



Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès Faculté
des Sciences, de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM

THESE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} Cycle (LMD)

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biologie de la Cellule Normale et Pathologique

Intitulé

**Rôle des lipoprotéines de haute densité dans l'inhibition
des interactions macrophage/lymphocyte T CD4+ au cours
du diabète de type 1**

Présentée par :

Ibtissem BENGHALEM ep TAHRAOUI

Soutenue le : 15 /02/2018

Devant le jury composé de :

Président :	Pr. MOULESSEHOUL Soraya	UDL de Sidi Bel Abbès
Examineurs :	Dr. KLOUCHE Lynda	UDL de Sidi Bel Abbès
	Dr. SMAHI Chems-eddine Ismet	Université de Tlemcen
	Dr. HADDOUCHE Mustapha	Université de Tlemcen
Directeur de thèse :	Pr. ARIBI Mourad	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2017-2018

Résumé

Introduction : Le diabète de type 1 est une maladie inflammatoire des îlots pancréatiques. Les lymphocytes T CD4+ et les macrophages sont principalement impliqués dans la destruction auto-immune des cellules β dans le Diabète de type 1 (DT1). Bien que certains travaux aient postulé l'existence d'un effet inhibiteur du HDL sur la capacité des cellules présentatrices d'antigènes à stimuler l'activation des lymphocytes T, aucune investigation démontrant l'impact du HDL sur le DT1 n'a été menée à ce jour. **Objectif** : Le but cette étude consiste, d'une part à examiner l'effet ex vivo des lipoprotéines de haute densité (HDL) sur les activités fonctionnelles des macrophages et d'autre part à étudier leurs capacités à réguler la production des cytokines dans les co-cultures de macrophages-cellules T dans le diabète précoce de type 1.

Matériels et méthodes : L'effet du HDL a été examiné aussi bien sur des macrophages que sur des co-cultures macrophages /lymphocytes T CD4 + isolés, chez des donneurs volontaires sains et chez des diabétiques de types 1 nouvellement diagnostiqués. Certains des dosages ont été effectués sur les surnageants, d'autres sur les lysats cellulaires traités ou non avec le HDL. Les niveaux de production des cytokines, d'arginase, de l'activité fonctionnelle du macrophage et des quantités relatives des transducteurs de signal STAT4/STAT6 ont été réalisés sur des co-cultures.

Résultats: les résultats des essais ont montré que les niveaux de production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , d'IL-2, d'IFN- γ) ; ceux des paramètres du burst oxydatif (NO et H₂O₂), ceux de la phagocytose et de la destruction bactérienne ainsi que ceux de la phosphorylation de STAT4 (p-STAT4, Tyr693), ont été réduit de manière significative dans les co-cultures de macrophages/lymphocyte T CD4+ des DT1 traité avec HDL par rapport aux contrôles sains ($p < 0.01$). Les résultats ont montré en outre, que le traitement par HDL a induit une légère augmentation des taux de ifCa²⁺ dans les co-cultures de DT1 par rapport aux témoins sains malgré une différence peu significative ($p > 0,05$). Ils ont montré d'autre part que le traitement par HDL a induit une augmentation significative sur la production des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, et IL-10), sur l'activité d'arginase et sur la phosphorylation des p-STAT6 (Tyr641) dans la co-culture de cellules de DT1 et de témoins sains par rapport à celle des cellules non traitées par HDL (pour toutes les Comparaisons, ($p < 0,001$)).

Conclusions : Les résultats obtenus sont prometteurs car ils permettent de démontrer pour la première fois que le HDL peut inverser à la fois les activités fonctionnelles des macrophages et la réponse immuno-inflammatoire au début du DT1. Ces résultats précurseurs devraient ouvrir la voie à des essais thérapeutiques à court et à moyen terme.

Mots clé : HDL, diabète de type 1 humain, macrophages / lymphocytes T CD4 +, activités fonctionnelles des macrophages, cytokines pro-inflammatoire et anti-inflammatoire, p-STAT4 et p-STAT6

Abstract

Background. Both CD4⁺ T cells and macrophages are mainly involved in the autoimmune-mediated β -cells destruction in type 1 diabetes (T1D). The aim of this study was to examine the effect of HDL on functional activities of macrophage and its ability to regulate the production of cytokines in autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells at the recent-onset human type 1 diabetes.

Methods. Cell samples were isolated from volunteers with recent-onset T1D or healthy controls.

Results. The levels of the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , nitric oxide (NO), and hydrogen peroxide (H₂O₂) were significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls. Similarly, those of intracellular free calcium ions (ifCa²⁺) were slightly, but not significantly increased ($p > 0.05$). Conversely, macrophage exhibited significantly decreased levels of the relative tyrosine phosphorylation of STAT6 (p-STAT6, Tyr641) in culture of T1D cells than in that of cells from healthy controls; while those of p-STAT4 (Tyr693) were significantly increased. Likewise, the levels of IL-4 and IL-10 were significantly decreased in the co-culture of T1D cells compared to co-culture of cells from healthy controls. Additionally, HDL treatment significantly down-regulated the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , NO, H₂O₂, phagocytosis, bacterial killing, the relative tyrosine phosphorylation of macrophage-expressed STAT4 (p-STAT4, Tyr693), as well as the ratio of IL-1 β /IL-10, NO production/arginase activity, p-STAT4/p-STAT6, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, and the combined proinflammatory (PICs)/anti-inflammatory (AICs) cytokines. Moreover, HDL treatment significantly up-regulated the production of IL-4, IL-10, arginase activity, and p-STAT6 (Tyr641) (for all comparisons, $p < 0.001$).

Conclusions. We show for the first time that HDL may reverse both the functional activities of macrophages and immunoinflammatory response during reciprocal macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the beginning of T1D. These findings should open the way for therapeutic trials in the short- and medium-term.

Keywords. Autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells, HDL, Human type 1 diabetes, Macrophage functional activities, Proinflammatory and anti-inflammatory, cytokines, p-STAT4 and p-STAT6.

ملخص

مقدمة:

يعتبر مرض السكري من النمط 1 مرض التهاب البنكرياس حيث تشارك الخلايا الليمفاوية و الضامة بشكل رئيسي في تدمير المناعة الذاتية للخلايا بيتا في البنكرياس على الرغم من أن بعض الدراسات قد اثبتت وجود تأثير مثبط للكولسترول الجيد على قدرة خلايا تقديم المستضد تحفيز تنشيط الخلايا التائية الا انه لم يتم إجراء أي دراسة تبين تاثير الكولسترول الجيد على النمط 1 للسكري

الهدف:

يتمثل الهدف من هذه الدراسة من جهة دراسة تأثير الكولسترول HDL عالي الكثافة على الأنشطة الوظيفية للخلايا الضامة و من جهة اخرى تحديد قدرته على تنظيم إنتاج السيتوكينات في الخلايا البلاعم في النوع الأول من مرض السكري.

المواد والأساليب

لقد تم فحص تأثير الكولسترول الجيد على كل من الخلايا الضامة و الخلايا الليمفاوية المعزولة, و هذا عند كل من مجموعة من المتطوعين الأصحاء و مرضى السكري حديثي التشخيص.

النتائج:

أظهرت نتائج الاختبارات زيادة مستويات إنتاج (IL-1 β ، IL-2، IFN- γ) وأكسيد النيتريك و هيدروكسيد بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) بشكل ملحوظ في الثقافة المشتركة للخلايا T1D بالمقارنة مع خلايا الخلايا من الضوابط الصحية. وبالمثل، كانت تلك من أيونات الكالسيوم الحرة داخل الخلايا (IFCa2 +) قليلا، ولكن ليس زيادة كبيرة (<p 0.05) وعلى العكس من ذلك، أظهرت البلاعم انخفاضا كبيرا في مستويات الفسفرة التيروسينية النسبية ل STAT6 (p-Tyr641، STAT6) في زراعة خلايا T1D. في حين أن تلك (P-STAT4 (Tyr693) زادت بشكل ملحوظ. وبالمثل، فإن مستويات إيل-4 و إيل-10 قد انخفضت بشكل ملحوظ في الثقافة المشتركة للخلايا T1D مقارنة مع ثقافة مشتركة من الخلايا من الضوابط الصحية.

الاستنتاجات:

إن نتائج واعدة لأنها اثبت للمرة الأولى ان HDL يمكن عكس كل من الأنشطة الوظيفية للالضامة والاستجابة المناعية للالتهابات في مرض السكري المبكر من النمط 1. وينبغي لهذه النتائج السلانف تمهد الطريق لتجارب سريرية في المدى القصير والمتوسط

Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI.

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à monsieur le professeur ARIBI Mourad, mon directeur de thèse pour l'orientation et les conseils précieux qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de la préparation de ce travail. Il n'a ménagé aucun effort pour diriger et mener à bien ce travail de recherche. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements anticipés.

Je tiens à remercier tout particulièrement madame le Professeur MOULESSHOUL Soraya (Université de Sidi Bel-Abbès, Algérie) pour l'honneur qu'elle m'a fait de présider ce jury.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour leur patience et le temps qu'ils ont consenti pour examiner ce travail de thèse. Le Docteur KLOUCHE Lynda (Université de Sidi Bel-Abbès, Algérie), le Docteur SMAHI Chems-eddine Ismet. (Université de Tlemcen), et le Docteur HADDOUCHE Mustapha (Université de Tlemcen).

Je ne saurai oublier mes remerciements aux membres du Laboratoire du Pr. Mourad ARIBI et plus particulièrement: Warda MEZIANE pour sa collaboration, son soutien et son amitié, aussi Zineb HADJIDJ, Nesrine Remla, Marwa MELIANI, Sara DAHOU, Sana BOUALI-TABET, Wafa NOUARI, Zeyneb MEKKAOUI, Mouna NOUAR et Zoheir DAHMANI.

Enfin, une pensée de témoignage pour les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Je dédie cette Thèse à toutes les personnes qui me sont chères, et
tout particulièrement*

À Mes Parents !

À mon père

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma
considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon instruction et
mon bien être.*

À ma mère

!

