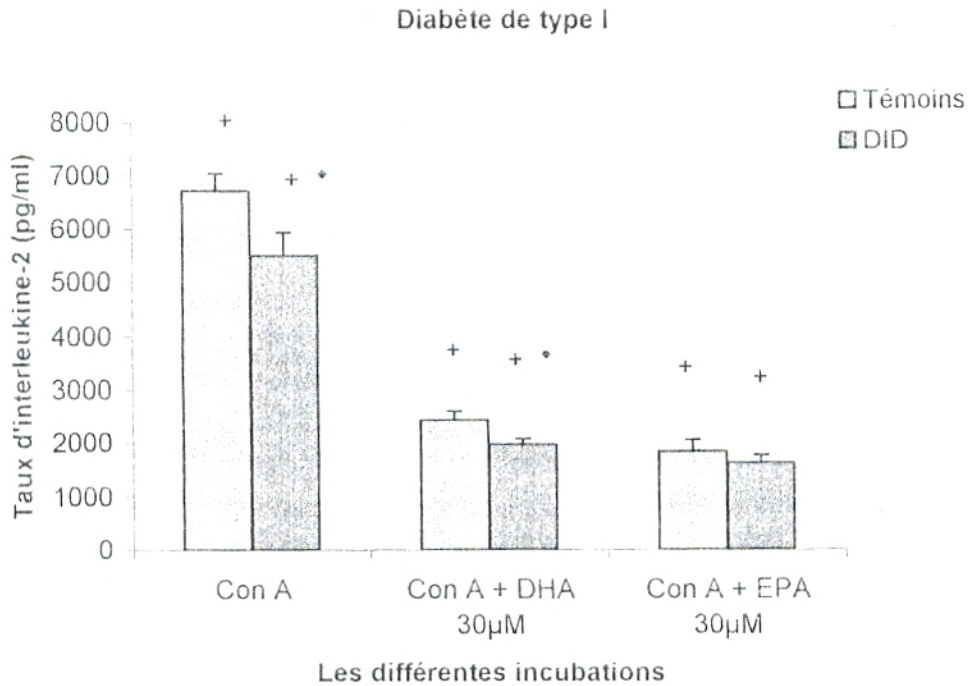


FIG. 19: Taux d'interleukine-2 (IL-2) en pg/ml en présence des AGPI produite par les lymphocytes des patients diabétiques et des sujets témoins, en présence d'AGPI

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P < 0.05 ; +P < 0.05 entre les différentes incubations.

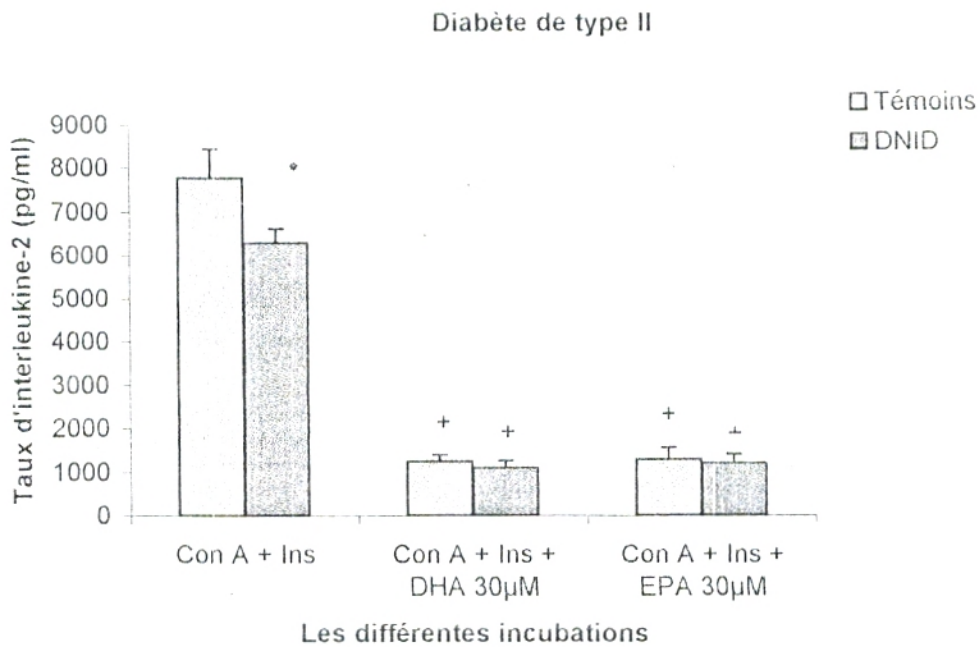
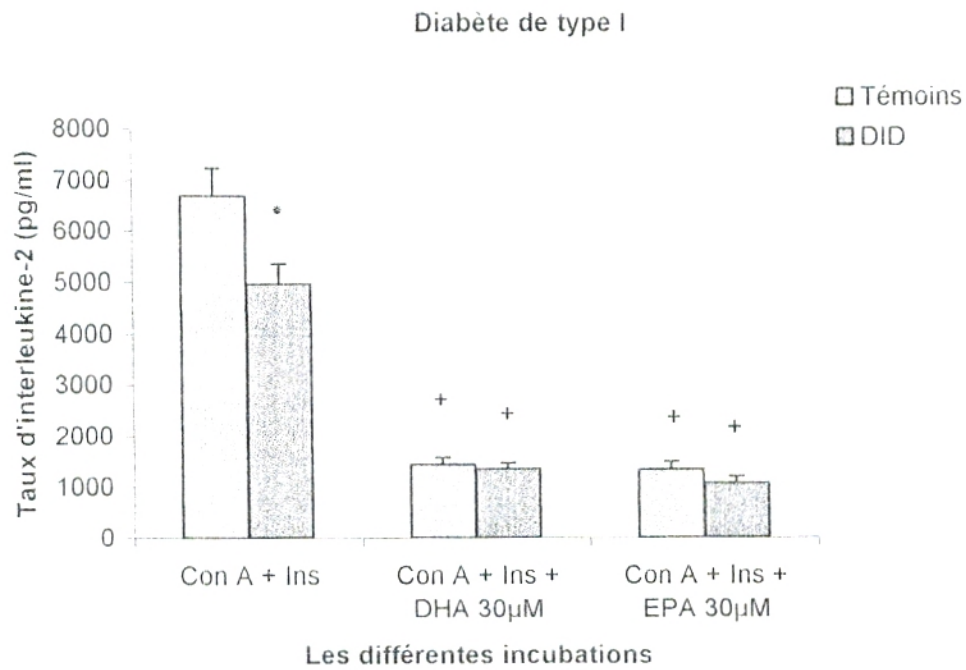


FIG. 20 : Taux d'interleukine-2 (IL-2) en pg/ml et de l'insuline produite par les lymphocytes des patients diabétiques et des sujets témoins, en présence d'AGPI

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P < 0.05 ; +P < 0.05 entre les différentes incubations.

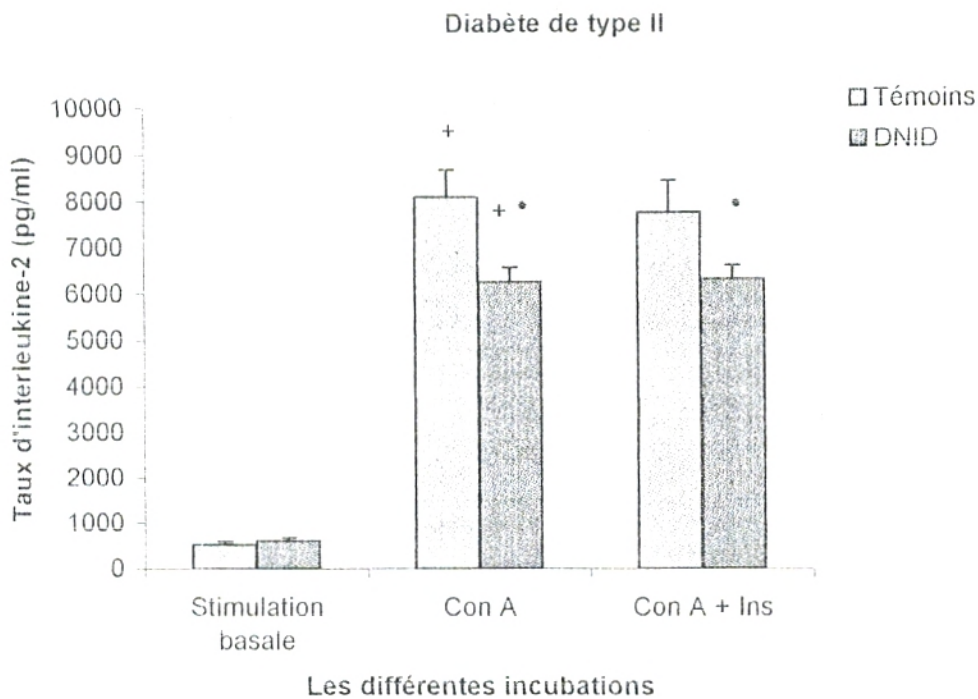
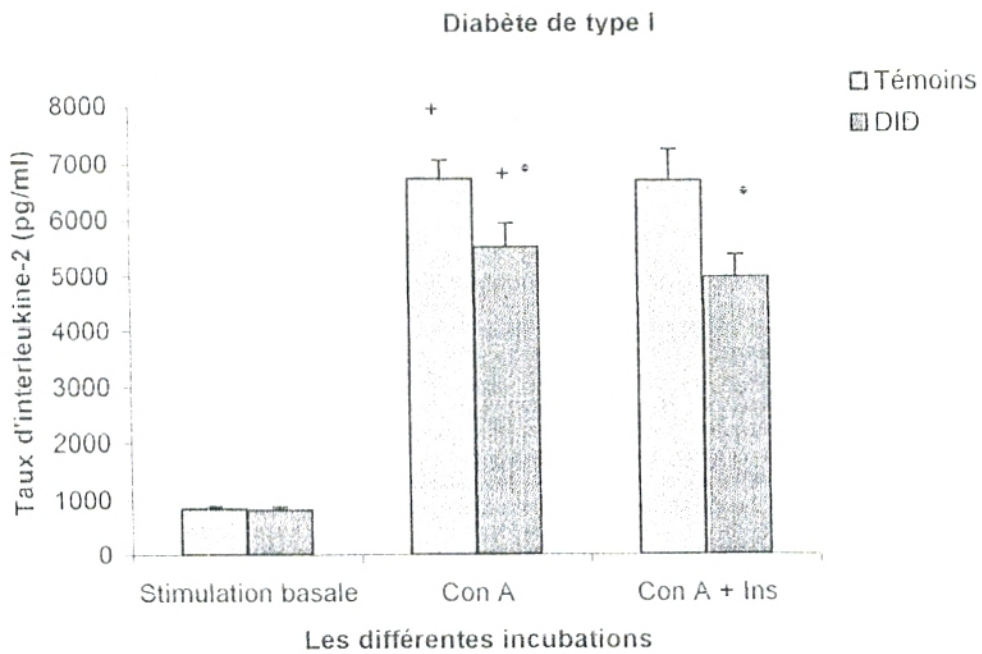


FIG. 18: Taux d'interleukine-2 (IL-2) en pg/ml produite en stimulation basale, en présence de con A et après ajout d'insuline.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \* $P < 0.05$  ; + $P < 0.05$  entre les différentes incubations.

La Con A induit une stimulation de la production de l'IL-2 par les lymphocytes dans tous les groupes étudiés (entre 10 et 20 fois plus). (Figure 18).

Cependant une diminution de la production d'IL-2 en présence de Con A est notée chez les DID comparés à leurs témoins. Les mêmes résultats sont observés chez les DNID comparés à leurs témoins.

L'insuline dans le milieu d'incubation n'a pas d'effet car la production d'interleukines-2 est similaire à celle en présence de Con A seule.

En présence d'insuline et de Con A, une diminution significative des IL-2 est notée chez les deux types de diabétiques par rapport à leurs témoins respectifs.

L'addition du DHA et de l'EPA à 30 $\mu$ M induit une baisse significative du taux des IL-2 chez les diabétiques, quelque soit le type de diabète. La même évaluation est notée chez les témoins. (Figure 19).

La production d'IL-2 par les lymphocytes des DID en présence de Con A et de DHA 30 $\mu$ M est significative est réduite comparée à celle des témoins. Toutes les autres variations sont non significatives.

L'ajout du DHA et de l'EPA à 30 $\mu$ M en présence de Con A et d'insuline induit également une baisse significative du taux des IL-2, et de manière encore plus prononcée que quand ces deux acides gras ont été incubés en absence d'insuline. Cet effet est observé chez les témoins et chez les DID et les DNID. (Figure 20).