*La plus belle créature que Dieu a créée sur terre, cette source de tendresse
d'amour et de générosité,*

*À Mon Mari Walid pour son courage sa patience et sa compréhension et
ses
encouragements*

A ma fille adorée Inès

Chiraz

Et mes frères Amine, Ilyes,

Zakî

*Ibtissem BENGHALEM
TAHRAOUI*

LISTE DES FIGURES

Figure1.1. La balance Th1 / Th2	10
Figure1.2. Origine et différenciation des monocytes/ macrophages	12
Figure1.3. polarisation des macrophages M1/M2	14
Figure1.4. Le métabolisme de l'arginine via NOS	18
Figure1.5. Régulation de l'arginine dépendante de l'activation des macrophages	20
Figure1.6. Résumé schématique des signaux d'activation intracellulaire des lymphocytes T CD4+	21
Figure1.7. JAK et STAT	24
Figure1.8. Structure d'une lipoprotéine	29
Figure1.9. Densité des HDL	31
Figure.1.10. Radeau lipidique	32
Figure.1.11. HDL et radeaux lipidiques	33
Figure1.12. Les effets du HDL et apoA-I sur les fonctions des cellules immunitaire	35
Figure1.13. Conception de l'étude	37
Figure2.1. Effet du HDL sur la production d'IL-1 β dans le système de co-culture des macrophages/lymphocytes T CD4 + chez les diabétiques de type1.	50
Figure2.2. Effet du HDL sur la production d'IL-2 dans le système de co-culture des macrophages/lymphocytes T CD4 +chez les diabétiques de type1.	51
Figure2.3. Effet du HDL sur la production de cytokines anti-inflammatoires/ Régulatrices IL-10 dans le système de co-culture des macrophages /lymphocytes TCD4+ chez les diabétiques de type1	52
Figure2.4. Effet du HDL sur la production de cytokines liées au Th1 et Th2 dans le système de co-culture des macrophages/ lymphocytes T CD4 + chez les diabétiques.	53
Figure2.5. Effet du HDL sur les ions de calcium intracellulaires libres dans le système de co-culture des macrophages T1D humains et des lymphocytes T CD4 +.	54

Figure2.6. Effet du HDL sur l'activité de l'arginase dans le système de co-culture des macrophages T1D humains et des lymphocytes T CD4 +.	55
Figure2.7. Effet du HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages dans le système de co-culture des macrophages/ lymphocyte T CD4+ chez les diabétiques de type 1.	57
Figure2.8. Effet du HDL sur la phosphorylation STAT4 et STAT6 dans les macrophages stimulés par les cytokines respectives Th1 et Th2	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Classification des STATs	23
Tableau 1.2. Classification des lipoprotéines	30
Tableau 1.3. Classification des HDL	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Apo-A: Apo lipoprotéines A.
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité.
CPA: cellule présentatrice d'antigène.
CD: classe de différenciation.
DT1: diabète de type 1.
DBD: DNA binding Domain.
D.O: densité optique.
EDTA: éthylène diamine tétra acétique acide.
GSPX: selenoperoxydase de glutathionne.
GAD 65: acide glutamique.
HRP: horseradish peroxidase.
HDL: high density lipoproteins.
IL-4 : interleukine 4.
IL-1 β : interleukine 1 beta.
IFN- γ : interféron gamma.
IL-10 : interleukine 10.
IL-2 : interleukine 2.
Ig E : immunoglobuline E.
Ig G1 : immunoglobuline G 1.
IA-2 : phosphatase.
Jak : Janus kinase.
LCTA : acyl transférase de lécithine/cholestérol.
LTCD4+ : lymphocytes T CD4+.
LTCD8+ : lymphocytes T CD8+.
LTC : Lymphocyte T cytotoxique.
Micro RNs: micro ribonucleic acid.
M1: macrophage 1 pro inflammatoire .
M2: macrophage 2 anti inflammatoire.

MDM: macrophage derived monocyte.

NFκB: nuclear factor kappa B.

PGA: prostaglandine synthétase.

PGE: prostaglandine.

PRR: patterns recognition receptor.

PAMPs: pathogen associated molecular patterns.

PBS: phosphate buffered saline.

PBMC: peripheral blood mononuclear cells.

PHA: polyhydroxyalkanoates.

PON1: paraoxanase.

RPMI: Roswell park memorial institute medium.

SH2: Src homology 2.

STATs: signal transducer and activator of transcription.

STAT 4: signal transducer and activator of transcription 4.

STAT 6: signal transducer and activator of transcription 6.

Src 2: steroid receptor co activator-2.

SAA: amyloïde A sérum.

SVF : sérum de veau foetal

Tpm: tour par minute.

TLR: toll like receptor.

TCR: T cells receptor .

γC: chaine commune gamma.

TABLE DES MATIÈRES

Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos.....	vi
Résumé	iii
Abstract.....	iv
Résumé en Arabe.....	v
Avant-propos	vi
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction.....	1
Chapitre 1. Revue de la littérature.....	4
1.1. Diabète de type1	5
1.1.1. Définition.....	5
1.1.2. Epidémiologie.....	5
1.1.3. Immunopathogénie du diabète de type 1.....	6
1.1.4. Déroulement de la réaction auto-immune.....	7
1.1.5. Balance TH1/TH2 et diabète de type 1.....	9
1.2. Macrophage	10
1.2.1 Origine et localisation des macrophages.....	11
1.2.2. Le paradigme M1/M2.....	12
1.2.2.1. Macrophages classiquement actifs (M1).....	13
1.2.2.2 Macrophages alternativement activés (M2)	14
1.2.3. Macrophage et diabète de type 1.....	15
1.2.4. Rôles du macrophage.....	
1.2.4.1. Macrophages et immunité innée.....	15
1.2.4.2. Macrophage et phagocytose	16
1.2.5. Conséquences d'activation du macrophage.....	16
1.2.5.1. Les radicaux libres	17
1.2.5.1.2. Peroxyde d'hydrogène	18
1.2.6.1.3. Activation de l'arginase	19
1.2.7. Balance arginase/iNOS	19
1.2.8. Macrophage et apprêtage de l'antigène aux cellules T	20
1.2.5.1.2. Peroxyde d'hydrogène	18
1.2.6.1.3. Activation de l'arginase	19
1.2.7. Balance arginase/iNOS	19
1.2.8. Macrophage et apprêtage de l'antigène aux cellules T.....	20
1.3. Cytokines	22
1.4. Les STAT	23

1.4.1. Les fonctions biologiques des STAT	24
1.4.1.1. Fonction dans la signalisation des cytokines.....	24
1.4.2. STAT4.....	25
1.4.3. STAT 6.....	25
1.5. Lymphocyte T.....	26
1.5.1. Activation des CD4+	27
1.5.2. Rôle des lymphocytes T CD4+ dans la pathogenèse du DT1.....	27
1.6. Lipides, lipoprotéines	27
1.6.1. Lipides.....	27
1.6.1.1. Définition.....	28
1.6.1.2. Fonctions des lipides.....	28
1.6.2. Lipoprotéines	28
1.6.2.1. Définition.....	28
1.6.2.2. Structures des lipoprotéines	28
1.6.2.3. Classification des lipoprotéines	29
1.6.2.3.1. Les lipoprotéines de haute densité (HDL)	30
1.6.2.3.2. Sous-fractions de HDL	31
1.6.2.4. Les radeaux lipidiques	32
1.6.2.5. HDL et immunité cellulaire.....	33
1.6.2.6. Fonction des HDL.....	34
1.7. Problématique et objectifs.....	36
1.7.1. Problématique.....	36
1.7.2. Objectifs.....	36
1.7.3. But.....	36
Chapitre 2. L'effet du HDL sur l'inhibition des contacts macrophage/ lymphocyte T au cours du développement du diabète de type 1 nouvellement diagnostiqué	38
2.1. Matériels et méthodes	40
2.1.1. Conception de l'étude.....	40
2.1.2. Préparation des PBMC humaines.....	40
2.1.3. Isolation des macrophages dérivés de monocytes.....	41
2.1.4. Isolation des cellules T CD4 +.....	41
2.1.5. Isolation du HDL	42
2.1.6. Co-culture de macrophages/ Cellules T CD4 + et traitement par HDL.....	42
2.1.7. La lyse cellulaire.....	43
2.1.8. Effet du HDL sur le burst oxydatif	43
2.1.8.1 Dosage du monoxyde d'azote.....	43
2.1.8.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène	43
2.1.9. Dosage du calcium intracellulaire $_{i}Ca^{2+}$	44
2.1.10. Souche bactérienne utilisées : <i>Staphylococcus aureus</i>	44
2.1.11. Effet du HDL sur la phagocytose.....	44
2.1.12. Effet du HDL sur la capacité bactéricide.....	45

2.1.13. Effet du HDL sur l'activité arginase	46
2.1.14. Effet du HDL sur les cytokines.....	46
2.1.15. Effet des HDL sur STAT4/STAT6	47
2.1.16. Analyse statistique des données	48
2.2. Résultats	49
2.2.1. Effet du HDL sur la production d'IL-1 β	49
2.2.2. Effet du HDL sur la production de l'IL-2.....	50
2.2.3. Effet du HDL sur la production de cytokines anti-inflammatoires/ régulatrices/IL-10.....	51
2.2.4. Effet du HDL sur la production de cytokines liées à Th1 et Th2	52
2.2.5. Effet du HDL sur les ions de calcium libres intracellulaires Ca^{2+}	53
2.2.6. Effet du HDL sur l'activité arginase.....	54
2.2.7. Effet du HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages.....	55
2.2.8. Effet du HDL sur la phosphorylation STAT4 et STAT6 dans	57
les macrophages stimulés par les cytokines respectives Th1 et Th2	
2.3. Discussion	59
2.3.1. Effet du HDL sur la production d'IL-1 β	60
2.3.2. Effet du HDL sur la production d'IL-2.....	60
2.3.3. Effet du HDL sur la production de la cytokine régulatrice / anti-inflammatoire l'IL-10.....	60
2.3.4. Effet du HDL sur la production de cytokines liées à Th1 et Th2	62
2.3.5. Effet du HDL sur les ions de calcium libres intracellulaires	63
2.3.6. Effet du HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages.....	63
2.3.7. Effet du HDL sur l'activité arginase	64
2.3.8. L'effet du HDL sur la phosphorylation STAT4 et STAT6 dans les macrophages stimulés par les cytokines respectives Th1 et Th2	64
2.4. Conclusion.....	65
Chapitre 3 Conclusions et perspectives	66
Chapitre 4 Bibliographie	70
Annexe	

Introduction :

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune caractérisée par l'autodestruction des cellules bêta des îlots de Langerhans produisant de l'insuline, affectant ainsi le contrôle de la glycémie (van Belle et al., 2011; Li et al., 2014). Le DT1 est causé par une perte d'auto-tolérance et peut être initié par la libération d'auto antigènes dans les cellules des îlots pancréatiques (Roep and Peakman, 2012). De nombreuses cellules sont impliquées dans la destruction des cellules β : les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules T (Yagi et al., 1992).

Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont cruciales dans le développement du DT1 (Hutchings and Cooke, 1990; Yagi et al., 1992) 4.5. Il a été rapporté que les cellules T auto réactives se différencient en effecteurs, en engageant des antigènes de cellules β sur les cellules présentatrices d'antigène local (CPA) (Long et al., 2012). A cet effet plusieurs mécanismes ont été invoqués pour élucider la destruction des cellules, comment les cellules β sont détruites. Les cellules T en particulier les lymphocytes T CD4 +, jouent un rôle central essentiel dans le développement du DT1 (Graham et al., 2012). Les lymphocytes T CD4 + naïfs sont activés après interaction avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimés par les CPA professionnelles et se différencient en sous-types T helper 1 (Th1) ou Th2 selon l'environnement des cytokines exogènes (Steinman, 2007). Le DT1 est caractérisé par un déséquilibre de la balance TH1/TH2. Diverses recherches ont montré que les cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'interleukine 1 β (IL-1 β) (Aribi et al., 2007) et l'IFN- γ , sécrétées par les lymphocytes T CD4 + (Th1), sont surproduites au début de la réponse auto-immune, ce qui conduit au glissement vers le phénotype Th1 (Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 2007; Rachmiel et al., 2006). Par ailleurs, bien que le DT1 soit considéré comme une maladie médiée par les lymphocytes T, les cellules immunitaires innées, y compris les macrophages, sont fortement impliquées dans l'induction de la maladie.

Les macrophages sont des cellules phagocytaires professionnelles et peuvent interagir comme CPA professionnels avec des lymphocytes T auxiliaires CD4 + via les molécules de CMH de Classe II (Twigg, 2004). Les macrophages sont

connus pour être les principaux contributeurs à la création de l'environnement immunitaire pour le développement et l'activation des cellules T cytotoxiques qui détruisent les cellules β pancréatiques (Yoon and Jun, 2005). Ils peuvent ainsi activer les lymphocytes T CD4 + et favoriser ensuite leur production d'IL-2 et d'IFN- γ , ce qui peut aider à l'activation maximale des cellules T CD8 +. De plus, le mécanisme de destruction des cellules β par les macrophages pourrait également être médié par la libération d'espèces réactives d'oxygène et d'azote (ROS et RNS) (Baek and Yoon, 1991; Lee et al., 2009).

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont des complexes de protéines et de lipides sécrétés au niveau du foie. Ces molécules sont connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anti-athérogènes (Feingold and Grunfeld, 2000). Il a été montré que les HDL peuvent avoir un effet pléiotropique au cours des maladies auto-immunes sur différents type cellulaires (Parra et al., 2015). De récents résultats ont montré que les HDL peuvent inhiber la présentation des antigènes aux cellules T en réduisant le taux des radeaux lipidiques (Gruaz et al., 2010). Ils peuvent influencer l'action des macrophages et des lymphocytes T en modulant le taux de cholestérol dans les radeaux lipidiques par l'ApoA-I, ce qui bloquerait l'expression des molécules du CMH de classe II et empêchera la différenciation des macrophages, provoquant ainsi l'inactivation des lymphocytes T CD4 + (Parra et al., 2015). D'autres études ont démontré que les HDL et l'apoA-I inhibent la capacité des macrophages à présenter les antigènes, et la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T (Tiniakou et al., 2015).

Ainsi, ce projet de Thèse de Doctorat a pour objectif d'étudier l'effet ex vivo des molécules de HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages et sur la modulation de la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires dans le système de co-culture de macrophages et de cellules T CD4 + au cours du processus du diabète de type 1.

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1.1. Diabète de type 1

1.2. Macrophages

1.3. Cytokines

1.4. Les STAT

1.5. Lymphocytes

1.6. Lipoprotéines de haute densité (high density lipoprotein, HDL)

1.7. Problématique et objectifs

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1.1. Diabète de type 1

1.1.1. Définition

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune complexe qui est inopinément provoquée par la destruction des cellules β pancréatiques produisant de l'insuline par les cellules T auto réactives (Richardson et al., 2014). C'est une affection métabolique, caractérisée par une hyperglycémie (taux de sucre dans le sang trop élevé) liée à une déficience, soit de la sécrétion, soit de l'action de l'insuline, ou des deux (Imagawa et al., 2000). L'insuline est une hormone produite par le pancréas indispensable à la pénétration du glucose sanguin dans les cellules. Lorsqu'elle fait défaut, le taux de sucre augmente dans le sang, or l'organisme est très sensible à ces variations : la chronicité de l'hyperglycémie est responsable de complications à long terme touchant de nombreux organes notamment les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux (Genuth et al., 2003).

Le développement de la pathologie a impliqué plusieurs types cellulaires à la fois du système immunitaire inné et adaptatif. Cette maladie est sous le contrôle de plusieurs loci génétiques de susceptibilité mais elle est également influencée par des facteurs environnementaux tels que des agents infectieux (Onengut-Gumuscu and Concannon, 2005). Des études sur des modèles animaux, comme la souris diabétique non obèse (NOD), révèlent que pendant le développement du DT1, des interactions multiples se produisent entre les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les cellules killer naturelles (NK), les cellules NKT et les lymphocytes (Graham et al., 2012). En conséquence, les diverses composantes du système immunitaire peuvent présenter un intérêt particulier en tant que cibles thérapeutiques pour la prévention ou la guérison des maladies.

1.1.2. Epidémiologie

Le diabète de type 1 représente environ 10 % des cas de diabètes dans le monde. La

moitié des cas se déclare avant l'âge de 20 ans. Actuellement en Algérie, la prévalence du diabète de type 1 est estimée à 6,63 %. Selon les registres nationaux du DT1, ce chiffre varie d'un pays à l'autre. En 2011, elle était de 26/100000 et de 22,8/100000 enfants à Oran et à Alger, respectivement. Au niveau de la région de Tlemcen, une prévalence du DT1 était estimée à 3.7 % (Zaoui et *al.*, 2007). La prévalence de la maladie ne cesse d'augmenter, au rythme de 3 à 4 % par an depuis une vingtaine d'années. En outre, son apparition est de plus en plus précoce, avec une augmentation importante de la prévalence chez les enfants de moins de 5 ans.

1.1.3. Immunopathogénie du diabète de type 1 :

La présence d'une insulino résistance suite à la détection des auto anticorps et de lymphocytes T auto réactifs activés, contre des antigènes exprimés par les cellules β ; et la survenue de la maladie chez des sujets exprimant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), font du diabète de type 1 une maladie auto-immune (Kawasaki, 2014).

L'apparition du diabète de type 1 serait liée à l'association de gènes de prédisposition, de facteurs environnementaux et de facteurs immunologiques.

a) Prédisposition génétique

La prédisposition génétique (familiale) est déterminée par la principale région génomique du complexe majeur d'histocompatibilité qui code pour les HLA de classe II (Human Leucocyte Antigene), il joue un rôle important dans la régulation immunitaire. Cette glycoprotéine est localisée sur le bras court du chromosome 6. Plus de 90% des diabétiques de type 1 sont HLA DR3 et/ou DR4 alors que la fréquence de ces HLA est d'environ 50% dans la population générale. Le fait que le risque soit plus élevé avec la combinaison DR3/DR4 est moindre avec la combinaison DR3/DR3 ou DR4/DR4 qui suggère que la susceptibilité est le résultat d'au moins 2 facteurs et non pas d'un seul.

b) Processus immunologique

L'examen histologique du pancréas endocrine au moment de l'éclosion clinique d'un diabète de type 1 montre au sein des îlots de Langerhans une réduction drastique des cellules β ainsi qu'un infiltrat de cellules mononuclées, constitués des lymphocytes T (CD4+ et surtout CD8+), de macrophage et de lymphocytes B. cette inflammation appelée « insulite » correspond à la réaction auto-immune dirigée contre certains antigènes exprimés entre autre par les cellules β des îlots.

c) Facteurs environnementaux

Plusieurs intervenants potentiels ont été suspectés :

- Les virus : Depuis longtemps, les agents infectieux ont été incriminés dans le déclenchement ou le déroulement de la réponse auto-immune conduisant au DT1, en particulier les virus (Dubois-Laforgue, 2007). Des modèles expérimentaux démontrent qu'un diabète de type 1 peut être induit chez l'animal par une infection virale. Le cytomégalo virus, le virus de la rubéole et le virus d'Epstein Barr ont été répertoriés chez l'homme (Jaeckel et al., 2002).
- Facteurs nutritionnels : Des études scandinaves ont montré une relation inverse entre l'incidence du diabète de type 1 et la durée de l'allaitement maternel. Aussi il a été montré que des enfants nourris au lait de vache sont plus susceptibles à développer un DT1, notamment chez les enfants porteurs des haplotypes HLA DR3/DR4 de susceptibilité au DT1, que ceux nourris au lait maternel (Virtanen et al., 2000). D'autre part les nitrates présents dans l'eau de consommation (Muntoni et al., 2006), et le gluten (Fuchtenbusch et al., 2004), sont également soupçonnés de favoriser le développement du DT1.