### **3- Composition en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins :**

#### **3-1 : Composition initiale en acides gras des phospholipides des lymphocytes (pourcentages pondéraux), isolés des diabétiques et des témoins. (Figures 15 - 16)**

Les DID montrent une augmentation significative du pourcentage en C18 : 2 et une réduction significative du pourcentage en C20 : 4 comparés aux témoins. (Figure 16).

Les DNID montrent une élévation hautement significative du pourcentage en acides gras saturés (AGS) (notamment le C16 : 0) et une diminution du pourcentage en C20 : 4 comparés à leurs témoins. (Figures 15 et 16).

Les taux en C20 : 5 n-3 et C22 : 6 n-3 chez les diabétiques sont similaires à ceux des témoins, quelque soit le type de diabète. (Figure 17).

#### **3-2 : Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (pourcentages pondéraux), après stimulation par la con A. (Figures 15 - 16)**

L'incubation en présence de Con A entraîne une diminution des pourcentages en AGS (C16 : 0, C18 : 0), C18 : 2 et C20 : 4, et une augmentation du C18 : 1 par rapport à la composition basale, ceci chez tous les diabétiques et tous les témoins.

En présence de l'insuline dans le milieu d'incubation, la composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes ne diffère pas de celle des lymphocytes en présence de la Con A seule.

Les variations entre diabétiques et témoins restent parallèles à celles observées à l'état initial. En effet, une augmentation du pourcentage du C18 : 2 chez les DID et du pourcentage en AGS chez les DNID ainsi qu'une réduction en C20 : 4 chez les DID et les DNID sont notées comparées aux valeurs de leurs témoins respectifs.

La Con A induit une stimulation de la production de l'IL-2 par les lymphocytes dans tous les groupes étudiés (entre 10 et 20 fois plus). (Figure 18).

Cependant une diminution de la production d'IL-2 en présence de Con A est notée chez les DID comparés à leurs témoins. Les mêmes résultats sont observés chez les DNID comparés à leurs témoins.

L'insuline dans le milieu d'incubation n'a pas d'effet car la production d'interleukines-2 est similaire à celle en présence de Con A seule.

En présence d'insuline et de Con A, une diminution significative des IL-2 est notée chez les deux types de diabétiques par rapport à leurs témoins respectifs.

L'addition du DHA et de l'EPA à 30 $\mu$ M induit une baisse significative du taux des IL-2 chez les diabétiques, quelque soit le type de diabète. La même évaluation est notée chez les témoins. (Figure 19).

La production d'IL-2 par les lymphocytes des DID en présence de Con A et de DHA 30 $\mu$ M est significative est réduite comparée à celle des témoins. Toutes les autres variations sont non significatives.

L'ajout du DHA et de l'EPA à 30 $\mu$ M en présence de Con A et d'insuline induit également une baisse significative du taux des IL-2, et de manière encore plus prononcée que quand ces deux acides gras ont été incubés en absence d'insuline. Cet effet est observé chez les témoins et chez les DID et les DNID. (Figure 20).



# DISCUSSION

Les effets des AGPI n-3 sur les fonctions des lymphocytes après stimulation mitogénique ont été conséquents chez les humains et chez les animaux, démontrant une suppression lymphocytaire. (Calder, 1996).

Il a été démontré sur des études animales que les AGE ont un effet variable sur différents aspects de la réaction immune. Les études humaines donnent aussi des résultats différents.

Des études sur les MAI humaines ont été sujettes à différents facteurs comme les variations génétiques et les habitudes alimentaires, les infections et autres influences environnementales. (Harbrige, 1998).

Il est actuellement bien démontré que les conditions de culture cellulaire ont une influence significative dans le changement de la composition en AG des lymphocytes dépendants des lipides alimentaires et peuvent par la suite influencer les résultats des tests fonctionnels. (Yaqoob et coll., 1995).

L'utilisation des AG exogènes poly insaturés de la famille n-3 a des effets suppressifs et peut en l'occurrence affecter un grand nombre de paramètres immuns, tels que la prolifération des lymphocytes, la synthèse des cytokines, l'activité des cellules NK, la phagocytose.....etc. L'immuno modulation induite peut être appliquée dans l'amélioration des désordres inflammatoires, comme les maladies auto immunes, pourtant, les mécanismes participants à ces processus ne sont pas encore bien compris. Il est probable que la modulation du système immunitaire par les acides gras du régime n-3 peut avoir lieu par l'altération de la fluidité membranaire, la formation de peroxyde lipidique, la production des eicosanoïdes ou la régulation de l'expression génique. (Pablo et coll., 2000)

Quelques études ont démontré que les AGPI n-3 peuvent moduler les marqueurs membranaires des lymphocytes T. (Calder, 1999 ; Sasaki et coll., 1999).

Néanmoins, les connaissances sur la modulation du second messager qui est impliqué dans l'immunosuppression durant le diabète et l'HTA sont encore faibles. (Triboulot et coll., 2001).

Les A.G. agissent aussi sur les médiateurs inter et intracellulaires. Les A.G.PI n-6 ont des effets à la fois suppressifs et stimulants. Le plus étudié est l'acide arachidonique qui peut être oxydé en eicosanoïdes, comme les prostaglandines, leukotriènes et thromboxane qui sont tous des médiateurs potentiels d'inflammation. Néanmoins, beaucoup des effets des AGPI sur les réponses immunitaires et inflammations ne dépendent pas de la génération des eicosanoïdes. Les A.G. modulent aussi les migrations des leucocytes et ils interviennent dans la présentation de l'antigène aux macrophages. L'importance des A.G. sur la fonction immunitaire a également été corroborée par plusieurs essais cliniques qui démontrent une nette amélioration chez les patients soumis aux A.G. (Pompia et coll., 2000).

La non habilité à distinguer les réponses prolifératives des lymphocytes des diabétiques aux auto- antigènes individuels des îlots d'un début de DID par rapport aux lymphocytes des témoins, suggère que la prolifération représente une figure incomplète de la réaction immune et résulte d'une variabilité conflictuelle. (Roep et coll., 1999).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la modulation par les acides gras de la réponse immunitaire comme la régulation de la transcription génique, l'acylation protéique, la libération du calcium, les changements dans la fluidité membranaire.....ect. (Pompia, et coll., 2000).

L'infection est une complication importante chez les patients diabétiques. (Coopan, 1985 ; Puxty, 1984).

Les anomalies du système immunitaire ont été considérées comme le facteur majeur contribuant aux infections des patients diabétiques. (Puxty, 1984).

Vu ces différentes données bibliographiques, notre étude est réalisée sur les lymphocytes de sujets témoins et de patients diabétiques cultivés *in vitro* en présence ou non d'AGPI n-3 afin de déterminer les anomalies de la fonction lymphocytaire au cours du diabète, et les effets des AGPI sur cette fonction lymphocytaire. Dans ce travail, la prolifération des lymphocytes *in vitro* est déterminée par comptage des cellules et par dosage des protéines totales.

Nos résultats montrent clairement que la prolifération des lymphocytes à l'état basal ou stimulée par l'agent mitogène (Con A) est significativement plus faible chez les diabétiques comparés aux témoins quelque soit le type de diabète.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui montrent que les patients avec DID ou DNID ont une réponse proliférative via les agents mitogènes. (Chang et coll., 1995 ; Delespesse et coll., 1974 ; Otton et coll., 2002 ; Plouffe et coll., 1978).

Les effets des AGPI n-3 ont été énormément étudiés sur les cellules mononucléaires de la périphérie chez l'homme. De plus, la capacité de ces dernières à produire des cytokines particulièrement l'IL-1, l'IL-2 et l'IL-6 sont réduites de manière très significative par les AGPI n-3. (Calder, 1996).

En effet, nos résultats montrent que la production d'IL-2 par les lymphocytes stimulés est faible chez les diabétiques de type I et de type II.

De plus, les AGPI (EPA, DHA) réduisent les taux d'IL-2 des lymphocytes chez les témoins et chez les diabétiques.

La plupart des études ont indiqué que la prolifération des cellules T était initiée exclusivement par la production des IL-2 et par conséquent l'expression de son récepteur membranaire (IL-2R). (Cantrell et coll., 1984 ; Smith, 1988). Un déficit dans la production des IL-2 ou dans l'expression de leur récepteur membranaire peut aboutir à une réponse proliférative basse.

Une diminution de la production des IL-2 de cellules mononucléaires stimulées par des mitogènes a déjà été reportée chez des patients DID. (Giordano et coll., 1989 ; Shah et coll., 1991 ; Zier et coll., 1984).

Cependant, les résultats chez les patients avec DNID ne sont pas aussi évidents. Chang et coll.(1995) montrent que la production d'IL-2 par les lymphocytes stimulés des DNID est normale mais que le nombre de récepteurs IL-2 des membranes des lymphocytes T est réduit comparé à celui des témoins.

Ainsi, la réduction de la prolifération in vitro des lymphocytes T chez les diabétiques peut être liée à la diminution de la production ou de l'action de l'IL-2.

La réduction de la prolifération in vitro des lymphocytes stimulés par la con A chez les diabétiques peut être le résultat de la présence in vivo de lymphocytes déjà activés.

Il est bien connu que la con A agit sur des lymphocytes au repos non activés. Dans ce cas, les lymphocytes déjà activés chez les diabétiques répondent peu à l'effet de la con A et leur prolifération in vitro est faible comparée à celle des lymphocytes des sujets témoins.

En effet, plusieurs auteurs notent un pourcentage élevé de T lymphocytes activés chez les diabétiques. (Hoffman et coll., 2001 ; Peterson et coll., 1999)

De plus, nos résultats montrent que les AGPI n-3 réduisent la lympho-prolifération aussi bien chez les témoins que chez les diabétiques. Plusieurs études montrent l'effet Immunosuppresseur des AGPI n-3 (Calder, 1996 ; Harbige ,1998 ; Jolly et coll., 1997).

La consommation des AGPI n-3 diminue la production des IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$  par les macrophages. (Yaqoob et Calder, 1995).

Chez l'homme, cette consommation diminue la capacité des monocytes de la périphérie à produire le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . (Endres et coll., 1993 ; Meydani et coll., 1991).

Les AGPI n-3 diminuent la production des immunoglobuline A (IgA) (Manhart et coll., 2000). Les AGPI n-3 réduisent aussi la production d'IL-2 par les lymphocytes. (Jolly et coll., 1997).

Il a été démontré que le DHA, EPA et l'acide gamma linoléique (GLA) réduisent significativement l'activité cytotoxique (cellule NK et libération des lymphokines) sans pour autant toucher à la viabilité de la cellule. L'EPA et le DHA ont exhibé une plus grande suppression que le GLA. (Jolly et coll., 1997 ; Pusarie et coll., 1997).

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans l'initiation, la régulation et les fonctions effectrices du système immunitaire. Des changements dans la composition membranaire peuvent altérer sa fluidité, la distribution des récepteurs et par conséquent la fonction des cellules. Les altérations des réponses immunes dans l'état du diabète peuvent être attribuées en partie à l'induction de ce dernier dans les altérations du métabolisme des AGE. Chez le rat diabétique, il a été trouvé des niveaux bas de C18 : 2n-6 dans les phospholipides membranaires des cellules T. (Singh et coll. ; 1988) Le niveau du C20 : 4n-6 était altéré comme résultat du diabète. (Tabbey et Buttke, 1993).

Ces AG sont les précurseurs des prostaglandines qui sont connues pour leur influence sur les réponses immunes. (Singh et coll., 1988).

Nos résultats montrent que le diabète sucré est associé à des altérations de la composition en AG des phospholipides des lymphocytes. De plus, les AGPI n-3 entraînent aussi des modifications de la composition en AG des phospholipides lymphocytaires, aussi bien chez les témoins que chez les diabétiques de type I et de type II.

Une diminution du 20 : 4n-6 associée à une augmentation significative du 18 : 2n-6 sont notées chez les DID comparés aux témoins. Ces modifications peuvent être liées à la réduction de l'activité  $\Delta 6$  désaturase au cours du diabète.

L'incubation des lymphocytes avec EPA et DHA résulte en une substitution de ces AGPI n-3 avec l'AA des phospholipides des lymphocytes aussi bien chez les témoins que chez les diabétiques. Comme l'AA est important lors de l'activation des lymphocytes (Resch et coll., 1972). Sa substitution par EPA et DHA peut être à l'origine de l'effet immunosuppresseur de ces AGPI n-3.