1.1.4. Déroulement de la réaction auto-immune

Le diabète de type 1 est dû à une destruction auto-immune des cellules insulino-sécrétrices dites cellules β . L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20% de cellules β fonctionnelles. Le processus auto-immun responsable d'une « insulite » pancréatique se déroule sur de nombreuses années (5 à 10 ans voire plus, avant l'apparition du diabète). (Karlsson et al., 2000). La destruction de la cellule β est essentiellement due à une infiltration des îlots par des lymphocytes T helper CD4+ et des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (Mauvais et al., 2016). Au cours de cette réaction sont produits des auto-anticorps dirigés contre certains antigènes pancréatiques. Ces auto-anticorps n'ont pas en eux-mêmes de rôle pathogène mais sont des marqueurs fiables du déroulement du processus auto-immun pathologique.

Ces anticorps sont essentiellement au nombre de 4 :

- **Les auto-anticorps anti-cellulaires des îlots (islet cell antibody : ICA)** : ces auto-anticorps sont présents chez 80 % des patients nouvellement diagnostiqués pour un DT1 (Gilliam et al., 2004).
- **Les anticorps anti-GAD** (glutamate acide décarboxylase) : ces anticorps sont dirigés contre une enzyme ubiquitaire mais qui est exprimée au niveau pancréatique. Leur présence traduit l'existence d'un processus auto-immun dirigé

contre les cellules β du pancréas. Cependant, ces auto-anticorps ne sont pas vraiment spécifiques du DT1, et peuvent être détectés chez des patients atteints d'un diabète de type 2 (DT2) (Hagopian et al., 1993), mais également dans d'autres maladies auto-immunes (Davenport et al., 1998)..

- **Les auto-anticorps anti-insuline** : sont retrouvés en forte concentration chez l'enfant essentiellement dans la phase pré-diabétique.
- **L'auto-anticorps anti-tyrosine phosphatase (anti-IA2)** : c'est un anticorps dirigé contre une phosphatase membranaire des cellules β (Korhonen et al., 2002)
- **Auto-anticorps anti-transporteur 8 du Zinc (ZnT8)** : Un nouveau marqueur du DT1 a été mis en évidence; le transporteur de zinc spécifique des cellules β humaines (ZnT8). Ce dernier est exprimé par les îlots pancréatiques. En effet, des auto-anticorps anti-ZnT8 ont été détectés chez des patients diabétiques type 1 nouvellement diagnostiqués (Yang et al., 2010).

1.1.5. Balance TH1/TH2 et diabète de type 1

Plusieurs travaux ont démontré l'implication de cytokines dans le développement du diabète de type 1. Ces études ont essentiellement portées sur des analyses de corrélation entre l'expression des cytokines dans les îlots en relation avec le développement de la maladie (Cherwinski et al., 1987).

Les fonctions des cellules Th1 et Th2 sont associées à la nature des cytokines qu'elles sécrètent. Ainsi, les cellules Th1 activent l'immunité cellulaire (réponses cytotoxiques et inflammatoires médiées par les cellules T et les macrophages). Les cellules Th2 activent l'immunité humorale (production d'anticorps par les lymphocytes β) (Kidd, 2003) (Fig1.1.).

Un déséquilibre de la balance Th1/Th2 dû à un dysfonctionnement immunitaire, provoqué par différents facteurs physiques et chimiques (Thorvaldson et al., 2005), est souvent lié au déclenchement de plusieurs pathologies.

Les premiers modèles de la différenciation des lymphocytes T CD4+, ont été basés sur une dichotomie simple, entre l'IFN γ dominée dans la réponse TH1 et l'IL-4 dominée dans la réponse dite TH2 (Vaseghi and Jadali, 2016).

Le diabète auto-immun semble tomber dans le biais TH1. De nombreuses études ont

mis en évidence un rôle direct de la cytokine IFN- γ considérée comme signature des lymphocytes TH1, dans la conduite du processus du DT1 (Ysmaïl-Dahlouk et al., 2016). L'expression d'IFN γ sous le contrôle du promoteur de l'insuline humaine s'est avéré être suffisante pour provoquer le développement du diabète chez la souris (Ablamunits et al., 1998) et inversement le blocage d'IFN γ chez la souris NOD pourrait prévenir le diabète (Debray-sacks M et al., 1991). Une recherche fructueuse a mis en évidence l'implication de la voie de signalisation de l'IFN γ dans la mort des cellules β ; l'événement destructeur critique au cours du diabète auto-immun (Suarez-Pinzon et al., 1999).

De ce fait, la modulation des réponses Th, en régulant particulièrement les cytokines Th1 et en favorisant le développement des cellules Th2, constitue un point clé dans la modulation de la réponse auto-immune au cours du DT1.

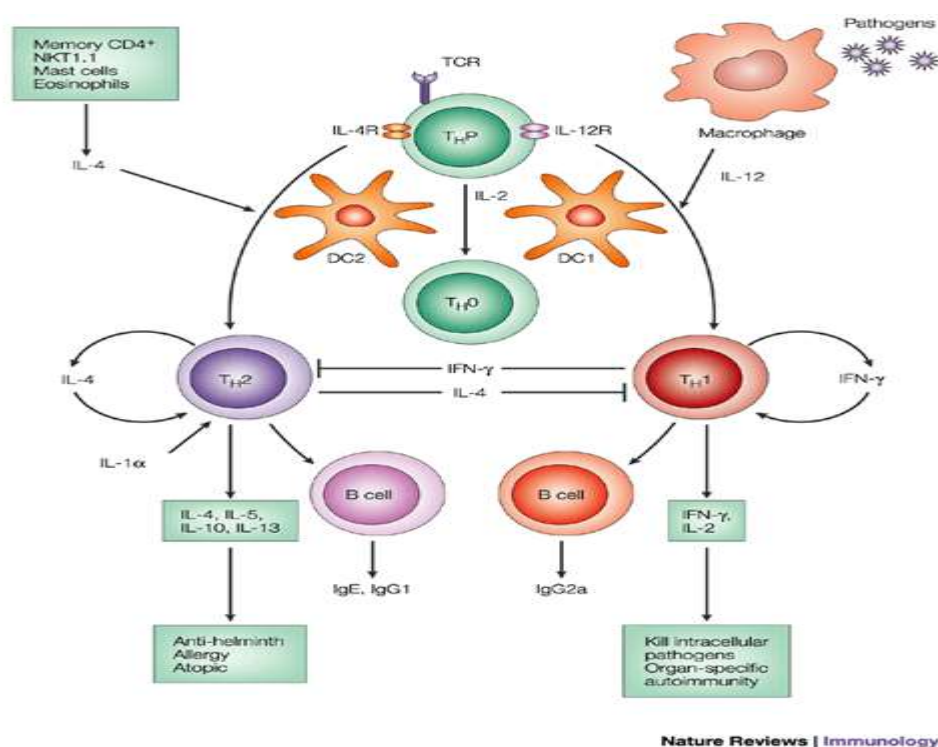


Figure 1.1. La balance Th1 / Th2 (Liew, 2002). La même cellule TH-précurseur (THP) peut se différencier en cellules T-helper TH1, TH2 ou TH0 en fonction du micro-environnement de cytokines exogène ou de cellules dendritiques (DC1 ou DC2). L'interleukine (IL) -12 active les cellules TH1, alors que l'IL-4 favorise les cellules TH2. Les cellules TH0 se différencient en conditions neutres avec IL-2 facultative. L'interféron-gamma (IFN-gamma) et l'IL-4, produits par TH1 et TH2, respectivement, peuvent également agir comme des facteurs de croissance autocrine ainsi que des facteurs inhibiteurs pour le sous-ensemble opposé. TH1 améliore la synthèse d'IgG2a par les cellules B par l'intermédiaire de l'IFN-gamma, alors que le TH2 induit la production d'IgE et d'IgG1 aux cellules B par IL-4. Les cellules TH1 médient la destruction des agents pathogènes intracellulaires et l'auto-immunité organique spécifique par activation de cellules cibles par IFN-gamma. Les cellules TH2 augmentent la réaction allergique par IL-4, IL-5 et IgE. IL-4R, récepteur IL-4; NKT, cellule T tueuse naturelle; TCR, récepteur de cellules T.

1.2. Macrophage

Les macrophages et leurs précurseurs, les monocytes sont les «grands mangeurs» du système immunitaire. Ces cellules résident dans tous les tissus du corps, sous diverses formes où elles englobent les cellules apoptotiques et les agents pathogènes, elles produisent des molécules effectrices immunes (Gordon and Taylor, 2005). Lors d'un endommagement tissulaire ou d'une infection, les monocytes sont rapidement recrutés dans le tissu, où ils se différencient en macrophages tissulaires. Les macrophages sont remarquablement plastiques et peuvent modifier leur phénotype fonctionnel en fonction des signaux environnementaux qu'ils reçoivent. Grâce à leur capacité à éliminer les agents pathogènes et à instruire d'autres cellules immunitaires, ces cellules jouent un rôle central dans la protection de l'hôte, mais contribuent également à la pathogenèse des maladies inflammatoires et dégénératives (Yang et al., 2014).