De plus, le DHA et l'EPA, tout comme la combinaison de ces deux la, inhibent l'activité de la PKC, à faibles concentrations comme  $10^{-1}\mu\text{M}$  et par contre, l'acide arachidonique est sans effet sur l'activité de la PKC. (Pusarie et coll., 1997). En plus, la PKC représente un site potentiel de l'action des AGPI n-3 dans leurs effets sur les traitements des désordres bipolaires. (Seung Kim, 2001).

Notre étude montre que les AGPI n-3 déploient des actions d'immuno-modulation différentes, et que l'EPA a un effet plus fort que le DHA et qu'une concentration basse d'EPA est suffisante pour influencer la réponse immunitaire. Il a été démontré que les effets immuno- modulateurs de l'huile de poisson peuvent être principalement dus à l'EPA. (Peterson et coll., 1998).

Ceci va dans le même sens que nos résultats, puisque des deux acides gras employés (EPA et DHA), l'EPA est le plus immunosuppressif.

La composition en AG des fractions phospholipidiques des lymphocytes de la rate à été altérée par la manipulation des lipides ; cependant, la composition des lymphocytes thymiques n'a pas été modifiée significativement. (Yaqoob et coll., 1995).

En général, les changements dans la composition en AG des lymphocytes de la rate sont démontrés par la manipulation des lipides alimentaires. (Yaqoob et Calder, 1995)

Et malgré un changement considérable, cette manipulation est sans effet sur la fluidité membranaire des cellules. (Yaqoob et coll., 1995).

Ceci suggère que les AGPI inhibent les réponses immunes en interférant tôt dans les étapes des réponses par anticorps, surtout en ce qui concerne la production des IL-2 par les cellules T helper. (Yang et coll., 1989).

Un nombre d'études suggère une relation inverse entre l'inflammation et la fonction des cellules T. (Grimble, 2001).

La suppression des auto- anticorps, de la lymphoprolifération, de l'apoptose, des lymphocytes auto- réactifs, et la réduction des cytokines pro- inflammatoires par de

grandes doses d'huile de poisson sont tous des mécanismes par lesquels les AGPI n-3 améliorent les MAI. (Harbrige, 1998).

Il a été démontré qu'une consommation modérée d'huile de poisson n'est pas immuno-suppressive. (Hinds et Sanders, 1993).

Ce qui concorde avec nos résultats qui montrent que les effets de l'EPA et du DHA sont dose dépendants; l'effet immunosuppresseur étant plus marqué à une concentration de 30 $\mu$ M comparé à 15 $\mu$ M.

Pourtant, des effets indésirables dus à la prise de grandes doses d'huile de poisson qui a la longue affectent l'immunité de l'hôte. (Harbrige, 1998).

Dans la MAI à médiation cellulaire T induite expérimentalement, les régimes pauvres en AGE ou riches en AGPI n-3 semblent augmenter la maladie, alors que les n-6 en réduisent la sévérité. Au contraire, dans les MAI à médiation cellulaire T, les métabolites désaturés et allongés de l'acide linoléique ont un rôle préventif. (Harbrige, 1998).

Les effets protecteurs des AGPI n-6 dans les MAI sont moins clairs mais peuvent inclure l'acide dihomogamma-linoléique et l'acide arachidonique sensible au circuit d'immunorégulation tel que les réponses Th1, les effets médiés par les TFG  $\beta$ 1. (Harbrige, 1998).

En conclusion, le diabète induit des altérations significatives dans la composition membranaire des cellules T et dans leurs fonctions d'une manière qui peut être manipulée par les modifications des AG alimentaires. Ceci suggère que les AG alimentaires sont importants dans la régulation de l'immunité à médiation cellulaire T dans le DID. (Singh et coll., 1988).



Il est probable que le plus significatif de ces mécanismes en relation avec notre compréhension de l'immuno-régulation et l'inflammation peut être lié aux effets des AGPI via les cytokines.

Il est important de noter que les lymphocytes des diabétiques répondent aux AGPI n-3 d'une façon parallèle à celle des lymphocytes des témoins.

La quantité, le type, et l'équilibre des AG alimentaires et des nutriments antioxydants associés ont un impact sur l'immunité provoquant une déviation immune ou des effets immunosuppresseurs. Le but est de réduire l'inflammation à médiation cellulaire immune qui va en retour affecter la sensibilité à, ou la sévérité à la MAI. (Harbrige, 1998).

L'huile de poisson diminue la prolifération des cellules tumorales, alors que l'acide arachidonique, un AG n-6 à longue chaîne, augmente leur prolifération. Ces effets opposés sont remarqués dans l'inflammation, particulièrement dans l'arthrite rhumatoïdale et l'asthme. Le DHA a des effets positifs sur l'hypertension artérielle, l'arthrite, l'athérosclérose, la dépression, le diabète, l'infarctus du myocarde, les thromboses, ainsi que certains cancers. (Harrocks et Yeo, 1999).

Une réponse immunitaire altérée dans l'état du diabète peut être attribuée aux altérations induites par le métabolisme des AG. (Singh et coll., 1988).

# CONCLUSION

Nos résultats mettent en évidence les effets immunosuppresseurs des acides gras poly insaturés de la famille n-3 exogènes, et par conséquent l'importance de leur ingestion au cours d'un diabète, ou comme prévention contre ce type de maladies.

De plus, le diabète sucré, de type I ou de type II est associé à une réduction de la prolifération des lymphocytes et de la production de l'IL-2 in vitro. La composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes est aussi altérée au cours du diabète. Les lymphocytes des diabétiques répondent aux effets des AGPI n-3 de la même façon que les lymphocytes des témoins, montrant le rôle immunomodulateur de ces AGPI au cours du diabète.

Néanmoins des approches nutritionnelles utilisant un supplément d'acides gras dans les maladies auto-immunes soit comme thérapie complémentaire soit comme thérapie alternative sont potentiellement très importantes, car la régulation de l'expression génique, la production des eicosanoïdes et des cytokines, l'action des enzymes anti-oxydants sont tous des mécanismes par lesquels les acides gras poly insaturés de la famille n-3 et de la famille n-6 peuvent exercer des effets sur le système immunitaire et les maladies auto-immunes.

Il est probable que le plus significatif de ces mécanismes en relation avec nos connaissances actuelles sur l'immunorégulation et l'inflammation sera à travers l'effet des acides gras sur les cytokines.

Il est apparent que la quête de la guérison du diabète ne sera pas facile. L'implication de plusieurs cellules, molécules et signaux qui initient l'attaque auto-immune envers les cellules hôtes éclaire sur le potentiel complexe de cette pathologie affaiblissante. Néanmoins, à travers la détermination de plusieurs chercheurs, on commence à rassembler les pièces de ce puzzle.

Notre compréhension des événements moléculaires et cellulaires impliqués dans l'initiation du diabète ne cesse de croître.

Des études futures qui identifieront avec précision les cellules présentatrices de l'antigène des îlots et les signaux que les cellules T diabétogéniques utilisent pour éviter la tolérance doit nous aider à choisir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La connaissance des mécanismes de mort cellulaire, de résistance à la mort cellulaire et de néoformation secondaire aux situations pathologiques conduisant à la disparition des cellules  $\beta$  demeure très préliminaire. Savoir si les cellules  $\beta$  peuvent être rendues résistante à la mort cellulaire, connaître la cinétique de leur destruction, Savoir si une réponse réplivative peut être obtenue en pathologie sont des questions essentiels à la mise en place de stratégies thérapeutiques.

Chacun de ces aspects offre autant de perspectives qui pourraient à l'avenir s'avérer déterminantes.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Références bibliographiques :**

- 1- Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. **1996**. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. **396**: 787-793.
- 2- Albert M.L., Sauter B., Bharrdwaj N. **1998**. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. **392**: 86-89.
- 3- American Diabetes Association. **1997**. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. **20**: 1183-1197.
- 4- Amos A.F., Mac carty D.J., Zimmet P. **1997**. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med*. 14 (suppl. 5) S1- S85.
- 5- Anonym. **1999**. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MCH sequencing consortium. *Nature*. **401**: 921-923.
- 6- Appels B., Burkart V., Kantwerk-funke M., Funda J., Kolb-Bachofen V., Kolb H. **1989**. Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J. Immunol*. **142**: 3803-3808.
- 7- Arnold B , Schörich G, Hämmerling G. **1993**. Multiple Levels of peripheral tolerance. *Immunol today*. **14**: 12-14.
- 8- Asnagli H., Murphy K.M. **2001**. Stability and commitment in T helper cell development. *Curr Opin Immunol*. **13 (2)**: 242-247.
- 9- Bach J.F. **2000**. New concepts of the etiopathogenesis and treatment of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Rev Allergy Immunol* .**19 (3)**:217-225.
- 10- Bach J.F., Chatenoud L. **2001**. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Ann Rev Immunol*. **19**:131-161.
- 11- Bach J.F. **1994**. Insulin-dependent diabetes as an autoimmune disease. *Endocrin Rev*. **15**: 516-542.
- 12- Bach J.F. **1994**. Monoclonal antibodies and peptide therapy in auto immune diseases, New York. Ed *auto immunity Rev. Prat*. **44**: 9-98.
- 13- Bach J.F. **1995**. Insulin- dependent diabetes mellitus as a  $\beta$  cell targeted disease of immunoregulation. *J autoimmun*. **8**: 439-463.
- 14- Banchereau J., Rousset F. **1997**. Human B lymphocytes, phenotype, proliferation and differentiation. *Adv Immunol*. **52**: 125-262.
- 15- Bang HO., Dyerberg J., Hjorne N. **1976**. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta med. Scand*. **200**: 69-71.
- 16- Bendelac A., Boitard C., Bedossa P., Bazin H., Bach J.F. **1988**. Adoptive T cell transfer of autoimmune non obese diabetic mouse does not require recruitment of host B lymphocytes. *J immunol*. **141**: 85-88.

- 17- Bendelac A., Carnaud C., Boitard C., Bach J.F. **1987**. Synergic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. *J Exp Med.* **166**: 823-832.
- 18- Bendtzen K., Hansen M.B., Ross C., Svenson M. **1998**. High-avidity autoantibodies to cytokines. *Immunol Today.* **19**: 209-211.
- 19- Bendtzen K., Mandrup- Poulsen T., Nerup J., Nielsen J.H., Dinarello C.A., Svenson M. **1986**. Cytotoxicity of human p 17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science.* **232**: 1545-1547.
- 20- Berman M.A., Sandborg CI., Wang Z., Imfeld K.L., Zaldivar F.Jr., Dadulfalza V. **1996**. Decreased IL-4 Production in new onset type I insulin- dependent diabetes mellitus. *J Immunol.* **157**: 4690-4696.
- 21- Bligh EG., Dyer WJ. **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911
- 22- Boitard C., Bach J.F. **2002**. Immunologie de la Biologie à la clinique, Médecine sciences. *Ed. Flammarion.* 253-299.
- 23- Bonna KH., Bjerve KS., Straume B., Gram IT., Thelle D. **1990**. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension - a population-based intervention trial from the tromso study. *N.Engl. J. med.* **322**: 795-801.
- 24- Bordoni A., Biagi PL., Turchetto E., Rossi CA., Hrlia S. **1992**. The correlation between the acidic composition of diacylglycerol and protein kinase C activation in culture of rats cardiomyocyte. *Cardiologia.***37**:631-634.
- 25- Bottazzo G.F., Dean BM., McNally J.M., McKay E.H., Swift P.G., Gamble D.R. **1985**. In situ characterization of autoimmune phenomenon and expression of HLA molecules in the pancreas of diabetic insulinitis. *N Engl J Med.* **313**: 353-360.
- 26- Bradley L.M., Watson S.R. **1996**. Lymphocyte migration into tissues. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 312-320.
- 27- Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C. **1993**. Three dimensional structure of the human class II histo-compatibility antigen HLA- DR1. *Nature.* **364**:33-39.
- 28- Burrows P.D., Cooper M.D. **1997**. B cell development and differentiation. *Curr Opin Immunol.* **9**: 239-244.
- 29- Burstein D., Handler E.S., Schindler J., Seals J., Mordes J.P., Rossini A.A. **1987**. Effect of interleukin-2 on diabetes in the BB/Wor rat. *Diabetes Res.* **5**: 163-167.
- 30- Buyschaert M. **1998**. Diabétologie clinique. *Ed DEboeck Larcier.* 27-35.
- 31- Caillat-Zückman S. **2002**. Génétique du système HLA. Mt (vol.8) n°3 P.162.
- 32- Calder PC. **1996**. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proceeding of the Nutrition society.* **55**: 737-774.

- 33- Calder PC. **1996.** effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* **57**: 555- 562.
- 34- Calder PC. **1999.** Dietary fatty acids and immune system. *Lipids*.**34**:S137-S140.
- 35- Calmarza P., Vella J. **1991.** Lipids, lipoproteins and apolipoprotein (a) isoforms in type II diabetic patients. *Journal of cardiovascular risk* Vol. 6, **3**: 171-175.
- 36- Cantrell, D.A., Smith, K.A.(1984) The interleukin-2 T cell system: a new cell growth model. *Science* 224, 1312-1316.
- 37- Carel J.C., Boudali S., Bougneres P., Boitard C. **1999.** Immunologic approaches in the prevention and treatment of type1 diabetes and auto immune disease. *Ann Med Interne.* **150 (4)**:343-354.
- 38- Cavaillon J.M. **1996.** Les cytokines. Paris. *Ed masson.* 589 pages.
- 39- Cella M., Engering A., Pinet V., Pieters J., Lanzavecchia A. **1997.** Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature.* **388**:782-787.
- 40- Cerotoni J.C., Tschopp J. **1997.** New knowledge about T-Cell Cytotoxicity. *Ann Oncol.* 8 Suppl. **2**: 75-78.
- 41- Chang F.Y., Shaio M.F. **1995.** Decreased cell mediated immunity in patients with NIDDM. *Diabet Res Clin Pract.* **28**: 137-146
- 42- Christiansen S.W., Schultz L.D., Leiter E.H. **1993.** Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T cells from diabetic versus prediabetic NOD. NON- Thy- la donors. *Diabetes.* **42**: 44-55.
- 43- Coffman R.L. **1993.** Mechanisms of helper T cell regulation of B cell activity. *Ann NY Acad Sci.* **681**: 25-28.
- 44- Corbett J.A., McDaniel M.L. **1992.** Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of  $\beta$  cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes.* **41**: 897-903.
- 45- Corey EJ., Shih C., Cashman JR. **1983.** Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc. Natl . Acad. Sci. USA* **80**:3581-3584.
- 46- Davidson, E. M., Rae, and Smith, M. J. H. **1983.** Leukotriene B<sub>4</sub>, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **42**, 977-679
- 47- De Maria R., Tesli R. **1998.** Fas-Fasl interactions. A common pathogenic mechanism in organ specific autoimmunity. *Immunol Today.* **19**: 121-125.



- 48- Delespesse G., Duchateau, J., Bastenie, P.A., Lavaux, J.P., Collet, H. and Govaerts A. **1974**. Cell mediated immunity in diabetes mellitus. *Clin. Exp. Immunol.* **18**, 461-467.
- 49- Delovitch T.L., Singh B. **1997**. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity.* **7**: 727-738.
- 50- Denys A., Hichami A., Khan NA. **2002**. Eicosapentaenoic acid docasahexaenoic acid modulate MAP kinase enzyme activity in human in T-cells. *Molecular and Cellular Biochemistry.* **232**:143-148
- 51- Dong C., Flavell R.A. **2001**. Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol.* **8 (1)**: 47-51.
- 52- Drazen, J. M., and Austen, K. F. **1987**. Leukotrienes and airway responses. *Am. Rev. Resp. Dis.* **163**, 985-998.
- 53- Dvorak AM., Dvorak HF., Peters SP., Shulman ES., MacGalshan DW., Pyne K., Harvey VS., Galli SJ., Lichtenstein LM. **1983**. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *Journal of Immunology* **131**: 2965-2976.
- 54- Edouard P., Hiserdort JC., Plamondon C., Poussier P. **1993**. CD+8 T cells are required for adoptive transfer of the BB rats diabetes syndrome. *Diabetes.* **42**:390-397.
- 55- Eizirik D.L., Tracey D.E., Bendtzen K., Sandler S. **1991**. An interleukine-1 receptor antagonist protein protects insulin- producing beta cells against suppressive effects of interleukin-1 beta. *Diabetologia.* **34**:445-448.
- 56- Endres S., Meydani SN., Ghorbani R., Schindler R., Dinarello CA. **1993**. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.* **54**: 599-603.
- 57- Farrah T., Smith C.A. **1992**. Emerging cytokin family. *Nature.* **358**: 26.
- 58- Faust A., Kleeman R., Rothe H., Kolb H. **1996**. Role of macrophages and cytokines in  $\beta$  cell death. In: Sharfir E. ed. *Lessons from animal diabetes*. VI: Cambridge: Birkhauser Boston. 47-56.
- 59- Fogh, K., Ternowitz, T., Kragballe, K. and Herlin, T. **1986**. Chemotactic lipoxxygenase products in sera from patients with psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* **278**,173-176.
- 60- Forbes S.A., Towsdale J., **1999**. The MHC Quarterly Report. *Immuno-genetics* **50**:152-159.
- 61- Fox C.J., Danska J.S. **1997**. IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts nondestructive insulinitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* **158**: 2414-2424.

- 62- Frenoux J-MR., Prost ED., Belleville J., Prost JL. **2001**. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutri.* **131**: 39-45.
- 63- Fujimoto W.Y. **1996**. Overview of non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) in different population groups. *Diabetic Med.* **13**: 57-510.
- 64- Garboczi D.N., Ghosh P., Utz U., Fan Q.R., Biddison W.E., Wiley.D.C .**1996**. Structure of the complex between human T cell receptor, viral peptide and HLA- A2. *Nature.* **384**: 134- 141.
- 65- Gepts W. **1981**. Islet changes in human's diabetes. In: Cooperstein S.J., Watkins D., eds. *The islet of Langerhans: Biochemistry, Physiology and pathology*. New York: Academic press, 321-356.
- 66- Giordano C., Panto F., CarusoC. **1989**. Interleukin 2 and soluble interleukin 2-receptor secretion defect in vitro in newly diagnosed type 1 diabetic patients. *Diabetes* **38**, 310-315.
- 67- Goetzl EJ., An S., Smith WL. **1995**. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human disease. *FASEB. Journal.* **9**: 1051-1058.
- 68- Golde D. **1992**. Les cellules souches. Ed. *Pour la science N°172*.
- 69- Green EA., Flavell R.A. **1999**. TRANCE –RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *J. Exp. Med.* **189**: 1017-1020.
- 70- Grimble R.F. **2001**. Nutritional modulation of immune function. *Proc. Nutr. Soc.* **60(3)**: 389-397.
- 71- Guffy MM., North JA., Burns CP. **1984**. Effect of cellular fatty acid alteration on adriamycin sensitivity in cultured L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res.* **44**: 1863-1866.
- 72- Hahn S, Gehri R, Erb P. **1995**. Mechanism and biological significance of CD-4-mediated cytotoxicity. *Immuno.l Rev.* **146**: 57-79.
- 73- Hanninen A., Jalkanen S., Salmi M., Toikkanen S., Nikolakaros G., Simmel O. **1992**. Macrophages T-cell receptor usage and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* **90**:1901-1910.
- 74- Harbige L.S. **1998**. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proc. Nutr. Soc.* **57**: 555-562.
- 75- Harbige LS, Lawyard L., Morris M., Amor S. **1997a**. Cytokine secretion by human T cell clones is differentially regulated by eicosanoids. *Transaction of the biochemical Society.***25**: 347S.
- 76- Harbige LS., Fisher BAC. **1997**. Effect of omega -6 lipid rich borage oil feeding on immune function in healthy volunteers. *Transaction of the biochemical Society.* **25**: 343S.

- 77- Harrocks L.A., Yeo Y.K. **1999**. Health benefits of docosahexaenoic acid. *Pharmacol. Res.* **40(3)**:211-25.
- 79- Hennig B., Toborek M., McClain CJ., Diana JC. **1996**. Nutritional implications in vascular endothelial cell metabolism. *Journal of the American college of nutrition.* **15**: 345-358.
- 80- Hinds A., Sanders T.A. **1993**. The effect of increasing levels of dietary fish oil rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on lymphocyte phospholipids fatty acid composition and cell- mediated immunity in the mouse. *Br. J. Nutr.* **69(2)**: 423-429.
- 81- Hennig B., Toborek M., McClain CJ. & Diana JC. **1996**. Nutritional implications in vascular endothelial cell metabolism. *Journal of the American college of nutrition* **15**: 345-35
- 82- Hoffman WH., Helman SW., Passmore G. **2001**. Acute activation of peripheral lymphocytes during treatment of diabetic ketoacidosis. *J. Diab. Comp.* **15**: 137- 14.
- 83- Hopkins J., McConnell I., Pearson JD. **1981**. Lymphocyte traffic through antigen- simulated lymph nodes II: Role of prostaglandin E<sup>2</sup> as a mediator of cell shutdown. *Immunology.* **42**: 225-231.
- 84- Horiguchi J., Spriggs D., Imamura K., Stone R., Luebbers R., Kufe D. **1989**. Role of arachidonic acid metabolism in transcriptional induction of tumor necrosis factor gene expression by phorbol ester. *Molecular and cellular Biology.* **9**: 252-258.
- 85- Huang SC., Mistfeldt ML., Fritsche KL. **1992**. Dietary fat influences Ia antigen expression and immune cell populations in the murine peritoneum and spleen. *Journal of nutrition.* **122**: 1219-1231.
- 86- Hughes DA., Pinder AC., Piper Z., Lund EK. **1995**. N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes. *Transaction of the biochemical Society.* **23**: 303S.
- 87- Hughes J.H., Colca J.R., Easom R.A., Turk J., McDaniel M.L. **1990**. Interleukin-1 inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets by a process that requires gene transcription and mRNA translation. *J. Clin. Invest.* **86**: 856-863.
- 88- Hung P., Kaku S., Yunoki S., Ohkura K., Gu JY., Ikeda I., Sugano M., Yazawa K. Yamada K. **1999**. Dietary effects of eicosapentaenoic and decosahexaenoic acid esters on lipid metabolism and immune parameters in Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 135-140.
- 89- Hutchings P., Rosen H., O'Reilly L., Simpson E., Gordon S., Cooke A. **1990**. Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion- promoting receptor on macrophages. *Nature*, **348**: 639-642.

- 90- Ihm SH., Yoon JW. **1990**. Studies on autoimmunity for initiation of beta cell destruction: VI. Macrophages are essential for the development of beta cell specific cytotoxic effectors and insulinitis in NOD mice. *Diabetes*. **39**: 1273-1278.
- 91- Ingulli E., Mondino A., Jenkins M.K. **1997**. In vivo detection of dendritic cells antigen presentation to CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **185**: 2133-2141.
- 92- Itoh M. **1989**. Immunological aspects of diabetes mellitus. Prospects for pharmacological modification. *Pharm. Ther.* **44**: 351-406.
- 93- Janeway C.A Jr., Travers P., Walport M., Shlomchik M. **2001**. Immunology: the immune system in health and disease. Paperback in Immunologie de la biologie à la clinique. 2002. *Quatrième édition Flammarion*. 1-5.
- 94- Jasen A., Homo-Delarch F., Hooijkaas H.H., Leenen P.J., Darden M., Drexhage HA. **1994**. Immunohistochemical characterization of monocyte-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of insulinitis and beta cell destruction in NOD mice. *Diabetes*. **43**: 667-675.
- 95- Jolly CA., Jiang YH., Chapkin RS., McMurray DN. **1997**. Dietary (n-3) Polyunsaturated fatty acids Suppress murine Lymphoproliferation, Interleukin-2 Secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *American Society for Nutritional Science*. 37-43.
- 96- Kagi D, Ledermann B., Burki K. **1995**. Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vivo: mechanism and significance. *Immunol. Rev.* **146**:95-115.
- 97- Kagi D, Ledermann B., Burki K. **1996**. Molecular mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: mechanisms and significance. *Immunol. Rev.* **14**: 207-232.
- 98- Kanters SDJM., Dallinga, Thie GM., De Ruijter-Heystek FC., Alagra A., Erkelens DW., Banga JD., Jansen H. **2001**. Effect of intensive lipid lowering strategy on low density lipoprotein particle size in patients with type II diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 569-581
- 99- Katz J., Benoist C., Mathis D. **1993**. Major histo-compatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* **23**: 3358-3360.
- 100- Keovary S., Rossini AA., Stroller W., Chikh W. **1983**. Passive transfer of diabetes in the BB/W rat. *Science*. **220**:727-728.
- 101- Kershaw M.H., Trapani JA., Smith M.J. **1995**. Cytotoxic lymphocytes; redirecting the cell mediated immune response for the therapy of cancer. *Therapeutic Immunol.* **2 (3)**: 173-181.
- 102- Khan NA., Hichami A. **1999** Ionotropic 5-hydroxytryptamine type3 receptor is implicated in the activation of protein C-dependent phospholipase D pathway in human T cells. *Biochem. J.* **344**:199-204.