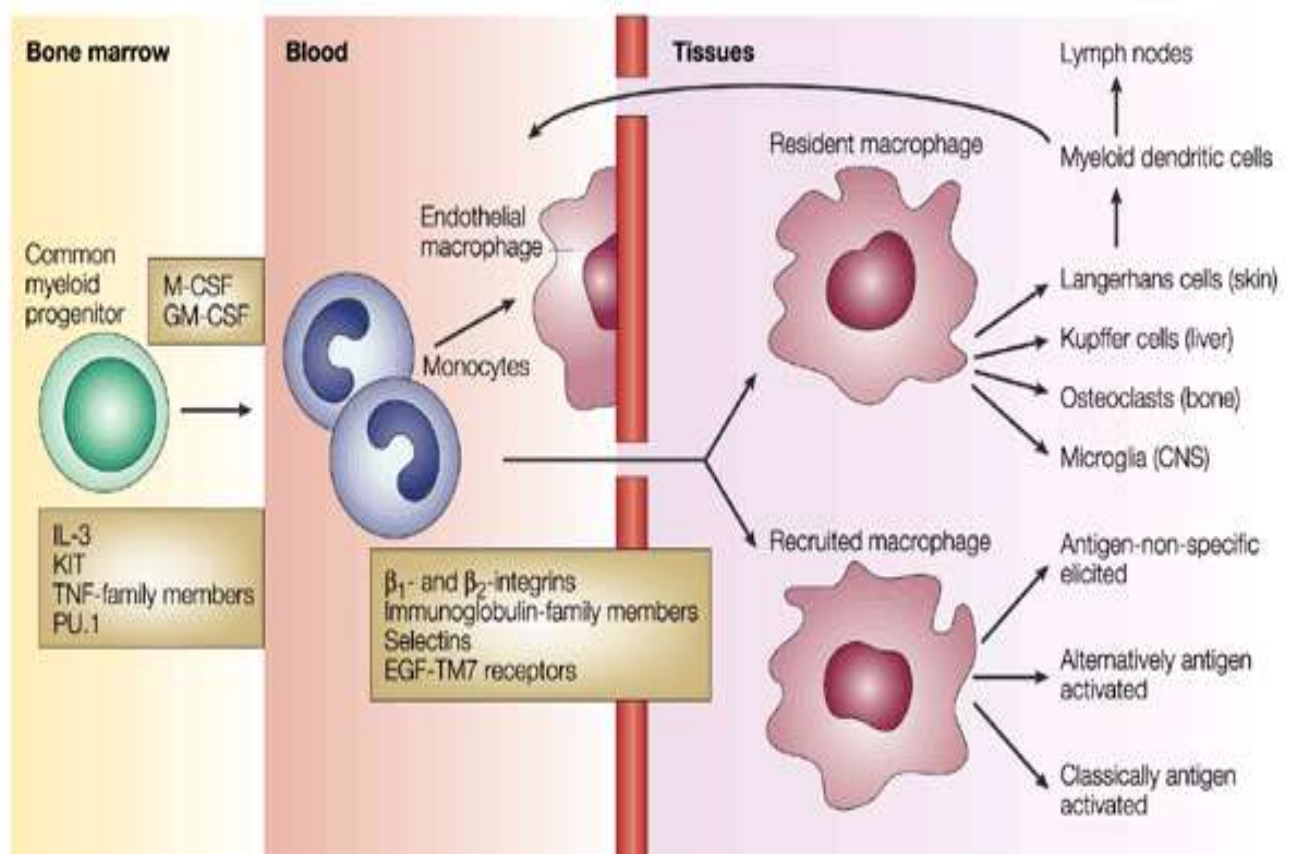
1.2.1 Origine et localisation des macrophages

Dans la moelle osseuse, la cellule souche hématopoïétique se différencie en deux lignées : la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. La lignée myéloïde donne plusieurs précurseurs parmi eux celui des monocytes. En réponse à des facteurs de croissance M-CSF, ce précurseur se divise et se différencie en monoblastes puis pro-monocytes avant de devenir des monocytes, qui sortent de la moelle osseuse et entrent dans la circulation sanguine (Mosser and Edwards, 2008). Les monocytes matures ne restent dans le sang que deux à trois jours ; ils migrent vers les tissus où ils acquièrent des caractéristiques morphologiques, cytochimiques et fonctionnelles pour constituer les macrophages spécifiques de chaque tissu avec une durée de vie plus longue (Gordon and Taylor, 2005).

Les macrophages sont présents en grand nombre particulièrement dans les tissus conjonctifs associés au tractus gastro-intestinal, dans les poumons (où ils se retrouvent

à la fois dans le tissu interstitiel et les alvéoles), le long de certains vaisseaux sanguins du foie (où ils sont connus sous le terme de cellules de Kupffer), et dispersés dans la rate, où ils éliminent les cellules sanguines vieilles (Sica et al., 2014)

Les macrophages constituent une partie du système de phagocytes mononucléaires, et sont importants dans de nombreuses maladies avec une composante inflammatoire, telle qu'une infection, le diabète de type I et le cancer (Labonte et al., 2014) (Fig1.2.).



Nature Reviews | Immunology

Figure 1.2. Origine et différenciation des monocytes/ macrophages .Les phagocytes mononucléaires proviennent de précurseurs dans la moelle osseuse. Le stade sanguin circulant est le monocyte. Dans les tissus, ces cellules deviennent des macrophages ; ils peuvent être activés par des microbes et peuvent se différencier en formes spécialisées qui résident dans différents tissus.SNC, système nerveux central.

1.2.2. Le paradigme M1/M2

Au cours des dernières années, le concept de polarisation des macrophages a été largement appliqué, à la fois aux macrophages tissulaires et aux macrophages dérivés des monocytes, en extrapolant largement les résultats obtenus in vitro à la situation in vivo. Le concept comprend deux préceptes: d'abord, il existe un spectre

bidimensionnel comprenant tous les états d'activation des macrophages; ensuite que les terminus de ce spectre peuvent être utilement modélisés par des macrophages inflammatoires (appelés M1 ou classiquement activés) à une extrémité et des macrophages réparateurs (appelés M2 ou alternativement activés) à l'autre. Ce concept a récemment été examiné et réévalué (Martinez and Gordon, 2014), ce paradigme a commencé par des résultats classiques selon lesquels la résistance à l'infection était associée à l'activation des macrophages (Mackaness, 1962). Les rapports séminaires (Nathan et al., 1983; Stein et al., 1992), montrent que l'interféron- γ (IFN γ) et l'IL-4 ont suscité différentes réactions des macrophages in vitro. Dans le même temps, deux sous-ensembles différents de la cellule T helper (TH), produisant IFN γ et IL-4, respectivement, ont montré qu'ils orchestrent les réponses à différentes catégories d'agents pathogènes infectieux (Cherwinski et al., 1987) (Fig.1.3.).

1.2.2.1. Macrophages classiquement actives (M1)

Le terme classiquement activé a été utilisé pour désigner les macrophages effecteurs qui sont produits au cours des réponses immunitaires à médiation cellulaire. La caractérisation initiale des macrophages classiquement activés est la combinaison des deux signaux l'interféron (IFN- γ) et LPS (Jablonski et al., 2015). Cette population de macrophages a une activité microbicide, capacité tumoricide et elle stimule la réponse inflammatoire de type Th1. Ces macrophages sont aussi caractérisés par la forte expression de l'IL-12 et l'IL-23, et une faible expression de l'IL-10, et les cytokines pro-inflammatoire comme IL-6 et TNF- α , et par la surexpression de molécules associées avec la présentation d'antigène comme HLA-DR et les molécules de co-stimulation (Helm et al., 2014).

Les macrophages M1 expriment l'enzyme nitric oxide synthase (iNOS) qui métabolise l'arginine en monoxyde d'azote (NO) et citrulline. Le NO peut être métabolisé en d'autres espèces réactives de l'azote en aval, tandis que la citrulline pourrait être réutilisée pour la synthèse de NO efficace via le cycle citrulline (Rath et al., 2014)

1.2.2.2 Macrophages alternativement activés (M2)

Les macrophages alternativement activés sont un nom générique utilisé pour divers formes de macrophages non activés classiquement résultant de l'exposition de l'IL-4 ou IL-13, complexes immuns, IL-10, ou glucocorticoïdes (Gordon and Martinez, 2010). Ces macrophages sont associés avec la réponse anti-inflammatoire Th2, la cicatrisation des blessures et la résolution de l'inflammation. Ils expriment un taux faible de cytokines inflammatoires comme IL-12 et un haut niveau de cytokines anti-inflammatoire comme l'IL-10,

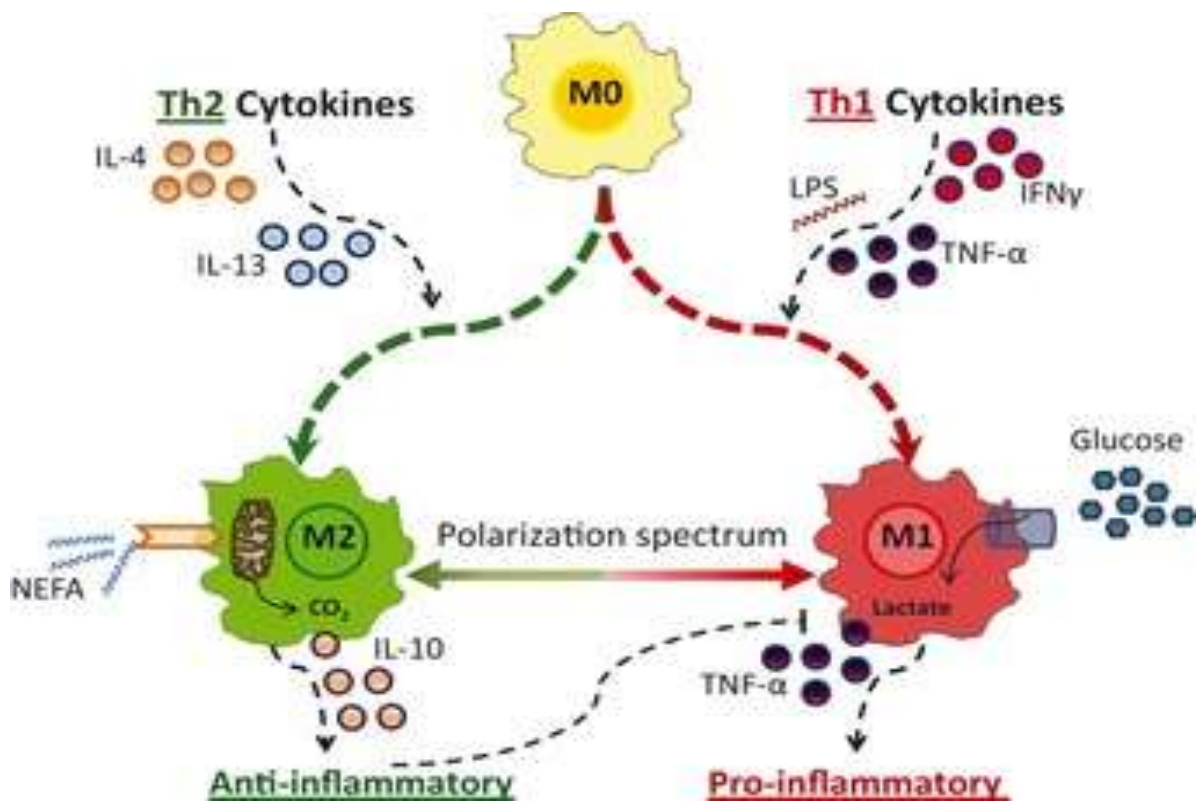


Figure 1.3. polarisation des macrophage M1/M2 (Johnson et al., 2012)

des chimiokines CCL17, CCL18, et de récepteur de mannose et de récepteurs scavenger (Odegaard et al., 2007). L'un des premiers signaux de l'immunité innée qui va être libéré lors de la lésion tissulaire est l'IL-4 qui est secrété par les mastocytes et les basophiles. L'IL-4 stimule l'arginase du macrophage qui est une enzyme qui convertit l'arginine en ornithine et urée. L'ornithine est un précurseur de polyamines et de et de la proline, qui sont importants pour la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire (Johnson et al., 2012)