- 103- Khan NA., Hichami A. **2001**. Role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the modulation of T signalling. In *Recent Advances in Research in Lipids* (Pandali G. Ed.) Transworld Publications in Press.
- 104- King H., Rewers M., WHO Ad Hoc- reporting group. **1993**. Global estimates for diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes care*. **16**: 157-177.
- 105- Ko IY., Ihm SH., Yoon JW. **1991**. Studies on autoimmunity for initiation of beta-cell destruction VIII. Pancreatic beta-cell dependent autoantibody to a 38 kilodalton protein precedes the clinical onset of diabetes in BB rats. *Diabetologia*. **34**: 548-554.
- 106- Ko IY., Jun HS., Kim GS., Yoon JW. **1994**. Studies on autoimmunity for initiation of beta-cell destruction X. Delayed expression of the membrane-bound islet cell specific 38 KDa autoantigen that precedes insulinitis and diabetes in the BB rats. *Diabetologia*. **37**: 460-465.
- 107- Koike T., Itoh Y., Ishii T., Takabayashi K., Maruyama N., Tomioka H. **1987**. Preventive effect of monoclonal anti-L3T4 antibody on development of diabetes on NOD mice. *Diabetes*. **36**: 539-541.
- 108- Kolb H., Kantwerk G., Treichel U., Kurner T., Keisel U., Hoppe T. **1986**. Prospective analysis of islet lesions in BB rats. *Diabetologia*. **29**: 1-13.
- 109- Kolb H., Zielasek J., Treichel U., Freytag G., Wrann M., Keisel U. **1986**. Recombinant interleukin-2 enhances spontaneous insulin- dependent diabetes in BB rats. *Eur J Immunol*. **16**: 209-212.
- 110- Kremer JM. **1991**. Clinical studies of omega n-3 fatty acid supplementation in patients who have rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am*. **17**: 391-402.
- 111- Kuniyasu Y., Takahashi T., Itoh M. **2000**. Naturally anergic and suppressive CD25 (+) CD4 (+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol*. **12 (8)**: 1145-1155.
- 112- Kunkel SL., Chensue, SW. **1984**. Prostaglandins and the regulation of immunue responses. *Adv. Inflammations Res*. **7**, 93-109.
- 113- Kuroki T., Inogushi T., Umeda F., Nawata H. **1998**. Effect of eicosapentaenoic acid on glucose-induced diacylglycerol synthesis in cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **24**:473-477.
- 114- Kurts C., Carbonne F.R., Krummel M., Koch K.M., Miller J.F. Heath W.R. **1999**. Signalling through CD8 T cells. *Nature*. **398**: 341-344.
- 115- Kurts C., Miller J.F.A.P., Subramanian R.M., Carbonne F.R., Heath W.R. **1998**. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigen and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med*. **188**: 409-414.

- 116- Kwon B., Youn B.-S., Kon B. **1999**. Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 340-345.
- 117- Lee K., Amano K., Yoon J.W. **1988**. Evidence for initial involvement of macrophages in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes.* **37**: 197-199.
- 118- Lee K., Pak C., Amano K., Yoon J.W. **1988**. Prevention of lymphocytic thyroiditis and insulinitis in diabetes prone BB rats by the deletion of macrophages. *Diabetes.* **31**: 400-402.
- 123- Lee TH., Mencia-Huerta JM., Shih C., Corey EJ., Lewis RA., Austen KF. **1984**. Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxygenase pathway products by ionophore-activated human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **74**: 1922-1933.
- 124- Lefkowitz JB. **1988**. Essential fatty acid deficiency inhibits the in vivo generation of leukotriene B<sub>4</sub> and suppresses levels of resident and elicited leukocytes in acute inflammation. *Journal of Immunology.* **140**: 288- 233.
- 128- Leitch AG., Lee TH., Ringel EW., Prickett JD., Robinson DR., Pyne SG., Corey EJ., Drazen JM., Austen KF., Lewis RA. **1984**. Immunologically induced generation of tetraene and pentaene leukotriene in the peritoneal of cavities of menhaden-fed rats. *J. Immunol.* **132**: 2559-2565.
- 129- Leung, K. H., and Mihich, E. **1980**. Prostaglandin modulation of development of cell-mediated immunity in culture. *Nature.* **288**, 597-601.
- 130- Liu Y.J., Bouteiller O., Figier-Vivier I. **1997**. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr. Opin Immunol.* **9**: 256-262.
- 131- Lo D., Reilly C., Scott B., Liblau R., McDevitt H., Burkly L. **1993**. Antigen-presenting cells in adoptively transferred spontaneous autoimmune diabetes. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1693-1698.
- 132- Lokesh BR., German B., Kinsella JE. **1988**. Differential effects of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on suppression in lipoxygenase pathway in peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* **958**:99-107.
- 133- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RI. **1951**. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265- 275.
- 134- Madani S., Hichami A., LeGrand A., Belleville J., Khan NA. **2001**. Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *FASEB J.* 2595-2601.
- 135- Male D., Cooke A., Owen M., Trowsdale J., Champion B. **1996**. *Advanced Immunology*, 3<sup>rd</sup> ed. **London**: Mosby.
- 136- Maloy KJ., Powrie F. **2001**. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* **2 (9)**: 816-822.

- 137- Mandrup- Poulsen T., Bendtzen K., Nielsen JH., Benedixen G., Nerup J. **1985**. Cytokines cause functional and structural damage to isolated islet of Langerhans. *Allegry*. **40**: 424-429.
- Mandrup –Poulsen T., Egeberg J., Nerup J., Bendtzen K., Nielsen JH.,  
 138- Dinarello CA., **1987**. Ultrastructural studies of time course and cellular specificity of interleukin-1 mediated islet cytotoxicity *Acta pathol. Microbil. Immunol. Scand C*. **95**:55-63.
- 139- Manhart N., Vierlinger, Akomeah R., Bergmeister H., Splitter A., Roth E. **2000**. Influence of enteral diets supplemented with key nutrients on lymphocyte subpopulations in peyer's patches of endotoxin –boostered mice. *Clin. Nutr.* **19**:265-269.
- 140- Mantovani A., Bussolino F., Introna M. **1997**. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol. Today*. **18**: 231-240.
- 141- Marrack P., Kappler J.W. **1997**. Positive selection of thymocytes bearing  $\alpha \beta$  T cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 250-255.
- 142- Marrack P., Kappler J. **1993**. la reconnaissance du soi. Ed. *Pour la science* N°193 Université de Denver. P.72-73.
- 143- Matsue H., Edelbaum D., Hartmann A., Morita A., Bregstresser P., Yagita H., Okumura K., Takashima A. **1999**. Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen –specific interaction with CD4+ T cells *T. Immunol.* **19**: 223-230.
- 144- Mc Cance Dr, Hanson R.L., Petit D.J., Benett P.H., Hadden D.R., Knowler W.C. **1997**. Diagnosing diabetes mellitus. Do we need new criteria? *Diabetologia*. **40**:247-255.
- 145- Mc Murray DN., Jolly CA., Chapkin RS. **2000**. Effects of dietary n-3 fatty acids on T cell activation and T cell receptor-mediated signalling in a murine model. *J.Hum. Hypertens.* **10**: S103-S107.
- 146- Meffre E, Casellas R, Nussenzweig M.C. **2000**. Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* **1(5)**:379-385.
- 147- Mero N., Malmström R., Steiner G., Taskinen M.R., Syväme M. **2000**. Postprandial metabolism of apolipoprotein B-48 and B-100 containing particles in type II diabetes mellitus: relations and angiographically verified severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. **150**: 167-177.
- Meydani SN., Endres S., Woods MM., Golding BR., Soo C., Morrill-Labrode  
 148- A., Dinarello C., Gorbach SL. **1991**. Oral n-3 fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J. Nutr.* **121**: 547-555.

- 149- Meydani SN, Lichtenstein AH, Cornwall S, Meydani M, Goldin BR, Rasmussen H, Dinarello CA, Schaefer EJ. **1993**. Immunologic effects of national cholesterol education panel Step-2 diets with a without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. *Journal of Clinical Investigation*, **92**: 105-113.
- 150- Miller B.J., Appel M.C., O'Neil J.J., Wicker L.S. **1988**. Both the Lyt-2 and L3T4+ T cell subsets are requires for the transfer of diabetes mellitus in NOD mice. *J. Immunol.* **140**: 52-58.
- 151- Mingari MC., Moretta A., Moretta L. **1998**. Regulation of KIR expression in human T cells : a safety mechanism that may impair protective T cell responses. *Immunol Today*. **19**: 153- 157.
- 152- Miyazaki A., Hanafusa T., Yamada K., Miyagawa J., Fujino-Kurihara H., Nakajima H. **1985**. Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of prediabetic nonobese diabetic (NOD) mice: A longitudinal study. *Clin. Exp. Immunol.* **60**:622-630.
- 153- Mori Y., Suko M., Okudaira H., Matsuba I., Tsuruoaka A., Sasaki A. **1986**. Preventive effects of cyclosporine on diabetes in NOD mice. *Diabetologia*. **29**: 244-247.
- 154- Moser B., Loetscher P. **2001**. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* **2 (2)**: 123- 128.
- 155- Mosmann TR., Coffman RI. **1989**. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*. **7**:145-173. -92.
- 156- Mosmann T.R., Sad S. **1996**. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today*. **17**: 138-146.
- 157- Mosmann T.R., Li L., Sad S. **1997**. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin. Immunol.* **9 (2)**: 87
- 158- Mullbacher A., Flynn K. **1996**. Apects of cytotoxic T cell memory. *Immunol. Rev.* **150**: 113-127.
- 159- Mykkänen L., Haffner S.M., Rönnema N.R., Bergman T., Laakso M. **1997**. Low insulin sensitivity is associated with clustering of cardiovascular disease risk factors. *American Journal of Epidemiology*. **146**: 315-321.
- 160- Nagata M., Yoon J.W. **1992**. Studies on autoimmunity for initiation of beta cell destruction: IX. Electron microscopic evidence on a distinct difference in the destruction of beta cells between CD4+ and CD8+ T cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice. *Diabetes*. **39**: 998-1008.
- 161- Nemazee D. **2000**. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **1 (5)**:19-51.
- 162- Nishizuka Y. **1995**. Protein Kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**:484-496.



- 163- Nossal G. **1993**. La vie la mort et le système immunitaire. Ed. *Pour la science* N°193. Université de Melbourne. P 30-32.
- 164- Nossal G. **1989**. Immunologic tolerance collaboration between Antigen and Lymphokines in science. Ed. *Pour la science* N° 193. Vol. **245**: 147-153
- 165- O'Brien B.A., Harmon B.V., Cameron D.P., Allan D.J. **1997**. Apoptosis is the mode of B- cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes*. **46**: 750-757.
- 166- Ogawa M., Maruyama T., Hasegawa T., Kanaya T., Kobayashi F., Toshino Y. et coll. **1985**. The inhibitory of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non obese diabetic (NOD) mice. *Biomed Res*. **6**:103-105.
- 167- O'Rourke A.M., Mescher M.F. **1993**. The roles of CD8 in cytotoxic T lymphocyte function. *Immunol. Today*. **14 (4)**: 183-188.
- 168- Oschilewski U., Keisel U., Kolb H. **1985**. Administration of silica prevents diabetes in BB rats; *Diabetes*. **34**:197-199.
- 169- Otton R., Mendonca JR., Curi R. **2002**. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. *J. Endocrinol*. **174**: 55-61.
- 170- Pablo M.A., Alvarez de Cien Fuegos G. **2000**. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol. Cell Biol*. **78(1)**:31-9.
- 171- Pankewycz O.G., Guan J.X., Benedict J.F. **1995**. Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications. *Endocrine Rev*. **16**: 164-176.
- 172- Parham P. **1999**. Pathways of antigen processing and presentation. Immunological reviews vol.172. Copenhagen, Denmark: *Munksgaard Ed*.
- 173- Paul W.E. **1999**. Fundamental immunology. Philadelphia, Lippencott- Raven. 1589-1590.
- 174- Peterson L.D., Jeffrey N.M., Thies F., Sanderson P., Newsholme E.A., Calder PC. **1999**. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell mediated immunity. *Lipids*. **33(2)**: 171-180.
- 175- Peterson LD., Vanderkeur M., De Vries RR., Roep BO. **1999**. Autoreactive and immunoregulatory T cell subsets in insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. **33**: 552- 555
- 176- Phipps RP., Stein SH., Roper RL. **1991**. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology Today* **12**: 349-352.
- 177- Plouffe, J.F., Silva. J. Jr., Fekety, R. and Allen J.L. **1978**. Cell mediated immunity in diabetes mellitus. *Infect. Immun*. **21**: 425-429.
- 178- Poisson JP. **1991**. Metabolisme des acides gras essentiels. *Germ*. 456- 474.