1.2.3. Macrophage et diabète de type 1

Les lymphocytes T diabétogènes sont des acteurs clés dans l'induction de T1D chez l'homme et les souris NOD. Cependant, ils ne représentent qu'une seule pièce du puzzle des systèmes immunitaires innés et adaptatifs impliqués dans cette pathologie. Le rôle des macrophages dans la pathogenèse du DT1 a été suggéré dans les premières études (Hutchings et al., 1990). D'abord, ces cellules sont détectées dans les infiltrats d'îlots de jeunes souris NOD et l'inhibition de cet influx de macrophages dans le pancréas, en inhibant un récepteur favorisant l'adhésion sur cette cellule, ou leur appauvrissement, empêche le développement de DT1. Des études in vivo et in vitro chez des rongeurs ont démontré que les macrophages pouvaient jouer un rôle pathogène sur les cellules β en produisant des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-

1 β (Willcox et al., 2009) . En effet, comparativement à d'autres souches témoins telles que les souris non résistantes à l'obésité (NOR), les macrophages de souris NOD produisent des niveaux plus élevés des cytokines inflammatoires IL-12, IL-1 β et TNF- α après stimulation avec CD40L ou LPS ou après englobement de cellules apoptotiques(Kida et al., 1998). De plus, les macrophages NOD sont moins efficaces pour englober les cellules apoptotiques conduisant à une clairance déficiente des cellules apoptotiques et cette accumulation de cellules mourantes peut favoriser les réponses inflammatoires (Liadis et al., 2005).

1.2.4. Rôles du macrophage

1.2.4.1. Macrophages et immunité innée

Le macrophage joue de nombreux rôles dans la réponse immunitaire innée qui est la première ligne de défense contre l'infection microbienne (Chatenoud L. et Bach J.F., 2008). Les macrophages représentent une population fonctionnellement hétérogène de cellules immunitaires dans le corps. Malgré les différences de spécificité tissulaire entre elles, les macrophages partagent plusieurs caractéristiques communes. Ce sont des cellules hautement phagocytaires, capables d'englober non seulement des bactéries mais aussi des substances particulières et solubles étrangères à travers le processus d'endocytose. Les macrophages présentent également plusieurs récepteurs sur leur surface pour reconnaître d'autres cellules ou antigènes comme étant phagocytés et pour se lier à des fragments de complément, des résidus de mannose sur les bactéries et la région Fc de l'immunoglobuline G. Un rôle supplémentaire des macrophages consiste à participer à l'activation des lymphocytes T en leur présentant certains antigènes par des molécules de surface désignées comme complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC)(Morio et al., 2000).

1.2.4.2. Macrophage et phagocytose :

La phagocytose est un processus remarquablement complexe et polyvalent: elle contribue à l'immunité innée grâce à l'ingestion et à l'élimination des agents pathogènes, tout en étant au centre de l'homéostasie tissulaire et du remodelage en éliminant les cellules infectées (Freeman and Grinstein, 2014).

Une fois phagocyté, l'agent pathogène est entouré par une membrane formant le phagosome, le phagosome fusionne avec le lysosome pour former le phagolysosome qui est un compartiment hydrolytique acide dans lequel l'agent pathogène est tué et digéré dans la préparation de présentation de l'antigène (Canton et al., 2014). Les macrophages sont considérés comme des phagocytes professionnels en raison de l'efficacité avec laquelle ils internalisent les particules. Les macrophages différenciés conservent la capacité d'ingestion de particules (Daigneault et al., 2012). Les macrophages sont bien équipés pour phagocytose des particules possédant une grande

surface, qui fournit la membrane pour former des vacuoles endocytaires. Les données expérimentales suggèrent que le macrophage a le potentiel d'internaliser toute sa membrane de surface en tant que vacuoles endocytaires toutes les 30 minutes (Sokol et al., 1987). La phagocytose des agents pathogènes par les macrophages initie la réponse immunitaire innée, qui à son tour va orchestrer la réponse adaptative (Aderem and Underhill, 1999).

1.2.5. Conséquences de l'activation du macrophage

Les macrophages jouent un rôle important dans la défense et l'inflammation de l'hôte. En réponse à un défi immunitaire, les macrophages deviennent activés et produisent des médiateurs pro-inflammatoires qui contribuent à l'immunité non spécifique tels que l'oxyde nitrique (NO) et les espèces réactifs d'oxygène ROS comme H_2O_2 en réponse à la phagocytose et au ligand du récepteur de reconnaissance du motif antigénique PRR (AribiM., et al ; 2015)

1.2.5.1. Les radicaux libres

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs souvent appelés espèces réactives de l'oxygène.

1.2.5.1.1. Monoxyde d'azote

Les Macrophages sont connus pour produire diverses molécules telles que l'oxyde nitrique (NO) et les espèces réactives d'oxygène (ROS) en réponse à la phagocytose et aux ligands des récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) (Horta et al., 2012). La production de radicaux ROS et d'acides azotés réactifs (RNS) sont sous le contrôle de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NOX) et de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS), respectivement (Karimian et al., 2014). Les macrophages activés produisent du NO par une NO synthase inducible (iNOS), codée par le gène NOS2, par deux monooxygénations successives de L-arginine (L-Arg) (Fig.1.4.).

Le NO est un médiateur ubiquitaire, il est impliqué dans différents effets biologiques, en particulier la neurotransmission et la communication intercellulaire ainsi que la

vasodilatation et la contraction des muscles. Il a aussi un rôle dans l'immunité par son effet anti-bactérien et par sa contribution dans la réponse inflammatoire (Emre et al., 2007).

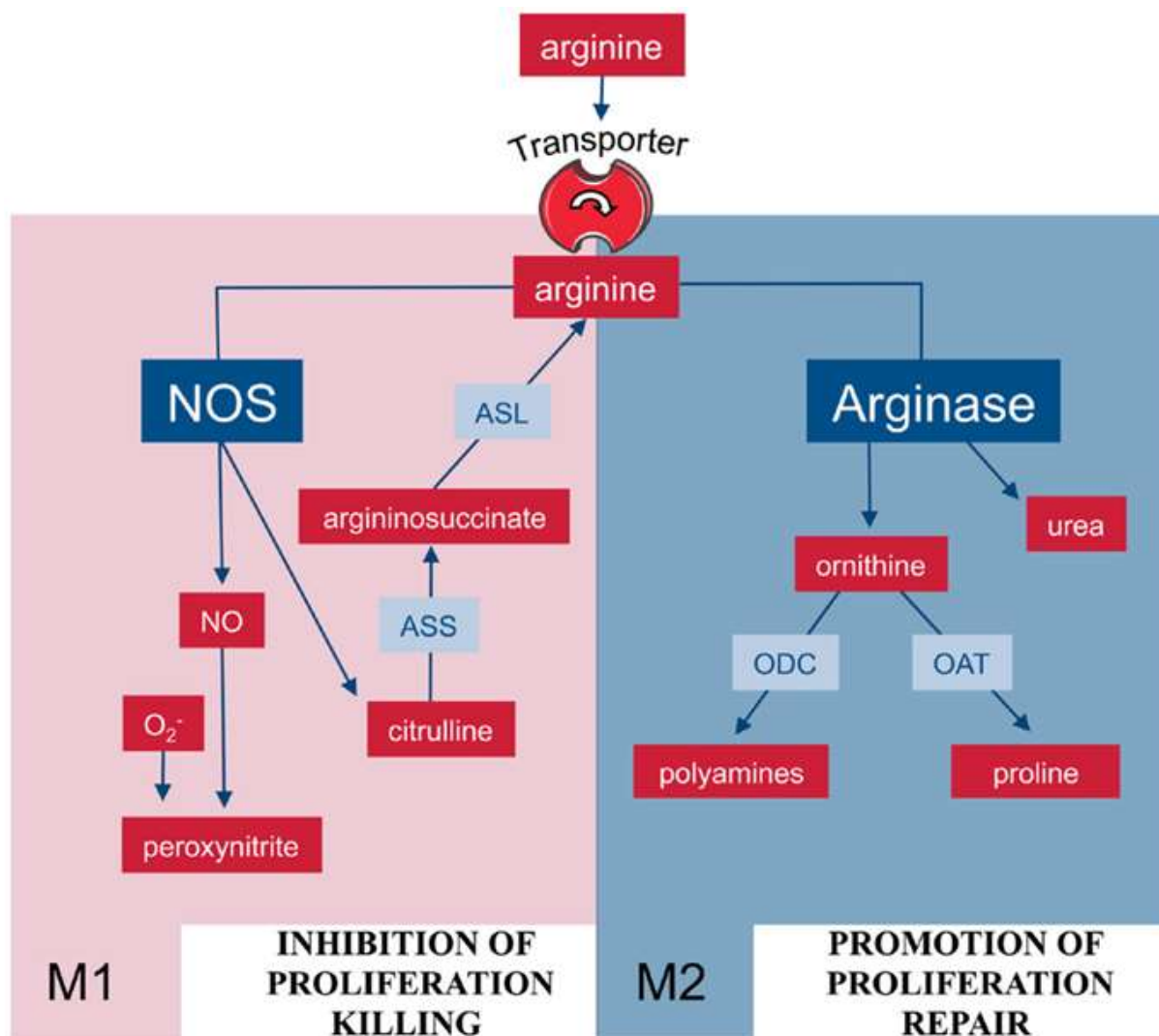


Figure 1.4. Le métabolisme de l'arginine via NOS ou l'arginase est au centre de la polarisation M1 / M2 des macrophages. Les macrophages M1 et M2 sont caractérisés par le métabolisme de l'arginine via NOS ou arginase avec des conséquences fonctionnelles importantes.