- 179- Pompia C., Lopes L.R., Miyasaka C.K., Procopio J., Sannomiya P., Curi R., Braz J. **2000**. Effects of fatty acids on leukocyte function. *Med Res.* **33 (11)**:1255-68.
- 180- Prisco D., Panniccia R., Bandinelli B., Filippini M., Francalanci I., Giusti B., Giurlani L., Gensini GF., Abbate R., Neri SGG. **1998**. Effect of medium term supplementation with a moderate dose of n-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients. *Thromb. Res.* **91**: 105-112.
- 181- Proietto J., Fillipis A., Nakhla C., Clark S. **1999**. Nutrient induced insulin resistance. *Molecular and cellular Endocrinology.* **151**: 143-149.
- 182- Pusarie P., Meckhenie A., Heys S.D., Ermine O. **1997**. Modulation in vitro of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogenes and cytokine production by essential fatty acids. *Immunology.* **92(2)**: 166-172.
- 183- Pushkareva M., Obeid LM, Hannun YA. **1995**. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunology today* .**16**: 294-302.
- 184- Puxty, J.A.H. and Fox, R.A. **1984**. Diabetes and Infection .IN: R.A. Fox (Ed.), Immunology and Infection in the Elderly. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp.79-201.
- 185- Rabinovitch A., Pukel C., Baquerizo H., MacKay P. **1989**. Immunological mechanism of islets  $\beta$  cell destruction: Cytotoxic cells and cytokines. In: Sharfer E., Reynolds AE., eds. *Frontiers in Diabetes Research. Lesson from animals diabetes II.*, London: John Libbey . 52-57.
- 186- Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W., Strynadka K., Ju Q., Eldestein D., Brownlee M., Korbitt GS., Rajotte RV. **1999**. Transfection of human pancreatic islets with an anti- apoptic gene (bcl-2) protects B cells from cytokine induced destruction. *Diabetes.* **48 (6)**: 1233-1239.
- 187- Rabinovitch, **1999**. Dietary marine lipids modify autoimmune disease. *Academic Press Inc.* 247-259
- 188- Rajewsky K., Von Boehmer H. **1993**. Lymphocyte development in current opinion in immunology. *Curr Opin Immunol.* **Vol. 5**: 175-176.
- 189- Reiner S.L., Seder R.A. **1995**. T helper cell differentiation in immune response. *Curr Op Immunol.* **7 (3)**: 360-366.
- 190- Resch K., Gelfrand EW., Hansen K., Ferber E. **1972**. Lymphocyte activation. Rapid changes in PL metabolism of plasma membranes during stimulation. *Eur. J. Immunol.* **2**: 598- 601.
- 191- Robertson TL., Kato H., Gordon T., Kagan A., Rhoads GG., Land CE., Worth RM., Belsky JL., Dock DS., Myanashi M., Kawamoto S. **1998**. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. Coronary heart disease risk factors in Japan and Hawaii. *Am. J. Cardiol.* **39**:244-250.

- 192- Ridge F., Di rosa F., Matzinger P. **1998**. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CDA<sup>+</sup> T-helper cell and a T-killer cell. *Nature*. **393**: 474-478.
- 193- Robbins DJ., Zhen E., Cheng M., Xu S., Ebert D., Cobb MH. **1994**. MAP kinases ERK1 and ERK2 : pleiotropic enzymes in a ubiquitous signalling network. *Adv. Cancer. Res.***63**:93-116.
- 194- Roep BO., Atkinson M.A., Van Endert P.M., Gottlieb PA., Wilson SB., Sachs JA. **1999**. Auto reactive T cells responses in insulin dependent (type 1) diabetes mellitus. Report of the first international workshop for standardization of T cell assays. *J. autoimmune*. **13**: 267-282.
- 196- Roitt I.N. **1991**. Essential immunology. Blackwell scientific publicat. Ed. *Pour la science N°193*. P.30-31.
- 197- Romagnani S. **1994**. Lymphokine production by T cells in disease states. *Ann. Rev. Immunol.* **12**: 227-257.
- 198- Roper LR., Conrad DH., Brown DM., Warner GL., Phillips R. **1990**. Prostaglandin E<sup>2</sup> promotes IL-4 induced IgE and IgG1 Synthesis. *Journal of Immunology*.**145**: 2644-2651.
- 199- Rose N., Mackay I. **1992**. The auto immune diseases. Academic press. Ed. *Pour la science N°193* P.38-39.
- 200- Ross R. **1993**. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. **362**: 801.
- 201- Rossini A.A., Greiner D.L., Freidman H.P., Mordes J.P. **1993**. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes rev.* **1**: 43-75.
- 202- Rothe H., Faust A., Schade U., Kleeman R., Bosse G., Hibino T. **1994**. Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon- gamma, but not for interleukin-4. *Diabetologia*. **37**:1154-1158.
- 203- Sakaguchi S. **2000**. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self tolerance. *Cell*. **101 (5)**: 455-458.
- 204- Sandler S., Bendtzen K., Eizirik D.L., Welsh M. **1990**. Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets *in vitro*. *Endocrinol.* **126**: 1288-1294.
- 205- Sandler S., Eizirik D.L., Svenson C., Strandell E., Welsh M., Welsh N. **1991**. Biochemical and molecular actions of interleukin-1 on pancreatic  $\beta$ -Cells. *Autoimmunity*. **10**:241-253.
- 206- Sasaki T., Kanke Y., Nagahashi M., Toyokawa M., Matsuda M. **2000**. Dietary docosahexaenoic acid can alter the surface expression of CD4 and CD8 on T cells in peripheral blood. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1047-1049.

- 207- Sasaki T., Kanke Y., Kudoh K., Misawa Y., Shimisu J., Takita T. **1999**. Effects of dietary docosahexaenoic acid on surface molecules involved cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**:519-530.
- 208- Scott P. **1993**. Selective differentiation of CD4<sup>+</sup> T helper cell subsets. *Curr Op Immunol.* **5 (3)**: 391-397.
- 209- Schevach E.M. **2000**. Regulatory T cells in autoimmunity. *Ann. Rev. Immunol.* **18**: 423-449.
- 210- Schlager SI., Meltzer MS., Madden LD. **1983**. Role of membrane lipids in the immunological killing of tumor cells: II. Effector cell lipids. *Lipids*.**18**:483-488.
- 211- Sebaldt R.J., Keranen LM., **1994**. Phosphotadyl-L-serine is nessecary for protein kinase C's high-affinity interaction with diacglycerol-containing membranes. *Biochemistry*.**33**:6651-6658.
- 212- Seder RA., Le Gros GG. **1995**. The functional role of CD8<sup>+</sup> T helper type 2 cells. *J Exp Med.* 181 **(1)**: 5-7.
- 213- Semp P., Bedossa P., Richard M.F., Villa M.C., Bach J.F., Boitard C. **1991**. Anti- alpha/beta T cell receptor monoclonal antibody provides an efficient therapy for autoimmune diabetes mellitus in NOD mice. *Eur. J. immunol.* **21**: 1163-1169.
- 214- Serreze D.V., Hamaguchi K., Leiter E.H. **1989**. Immunostimulation circumvents diabetes on NOD/Lt mice. *J. Autoimmun.* **2**: 759-776.
- 215- Shah, U., Karch, L., Baker, L., and Zier, K.S. **1991**. Low interleukin 2 synthesis by type 1 diabetics is regulated at pretranslational level.175-179.
- 216- Shipman PM., Schmidt RR., Chepenik KP. **1988**. Relation between arachindonic acid metabolism and development of thymocytes in foetal thymic organ cultures. *Journal of Immunology.* **140**: 2714-2720.
- 217- Sherington EJ., Sanderson P., Calder PC. **1995**. The effect of dietary lipid manipulation on macrophages cell surface expression. *Transactions of the biochemical Society.* **23**: 272S.
- 218- Silverstein A.M. **1989**. A history of immunology. Academic Press. Ed. *Pour la science N°193* P.34-35.
- 219- Simopoulos AP. **1991**. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 438-463.
- 220- Singer P., Berger I., Moritz V., Forster D., Taube C. **1990** N-6 and n-3 PUFA in liver lipids, Thromboxane formation and blood pressure from SHR during diets supplemented with evening primose, sunflowerseed or fish oil. *Prostaglandins leukots. Essent. Fatty acids.* **39**: 207-211.

- 221- Singh B., Lauzon J., Venkatraman J., Thomson AB., Rajotte R.V., Clandinin M.T. **1988**. Effect of high/low dietary linoleic acid levels on the function and fatty acid composition of T lymphocytes of normal and diabetic rats. *Diabetes Res.* **8(3)**: 129-134.
- 222- Smith, K.A. **1988**. Interleukin- 2: inception, impact and implications. *Science* **240** :1169-1179.
- 223- Somoza N., Vargas F., Roura-Mir C., Vives –Pi M., Fernandez –Figueras M.T., Ariza A. **1994**. Pancreas in recent onset insulin –dependent diabetes mellitus : Changes in HLA, adhesion molecules and auto- antigens restricted T receptor V $\beta$  usage, and cytokine profile. *J. Immunol.* **153**: 1360-1372.
- 224- Southern D., Schulster D., Green I.C. **1990**. Inhibition of insulin secretion by interleukin 1- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  via an L- arginine-dependent nitric oxide generation mechanism. *FEBS Lett.* **276**: 42-44.
- 225- Stampfer MJ., Hu FB., Manson JE., Rimm EB., Willet WC. **2000**. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and life style. *N Engl. J. Med.* **343**: 16-22.
- 226- Steinman L. **1993** .Immunité et auto-immunité. Ed. *Pour la science N°193*. P.100-102. Structure of the complex between human T cell receptor viral peptide and HLA–A2. *Nature.* **384**:134-141.
- 227- Sueng Kim H.F., Weeber E.J., Sweatt J.D., Stoll A.L., Maragell L.B. **2001**. Inhibitory effects of omega 3 fatty acids on protein kinase C activity in vitro. *Mol Psychiatry.* **6(2)**: 246-248.
- 228- Surette ME., Whelan J., Lu G., Hardard’ Ottir I., Kinesella JE. **1995**. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modify Syrian hamster platelet and macrophage phospholipid fatty acyl composition and eicosanoid synthesis : a controlled study. *Biochim. Biophys. Acta.* **1255**: 185-191.
- 229- Tabbey P.W., Buttke T.M. **1993**. Independent arachidonic acid- mediated gene regulatory pathways in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **194(2)**: 862-868.
- 230- Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S. **2000**. Immunologic self-tolerance maintained by CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte- associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192 (2)**: 303-310.
- 231- Tate G., Mandell Bf., Laposta M., Ohlige D., Baker DG., Schumarer RH., Zurier RB. **1989**. Suppression of acute and chronic inflammation by dietary gamma-linolenic acid. *Journal of rheumatology.* **16**: 729-733.
- 232- Tchorzewski H., Glowacka E., Banasik M., Lewkowicz P., Szalapska M., Zawodniak M. **2001**. Activated T lymphocytes from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus have different ability to produce interferon  $\gamma$ , Interleukin-6 and interleukine-10 and undergo anti CD958 induced apoptosis after insulin stimulation. *Immunology letters.* 225-234.