1.2.5.1.2. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est l'une des espèces d'oxygène les plus actives, qui est produite dans les mitochondries par MnSOD (superoxyde dismutase contenant du manganèse, SOD2) en tant que produit final de la phosphate de dinucléotide de nicotinamide et d'adénine associée à la membrane plasmique (NADPH) pendant le burst oxydatif des voies respiratoires dans les macrophages activés (Forman and Torres, 2002).

Le peroxyde d'hydrogène est généré en réponse à divers stimuli, y compris des cytokines et les facteurs de croissance (Alexandre O, 2005). Il est impliqué dans la régulation des divers processus biologiques tels que l'activation des cellules

immunitaires et le remodelage vasculaire. Bien que le peroxyde d'hydrogène est mieux connu pour son effet cytotoxique, il est maintenant établi comme un régulateur important de la transduction du signal, il peut également activer les voies de signalisation visant à stimuler la prolifération, la différenciation, la migration, ou l'apoptose cellulaire (Vatansever et al., 2013)

1.2.6. Activation de l'arginase

L'arginase est une enzyme qui convertit l'arginine en urée et ornithine. Elle existe sous deux iso-formes distinctes. L'arginase I est exprimé presque exclusivement dans le foie, où elle sert d'enzyme essentielle du cycle de l'urée. L'Arginase II est une arginase mitochondriale qui se trouve dans plusieurs extra-hépatiques tissus et cellules notamment le macrophage. Elle se compose d'une chaîne de polypeptide de 354 résidus d'acides aminés, y compris la pré- séquence putative N-terminal pour l'importation et le ciblage mitochondrial(Lee et al., 2013). Lors d'une réponse immunitaire à médiation humorale, les lymphocytes β secrètent l'IL-4 qui stimule l'enzyme arginase. Cette enzyme métabolise la conversion de L-arginine en ornithine et urée, l'ornithine entre dans la synthèse de proline et de polyamine qui interviennent dans la prolifération cellulaire et la réparation des tissus(Rath et al., 2014).

1.2.7. Balance arginase/iNOS

Le macrophage joue un rôle majeur dans le système immunitaire, à la fois en tant qu'une cellule effectrice et antimicrobienne et comme cellule immuno-régulatrice. Il induit, supprime ou module les réponses immunitaires adaptatives. Ces aspects sont fondamentalement entraînés par le phénotype du métabolisme de l'arginine, très répandu dans une réponse immunitaire en cours (Rath et al., 2014). L'arginase et la nitric oxide synthase métabolise L-arginine en deux voies différentes. Entre ces deux voies métaboliques, il y a des interactions d'inhibition croisées. Dans les macrophages M1, l'expression de iNOS est contrôlée par la disponibilité de l'arginine parce que au cours de la synthèse de NO il y a la production du N-hydroxyarginine NOHA qui inhibe les deux isoformes de l'arginase. Tandis que, dans les macrophages M2, l'expression de iNOS et la production de NO est limitée par la déplétion arginine suite à son conversion par arginase induit par IL-4 (Chang et al., 1998) (Fig.1.5.).

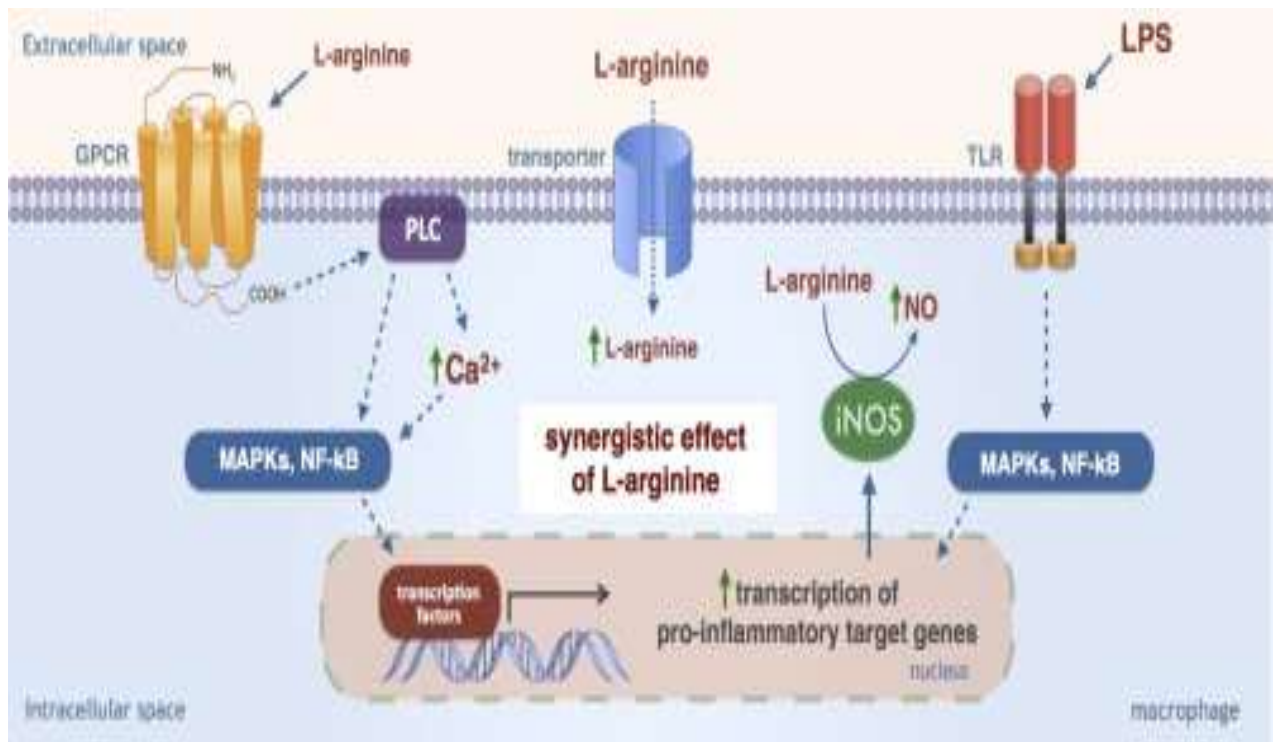


Figure 1.5. Régulation de l'arginine dépendante de l'activation des macrophages (Pekarova and Lojek, 2015). Au cours de l'inflammation, les macrophages peuvent être stimulés par une endotoxine bactérienne (LPS), qui est connue pour lier les récepteurs TLR, situés dans la membrane cytoplasmique. Il est important de noter que ce processus est suivi par l'activation de cascades de signalisation intracellulaire (par exemple, MAPK et NF-κ B) associées à la translocation des facteurs de transcription au noyau, où ils sont responsables de la régulation positive des gènes cibles (par exemple, iNOS) . Après la traduction des protéines, l'iNOS est responsable de la production accrue de NO. Au cours des dernières décennies, la présence d'acide aminé semi-essentiel L -arginine a été jugée cruciale uniquement pour l'activité iNOS et la production de NO. L-L'arginine peut être transportée efficacement vers l'espace intracellulaire principalement via les transporteurs CAT.

1.2.8. Macrophage et apprêtage de l'antigène aux cellules T :

La structure globale des lymphocytes T est identique, ils se distinguent par leurs TCR toujours accompagnée du cluster de différenciation CD3, ainsi que du CD4 ou du CD8 suivant le lymphocyte considéré. Les lymphocytes T Naïves nécessitent au moins deux signaux pour leur activation, les deux sont fournis par un macrophage qui est une cellule présentatrice d'antigène: le signal 1 est fourni par des complexes de CMH-peptide se liant aux récepteurs des cellules T, alors que le signal 2 est principalement fourni par des protéines co-stimulatrices B7 se liant à CD28 sur la surface des cellules T (Lanzavecchia et al., 1999). Si la cellule T reçoit uniquement le signal 1, il est habituellement supprimé ou inactivé. Lorsque les lymphocytes T auxiliaires sont initialement activés par un macrophage, ils peuvent se différencier en cellules effectrices TH1 ou TH2, en fonction des cytokines dans leur environnement(Charles A Janeway et al., 2001a) (Fig.1.6.).