- 233- Terano T., Salmon JA., Moncada S. **1984**. Effect of orally administered eicosapentaenoic acid (EPA) in the formation of leukotriene B4 and leukotriene B5 by rat Leukocytes. *Biochemical Pharmacology*. **33**: 3071-3076.
- 234- Thebault K., Larger E., Boitard C. **1999**. Mort et survie des cellules  $\beta$ . *Ed. Diabète au quotidien*. P. 9-10.
- Thivolet C., Bendelac A., Bedossa P., Bach J.F., Carnaud C. **1991**. CD8+T cell
- 235- homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is CD4+T cell-dependent. *J Immunol*. **146**:85-88.
- 236- Tisch R., Mc Devitt H. **1996**. Insulin- dependent diabetes mellitus *Cell*. **85**: 291-297.
- 239- Tomobe YI., Morizawa K., Tsuchida M., Hibino H., Nakano Y., Tanaka Y. **2000**. Dietary decosahexaenoic acid suppresses inflammation and immunoreponses in contact hypersensitivity reaction in mice. *Lipids*. **35**: 61-69.
- 240- Townsend S.E, Weintraub BC, Goodnow C.C. **1999**. Growing up on the streets: Why B-Cell development differs from T-Cell development? *Immunol Today*. **20 (5)**:217-220.
- 241- Triboulot C., Hichami A., Denys A., Khan NA. **2001**. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids exert antihypertensive effects by modulating calcium signalling in T cells of rats. *American Society for Nutritional Sciences*. 2364-2369.
- 243- UK perspective diabetes study (U.K.P.D.S.) group. **1999**. Intensive blood-glucose control with sulphonyl urease on insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33).*Lancet*. **352**: 837-53.
- 244- Unuaue E.R. **1984**. Antigen- presenting function of the macrophage. *Ann Rev Immunol*. **2**: 395-428.
- 245- Unuaue E.R., Allen P.M. **1987**. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*. **236**:551-557.
- 246- Verges B.L. **1999**. Dyslipidaemia in diabetes mellitus. *Diabète et métabolisme*. 25 suppl. **3** : 32-40.
- 247- Von Boehmer H., Kisilow P. **1991**. L'apprentissage du soi. *Ed. Pour la science N°170*.
- 248- Von Schaky C., Weber PC. **1985**. Metabolism and effects on patelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans. *J. Clin. Invest*. **76**: 2446-2450.
- 249- Webb, DR., Rogers, TJ. **1980**. and Nowowiejski, I. endogenous prostaglandin synthesis and the control of lymphocyte function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **332**, 662-270,

- 250- Weiner HL. **1997**. Oral tolerance: Immuno-mechanisms and the treatment of autoimmune diseases. *Immunology Today*. **18**: 335-343.
- 251- Wesley A. **1998**. Immunonutrition: The role of  $\omega$ -3 Fatty acid. *Science (Washington D.C.)* **14**: 627-633.
- 252- Wicker L.S., Leiter E.H., Todd JA., Renjilian R.J., Peterson E., Fisher P.A. **1994**.  $\beta$ 2-microglobuline – deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes*. **43**: 500-504.
- 253- Wilthehurst CE., Geppert TD. **2000**. MEK1 and the extra-cellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J Immunol*. **156**:1020-1029.
- 254- Wogensen L., Lee M., Sarvetnik N. **1994**. Production of interleukin-10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of  $\beta$  cells in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med*. **179**: 1379-1384.
- 255- Yagi H., Matsumoto M., Kunimoto K., Kawaguchi J., Makino S., Harada M. **1992**. Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur. J. Immunol*. **22**: 2387-2393.
- 256- Yamashita N., Maruyama M., Yamakazi K., Hamakazi T., Yano S. **1991**. Effect of eicosapentaenoic and decosahexaenoic acid on natural killer cell activity in human peripheral blood lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol*. **59**: 335-345.
- 257- Yang M.C., Miller N.W., Clem L.W., Buttke T.M. **1989**. Unsaturated fatty acids inhibit IL-2 production in thymus- dependent antibody responses in vitro. *Immunology*. **68(2)**: 181-167. Coopan, R. (1985) Infection and diabetes. In: A. Marble (Ed.). *Joslin's Diabetes mellitus*, 12<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, pp. 737-747.
- 258- Yaqoob P., Calder PC. **1995**. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell. Immunol*. **163**: 120-128.
- 259- Yaqoob P., Newsholme E.A., Calder P.C. **1995**. Influence of cell culture conditions on diet induced changes in lymphocyte fatty acid composition. *Biochem Biophys Acta*. **1255(3)**: 333-340.
- 260- Yki Jarvinen. **1995**. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia*. **38**: 135-138.
- 261- Yoshino S., Elis EF. 1987. Effect of a fish oil supplemented diet on inflammation and immunological process in rats. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol*. **84**:233-240..
- 262- Yokoyama W.M. **1998**. Natural Killer receptors. *Curr Opin Immunol*. **10**: 298-305.

- 263- Yoon J.W. **1995**. A new look at viruses in type I diabetes (Invited Review). *Diabetes Metab Rev.* **11**: 83-107.
- 264- Yoon J.W. **1996**. The role of viruses in the pathogenesis of IDDM. In: Taylor SL. ed. *Diabetes mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. Philadelphia: JB Lippincott. 338-348.
- 265- Yoon J.W., Jun H.S., Santamaria P. **1997**. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of  $\beta$  cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*. Vol. **27**: 109-122.
- 266- Yoon J.W., Jun H.S., Utsugi T. **1995**. Initiation of autoimmune Type I diabetes and its possible prevention. In: Baba S., Kaneko T., eds. *Diabetes*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers. 116-126.
- 267- Yoon J.W., Park Y.H., Santamaria P. **1995**. Autoimmunity of insulin-dependent diabetes. IN: Flatt PR., Ioannides C., eds. *Drugs, diet and disease. Mechanistic approaches to diabetes*. London: Ellis Howard of Simon and Schuster International Group. Vol **2**: 57-97.
- 268- Yoon J., Yoon C., Lim H., Huang Q., Kang Y., Pyun K., Hirasawa K., Shewin R., Jun H. **1999**. Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science*. **284**: 1 183-1 187.
- 269- Yosefy C., Viskoper JR., Varon D., Illan Z., Pilpel D., Lugassy G., Schneider R., Savyon N., Adan Y., Raz A. **1996**. Repeated fasting and refeeding with 20:5n-3 eicosapentaenoic acid (EPA): a novel approach for rapid fatty acid exchange and its effects on blood pressure, plasma lipids and homeostasis. *J.Hum Hypertens*. **10**: S135-S139.
- 270- Ziegler A.G., Erhard J., Lampeter E.F., Nagelkerken L.M., Standl E. **1992**. Involvement of dendritic cells in early insulinitis of BB rats. *J Autoimmun*. **5**: 571-579.
- 271- Zier KS., Leo MM., Spielman RS., Baker L. **1984**. Decrease synthesis of interleukin-2 (IL-2) in insulin dependant diabetes mellitus. *Diabetes*. **33**: 552-555.
- 272- Zimmet P.Z., **1999**. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and card. *Diabetologia*. **42**: 499-518.
- 273- Zimmet PZ., LEfebre P. **1996**. The global NIDDM epidemic treating the disease and ignoring the symptom. *Diabetologia*. **39**: 1247-1248.
- 274- Zinkernagel R.M. **2000**. Immunity 2000. *Trends Immunology Today*. 422 Vol. 21. N°9.251-253.



# ANNEXES

## QUESTIONNAIRE

Code : .....

Nom : ..... Prénom : ..... Sexe :

Age : ..... Poids : ..... Taille :  
..... (IMC.....)

Adresse : ..... Tel : .....  
Habitat       Villa               Appartement               Maison collective

Situation de famille       Marié(e)       Divorcé(e)       Veuf (ve)       Célibataire  
Nombre d'enfants : .....

Revenus ou salaire               Faible               Moyen               Elevé

Cause du diabète : .....

Type du diabète : .....

Age du diabète : .....

Traitement : ..... Depuis:.....

Niveau scolaire :       Primaire               Moyen               Secondaire       Faculté

Complications associées :       HTA               MCV               Goitre       Rétinopathie  
    Néphropathie       Etat nerveux       Ménopause

Autres : .....

Activité physique :       Intense       Moyenne       Faible       Inexistante

Stress : .....

Cigarette : .....

Alcool : .....

Antécédents familiaux : .....

Ascendants : .....

Descendants : .....

Collatéraux : .....

**Milieu RPMI 1640**

Réf.	31870 1X Liquide mg/L
<b>Composants</b>	
<b>SELS INORGANIQUES :</b>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) . 4H <sub>2</sub> O	100.00
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)	-
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	100.00
NaCl	6000.00
NaHCO <sub>3</sub>	2000.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhyd.)	800.00
<b>AUTRES COMPOSANTS :</b>	
D-Glucose	2000.00
Glutathione (réduit)	1.00
HEPES	-
Rouge de Phénol	5.00
<b>ACIDES AMINES :</b>	
L-Arginine (base libre)	200.00
L-Arginine HCl	-
L-Asparagine (base libre)	50.00
Acide L-Aspartique	20.00
L-Cystine	50.00
L-Cystine . 2HCl	-
Acide L-Glutamique	20.00
L-Glutamine	-
L-Alanyl-L-Glutamine	-
Glycyl-L-Glutamine	-
Glycine	10.00
L-Histidine (base libre)	15.00
L-Hydroxyproline	20.00
L-Isoleucine	50.00
L-Leucine	50.00
L-Lysine . HCl	40.00
L-Méthionine	15.00
L-Phénylalanine	15.00
L-Proline	20.00
L-Sérine	30.00
L-Thréonine	20.00
L-Tryptophane	5.00
L-Tyrosine	20.00
L-Tyrosine (sel disodique)	-
L-Valine	20.00
<b>VITAMINES :</b>	
D-Biotine	0.20
Pantothénate de Calcium D	0.25
Chlorure de choline	3.00
Acide folique	1.00
i-inositol	35.00
Nicotinamide	1.00
Acide Para-amino-benzoïque	1.00
Pyridoxal HCl	1.00
Riboflavine	0.20
Thiamine HCl	1.00
Vitamine B <sub>12</sub>	0.005

## FICOLL : Principe de la procédure

Actuellement il y a un besoin tel pour une méthode rapide simple et digne de confiance pour l'isolement des lymphocytes du sang entier dans des domaines scientifiques tels que les essais pour les tests d'histocompatibilité, les vérifications in vitro de l'immunité à médiation cellulaire et autres procédures exigeants des lymphocytes purs.

Le ficoll est stérile, il a la bonne densité, la bonne viscosité et la bonne pression osmotique pour une utilisation rapide. Les principes suivants sont appliqués pour les deux cas de figure : sang sans fibrinogène et sang traité avec un anticoagulant tout deux soumis à une centrifugation pendant un temps déterminé.

La migration différentielle durant la centrifugation résulte de la formation de couches contenant différents types de cellules.

La couche du bas contient les érythrocytes qui ont été agrégés par le ficoll et en l'occurrence ont sédimenté complètement à travers ce dernier

La couche immédiatement au dessus contient surtout les granulocytes qui, à la pression osmotique de la solution du ficoll atteignent une densité assez importante pour migrer à travers la couche de ce dernier

A cause de leurs petites densité, les lymphocytes sont retrouvés à l'interface entre le plasma et le ficoll avec d'autres particules à la sédimentation lente (plaquettes et monocytes)

C'est alors que les lymphocytes sont aspirés de l'interface et soumis à des lavages avec la solution saline équilibrée pour l'élimination des plaquettes, ficoll et plasma.

**Tableau III :** Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (pourcentages pondéraux) isolés des diabétiques et des témoins. (Etat initial).

Acides Gras	Témoins 1 20 – 40 ans	DID	Témoins 2 40 – 60 ans	DNID
16 : 0	31.65 ± 1.38	31.58 ± 1.63	36.12 ± 1.70	40.38 ± 1.04 <sup>*</sup>
16 : 1	05.11 ± 0.62	06.86 ± 0.78	05.04 ± 0.73	04.53 ± 0.58
18 : 0	20.06 ± 1.44	22.15 ± 1.52 <sup>^</sup>	24.66 ± 1.38	25.70 ± 1.04
18 : 1	13.89 ± 1.06	12.33 ± 0.93	11.52 ± 1.22	12.13 ± 1.01
18 : 2 n-6	09.66 ± 0.87	14.04 ± 0.45 <sup>*</sup>	08.53 ± 0.61	09.04 ± 0.81
20 : 4 n-6	13.85 ± 1.01	08.72 ± 1.11 <sup>^</sup>	09.62 ± 1.36	05.14 ± 0.80 <sup>*</sup>
20 : 5 n-3	01.99 ± 0.58	01.08 ± 0.69	01.07 ± 0.48	01.02 ± 0.33
22 : 6 n-3	02.67 ± 0.64	01.98 ± 0.77	01.56 ± 0.53	01.25 ± 0.48

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student après analyse de la variance. \*P< 0.05.

**Tableau IV :** Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (Pourcentages pondéraux) après stimulation par la concanavaleine A (Con A).

Acides Gras	Témoins 1 20 – 40 ans	DID	Témoins 2 40 – 60 ans	DNID
16 : 0	30.15 ± 1.24 <sup>+</sup>	29.63 ± 1.08	34.07 ± 1.52	38.12 ± 1.26
16 : 1	06.23 ± 0.92 <sup>+</sup>	06.55 ± 0.63	05.69 ± 0.54	05.05 ± 0.66
18 : 0	18.15 ± 1.06 <sup>+</sup>	20.36 ± 1.08 <sup>√</sup>	22.15 ± 1.11	23.06 ± 1.22
18 : 1	19.98 ± 1.13 <sup>+</sup>	19.58 ± 1.12	18.79 ± 1.20	18.17 ± 1.34
18 : 2 n-6	08.09 ± 0.75 <sup>+</sup>	11.88 ± 0.71	06.64 ± 0.83	06.98 ± 0.64
20 : 4 n-6	10.64 ± 1.12 <sup>+</sup>	06.73 ± 0.90 <sup>*</sup>	07.62 ± 1.01	04.05 ± 0.72
20 : 5 n-3	01.87 ± 0.43	01.19 ± 0.55 <sup>*</sup>	01.28 ± 0.39	01.22 ± 0.25 <sup>*</sup>
22 : 6 n-3	02.04 ± 0.71	01.89 ± 0.63	01.66 ± 0.54	01.43 ± 0.42

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P< 0.05 ; <sup>+</sup>P<0.05, incubation avec con A versus incubation basale.

**Tableau V :** Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (Pourcentages pondéraux) après incubation en présence de Con A et d' EPA à 30µM.

Acides Gras	Témoins 1 20 – 40 ans	DID	Témoins 2 40 – 60 ans	DNID
16 : 0	30.22 ± 1.67	30.11 ± 1.55	34.26 ± 1.08	38.99 ± 1.36 *
16 : 1	06.15 ± 0.73	06.79 ± 0.84	05.88 ± 0.63	05.63 ± 0.71
18 : 0	18.06 ± 1.54	19.88 ± 1.63	22.26 ± 1.07	23.55 ± 1.37
18 : 1	20.03 ± 1.82	19.87 ± 1.77	17.05 ± 1.34	15.73 ± 1.66
18 : 2 n-6	08.12 ± 0.67	11.67 ± 0.82 *	06.83 ± 0.72	07.10 ± 0.83
20 : 4 n-6	08.02 ± 0.66 +	04.58 ± 0.72 + *	05.81 ± 0.87 +	03.16 ± 0.48 + *
20 : 5 n-3	03.64 ± 0.42 +	03.22 ± 0.36 +	03.52 ± 0.42 +	03.48 ± 0.35 +
22 : 6 n-3	02.15 ± 0.52	01.73 ± 0.62	01.89 ± 0.63	01.57 ± 0.51

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P< 0.05 ; +P<0.05, incubation avec EPA versus incubation avec con A.

**Tableau VI :** Composition en acides gras des phospholipides des lymphocytes (Pourcentages pondéraux) après incubation en présence de Con A et de DHA à 30µM.

Acides Gras	Témoins 1 20 – 40 ans	DID	Témoins 2 40 – 60 ans	DNID
16 : 0	30.05 ± 1.52	30.42 ± 1.63	35.02 ± 1.08	38.67 ± 1.34 *
16 : 1	06.58 ± 0.84	06.70 ± 0.73	05.73 ± 0.46	05.24 ± 0.58
18 : 0	18.73 ± 1.45	19.88 ± 1.39	22.47 ± 1.26	22.68 ± 1.34
18 : 1	13.57 ± 1.30	19.67 ± 1.28	16.86 ± 1.33	16.51 ± 1.42
18 : 2 n-6	08.68 ± 1.05	12.06 ± 0.32 *	06.89 ± 0.72	06.55 ± 0.71
20 : 4 n-6	07.06 ± 1.04	04.08 ± 0.89 + *	05.48 ± 0.67 +	03.03 ± 0.42 + *
20 : 5 n-3	01.68 ± 0.51	01.38 ± 0.56	01.57 ± 0.40	01.52 ± 0.36
22 : 6 n-3	05.66 ± 0.89 +	04.11 ± 0.38 +	03.87 ± 0.45 +	03.06 ± 0.50 +

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P< 0.05 ; +P<0.05, incubation avec DHA versus incubation avec con A.

**Tableau VII :** Production d'interleukines 2 (IL-2) par les lymphocytes isolés des patients diabétiques et des sujets témoins. (IL-2, Pg/ml).

Différentes incubations	Témoins 1 20 – 40 ans	DID	Témoins 2 40 – 60 ans	DNID
Stimulation basale	850.55 ± 46.180	820 ± 57.14	530.55 ± 69	608.11 ± 74.26
Concanavoline A (con A)	+ 6724.2 ± 332.11	+ * 5505.25 ± 430	+ 8100 ± 578.14	+ * 6250.26 ± 311
Con A + Insuline (Ins)	6689.3 ± 543.00	* 4958 ± 398	7762.5 ± 680.32	* 6300.25 ± 308.27
Con A + EPA 30µM	+ 1829.45 ± 231.7	+ 1610.12 ± 156	+ 1214.75 ± 311	+ 1430.24 ± 267.05
Con A + DHA 30µM	+ 2240.38 ± 167.32	+ * 1975 ± 108.23	+ 1380 ± 257.07	+ 1235 ± 208.11
Con A + Ins + EPA 30µM	+ 1342.5 ± 154.00	+ 1083.15 ± 126	+ 1288.41 ± 264	+ 1195 ± 217
Con A + Ins +DHA 30µM	+ 1440.18 ± 132	+ 1360 ± 107.12	+ 1241.05 ± 158	+ 1090 ± 173.45

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student. \*P< 0.05 ; +P<0.05 entre les différentes incubations.

**Tableau VIII :** Prolifération basale ou stimulée par la con A (nombre de cellules  $\times 10^5$ /puit) en présence et en absence de l'insuline et des AGPI n-3 (EPA, DHA) à différentes concentrations ( $15\mu\text{M}$  ou  $30\mu\text{M}$ ) des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins

	Stimulation basale	Concanavoline A	Conc A + Insuline	Conc A + DHA (30)	Conc A + DHA (15)	Conc A+ EPA (30)	Conc A + EPA (15)	Conc A + Ins + DHA (30)	Conc A + Ins + DHA (15)	Conc A + Ins + EPA (30)	Conc A + Ins + EPA (15)	
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	
T 20 - 40 ans		+		+		+		+		+		+
	2.11± 0.31	20 ± 1.03	24.11±1.24	14.35±0.84	11 ± 0.67	12.04±0.79	9.04 ±0.93	13.5 ±1.11	10.5 ± 0.83	10.25±1.03	8.33 ± 0.75	
DID	*	*	+	*	+	*	+	*	+	*	+	*
	1.67± 0.42	13.35 ± 1.11	15 ± 1.08	8.83 ± 0.74	6.23 ± 0.54	6.88 ± 0.62	4.87 ± 0.76	8.54 ± 0.49	6.18 ± 0.89	5.82 ± 1.04	3.74 ± 0.48	
T 40 - 60 ans		+		+		+		+		+		+
	3.26± 0.58	24.25 ± 1.22	29.34±1.05	16.52±1.09	14.63±0.88	12.02±1.04	10.12±1.04	14.36±0.95	12.87±1.02	12.79±1.13	9.13 ± 0.54	
DNID	*	*	+	*	+	*	+	*	+	*	+	*
	1.34 ±0.62	14.7 ± 1.08	15 ± 1.12	8.15 ± 0.78	5.88 ± 0.53	6.9 ± 0.69	4.53 ± 0.75	7.87 ± 0.64	5.25 ± 0.89	5.15 ± 0.53	3.04 ± 0.47	

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student après analyse de la variance. \*P< 0.05. †P<0.05 entre les incubations



**Tableau IX :** Teneurs en protéines des lymphocytes ( $\mu\text{g/puit}$ ) après prolifération basale ou stimulée par la con A en présence ou en absence de l'insuline et des AGPI n-3 (EPA, DHA) à différentes concentrations ( $15\mu\text{M}$  ou  $30\mu\text{M}$ ) des lymphocytes chez les patients diabétiques et chez les témoins.

	Prolifération basale	Concanavaline A	Conc A + Insuline	Conc A + DHA (30)	Conc A + DHA (15)	Conc A + EPA (30)	Conc A + EPA (15)	Conc A + Ins + DHA (30)	Conc A + Ins + DHA (15)	Conc A + Ins + EPA (30)	Conc A + Ins + EPA (15)
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
T 20 - 40 ans		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100.8 $\pm$ 7.40	210 $\pm$ 6.50	260.5 $\pm$ 9.10	185 $\pm$ 7.30	130 $\pm$ 8.30	150.30 $\pm$ 5.1	100.5 $\pm$ 6.9	200 $\pm$ 6.20	160.50 $\pm$ 3.7	180 $\pm$ 8.20	130 $\pm$ 9.30
DID	*	* +	* +	* +	* +	* +	* +	* +	* +	* +	* +
	74.9 $\pm$ 5.20	150 $\pm$ 6.90	180.9 $\pm$ 8.30	120 $\pm$ 6.60	95.30 $\pm$ 7.70	118 $\pm$ 7.10	75 $\pm$ 6.40	160.70 $\pm$ 2.5	110 $\pm$ 8.20	123.4 $\pm$ 3.10	75 $\pm$ 8.50
T 40 - 60 ans		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	106.5 $\pm$ 5.6	195.30 $\pm$ 8.33	230 $\pm$ 6.5	168.2 $\pm$ 8.8	120.6 $\pm$ 4.70	153.4 $\pm$ 6.50	103.8 $\pm$ 5.40	189.3 $\pm$ 8.32	150.50 $\pm$ 7.8	165 $\pm$ 6.70	116.7 $\pm$ 5.51
DNID	*	* +	* +	* +	* +	* +	* +	* +	* +	* +	* +
	74.50 $\pm$ 6.10	121.8 $\pm$ 3.30	165.3 $\pm$ 8.11	100 $\pm$ 5	90.9 $\pm$ 5	96 $\pm$ 5	70.80 $\pm$ 4.20	142.4 $\pm$ 3.9	108.6 $\pm$ 4.60	120 $\pm$ 4.51	80.62 $\pm$ 2.64

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES. La comparaison des moyennes entre diabétiques et témoins est effectuée par le test « t » de Student après analyse de la variance. \*P< 0.05. +P<0.05 entre les incubations

Tableau X : Nomenclature des acides gras.

Nom Usuel	Nom Systématique	Abreviations
<b>SERIE n-6</b> Acide- linoléique	Acide octadéca-9, 12-diénoïque.	C 18:2 n-6 C 18:2 (9,12)
Acide- $\gamma$ linoléique	Acide octadéca-6, 9, 12-triénoïque. Acide eicosa-11, 14,- diénoïque. Acide eicosa-5,11, 14,- triénoïque.	C 18:3 n-6 C 18:3 (9,6,12) C 20:2 n-6 C 20:2 (11,14) C 20:2 (5,11,14)
Acide dihomo- $\gamma$ - linoléique	Acide eicosa-8, 11,14- triénoïque	C 20:3 n-6 C 20:3 (8,11,14)
Acide arachidonique	Acide eicosa-5, 8, 11,14- tétraénoïque	C 20:4 n-6 C 20:4 (5, 8, 11,14)
	Acide docosa-13,16- diénoïque. Acide docosa-10, 13,16- triénoïque Acide docosa-7, 10, 13,16- tétraénoïque Acide docosa-4,7, 10, 13,16- pentaénoïque	C 22:2 n-6 C 22:2 (13,16) C 22:3 n-6 C 22:3 (10, 13,16) C 22:4 n-6 C 22:4 (7, 10, 13,16) C 22:5 n-6 C 22:5 (4, 7, 10, 13,16)
<b>SERIE n-3</b> Acide $\alpha$ - Linoléique	Acide octadéca-9, 12,15- triénoïque	C 18:3 n-3 C 18:3 (9, 12,15)
	Acide octadéca-6, 9, 12, 15- tétraénoïque Acide eicosa-11, 14,17- triénoïque Acide eicosa-5, 11, 14,17- tétraénoïque Acide eicosa-8, 11, 14,17- tétraénoïque Acide eicosa-5, 8, 11, 14,17- tétraénoïque Acide docosa-13, 16,19-triénoïque Acide docosa-10, 13, 16,19- tétraénoïque Acide docosa-7, 10, 13, 16,19-pentaénoïque	C 18: 4 n-3 C 18:4 (6, 9, 12, 15) C 20 :3 n-3 C 20 :3 (11, 14,17) C 20 :4 (5, 11, 14,17) C 20 :4 n-3 C 20: 4 (8, 11, 14,17) C 20 :4 n-3 C 20: 4 (5, 8,11,14,17) C 22 :5 n-3 C 22 :5 (13, 16,19) C 22 :4 n-3 C 22 :4 (10, 13, 16,19) C 22 :5 n-3 C 22:5 (7,10,13,16,19)
Acide docosahe- -xaénoïque	Acide docosa-4,7, 10, 13, 16,19-héxaénoïque	C 22 :6 n-3 C 22 :6 (4,7, 10, 13, 16,19).