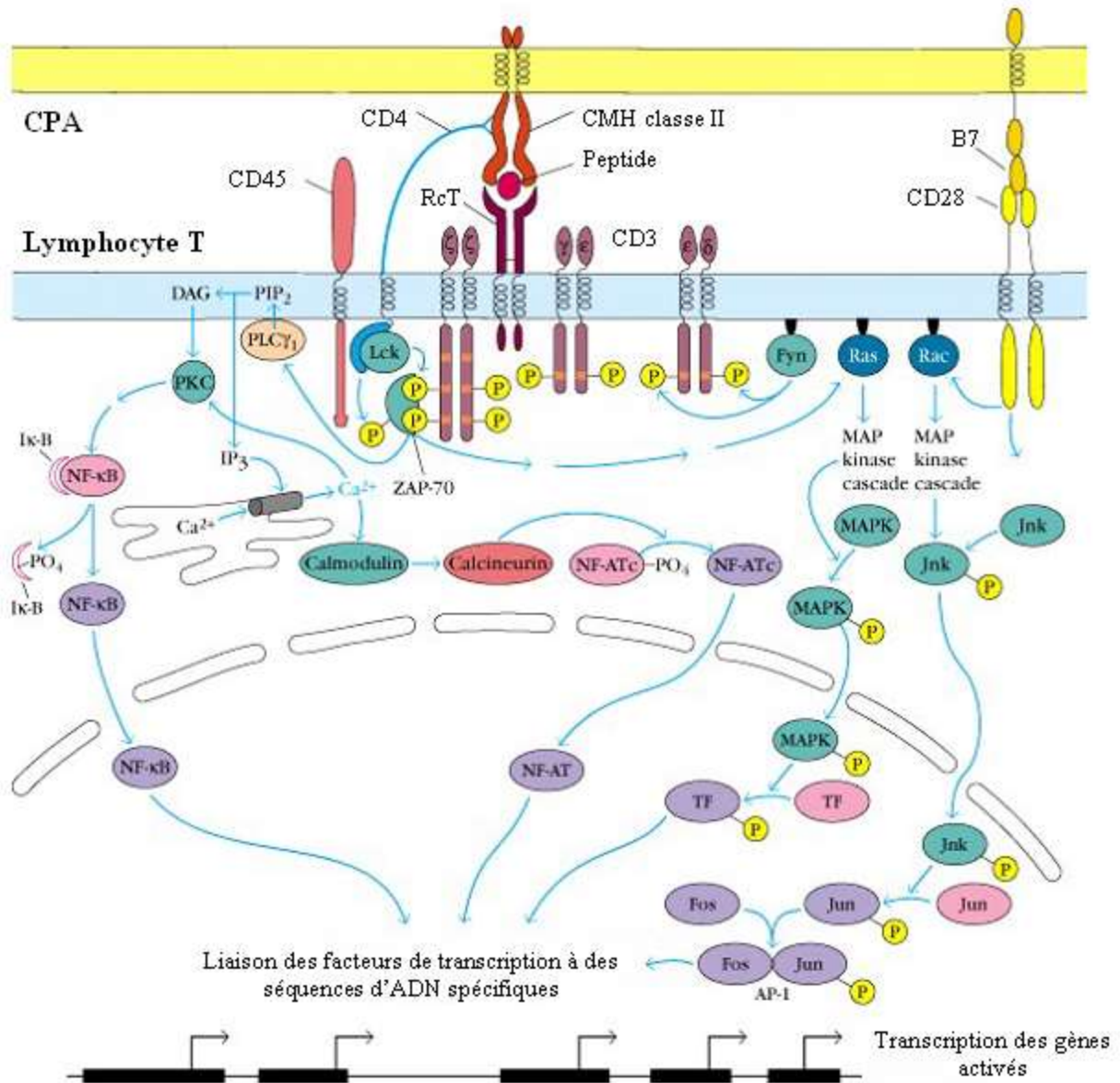


Figure 1.6. Résumé schématique des signaux d'activation intracellulaire des lymphocytes T CD4+(Goldsby and Goldsby, 2003)

1.3. Cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines sécrétées par une variété de cellules dans le corps y compris les lymphocytes β et T, les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les mastocytes et les cellules de la rate, le thymus et la moelle osseuse, en réponse à tout stimulus immunitaire (Holman and Kalaaji, 2006). Bien qu'ils soient transmissibles transitoirement dans le microenvironnement tissulaire, comme molécules d'urgence diverses, ils peuvent produire une maladie chronique lorsqu'ils sont libérés de manière persistante (Trefzer et al., 2003). Les cytokines régulent de nombreux processus cellulaires fondamentaux, y compris les réponses immunitaires et inflammatoires et la croissance cellulaire et la différenciation. La liaison des cytokines à leurs récepteurs de surface cellulaire peut activer un certain nombre de gènes dans le noyau qui sont

cruciaux pour les fonctions biologiques des cytokines. En utilisant l'interféron (IFN) comme système modèle, une voie de transduction de signal nucléaire commune activée par de nombreuses cytokines a été découverte. La plupart des récepteurs des cytokines, contrairement aux récepteurs du facteur de croissance, manquent d'activités intrinsèques de tyrosine kinase.

Une famille de tyrosine kinases non réceptrices appelées JAK (Janus kinases) sont associées à divers récepteurs de cytokines. La liaison d'une cytokine à son récepteur de surface cellulaire conduit à la dimérisation du récepteur et à l'activation des JAK associées aux récepteurs (Jatiani et al., 2010). Les résidus de tyrosine spécifiques du récepteur sont alors phosphorylés par des JAK activés et servent de sites d'ancrage pour recruter une famille de facteurs de transcription cytoplasmiques latents appelés STAT (transducteur de signal et activateur de la transcription)(Ihle, 2001).

Les STAT sont phosphorylés par des JAK et ensuite dimérisés et quittent le récepteur. Les dimères STAT se déplacent vers le noyau et dirigent l'activation immédiate des gènes. Les voies JAK ± STAT sont utilisées par de nombreuses cytokines et des facteurs de croissance, y compris IL-2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, granulocyte ± macrophage colony- (EGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Darnell, 1997).

1.4. Les STATs

Les protéines STAT sont une famille de facteurs de transcription composés de 7 membres. En 1994, Darnell et ses collaborateurs ont identifiés les deux premiers membres de la famille, STAT1 et 2, par purification des facteurs liés aux gènes stimulés par l'IFN. Les autres membres de la famille ont été décrits ultérieurement et sont STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 (Darnell, 1997). Ces protéines agissent comme facteurs de transcription lorsqu'elles forment des homodimères et des hétérodimères parmi eux. La dimérisation est possible une fois que les STAT ont été phosphorylés aux résidus de tyrosine dans leur domaine SH2 (Fig.1). Les STAT sont la seule famille de facteurs de transcription qui contiennent des domaines SH2 pour les phosphotyrosines qui servent principalement à la fois à la liaison au récepteur des cytokines activées et à l'activation des STAT par la phosphorylation de la tyrosine(Ehret et al., 2001). Les protéines STAT associées aux JAKs sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation des cytokines (Tableau 2).

Tableau 1.1. Classification des STATs (Ehret et al., 2001)

	Cytokine ou facteur
STAT1	IL-2, IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-27
STAT2	IFN- α , IFN- β
STAT3	LIF, IL-10, IL-6, IL-27, Growth hormone
STAT4	IL-12
STAT5a/b	Prolactin, Growth hormone, Thrombopoietin
STAT6	IL-4, IL-13

Les transducteurs et activateurs de Janus kinase / transducteurs de signaux pour la transcription (JAK / STAT) régulent une pléthore de processus biologiques incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose (Nicolas et al., 2013). La liaison de ligand induit une activation intracellulaire par la multidimérisation de différentes unités de récepteurs de cytokine, suivie par le recrutement de JAKs dans le domaine cytoplasmique du récepteur de cytokine. L'activation de JAK se produit lorsqu'un résidu de tyrosine dans le récepteur de cytokine est phosphorylé, créant un site d'ancrage pour STAT cytoplasmique. Bien que les protéines STAT soient attachées au récepteur de la cytokine, les protéines JAK les phosphorylent à un résidu de tyrosine, détachant la protéine STAT du récepteur de cytokine de sorte que les STAT forment des homo et des hétérodimères qui se translateront au noyau et se lieront aux séquences d'ADN pour favoriser l'expression génique (Fig.1.7.)

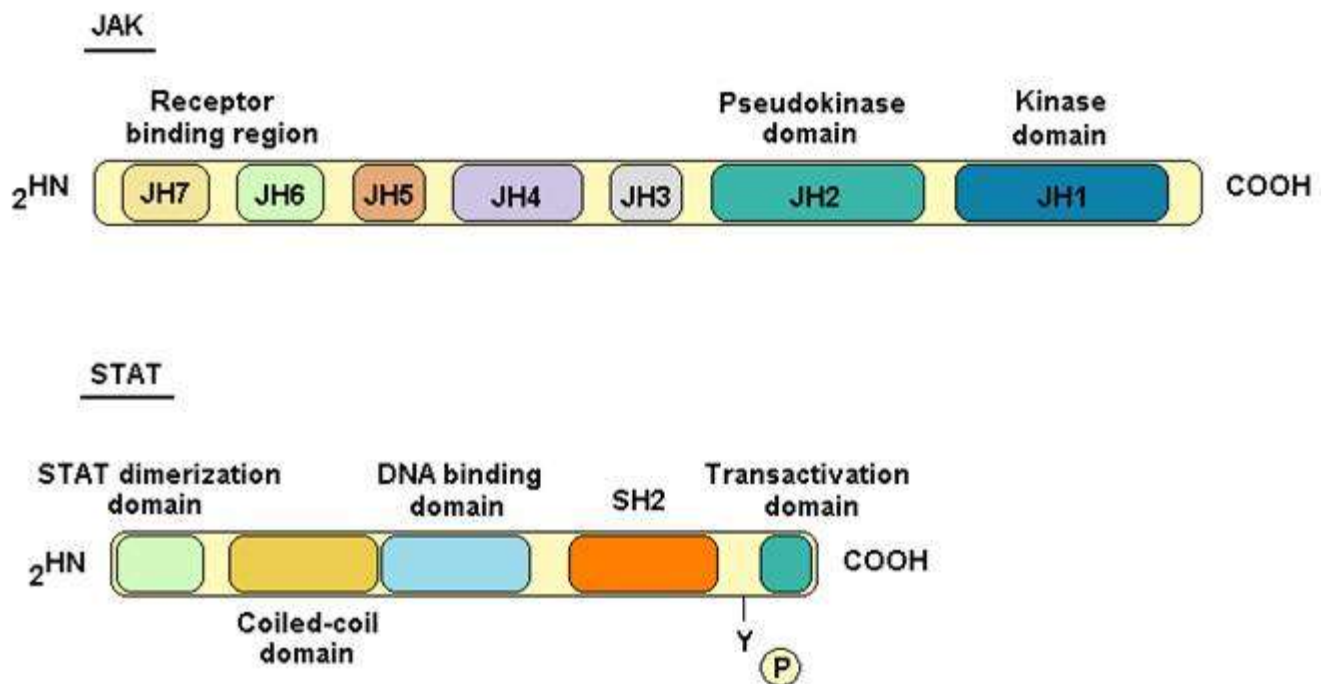


Figure 1.7. JAK et STAT(Becerra-Díaz et al., 2011). Les protéines JAK comportent 7 domaines; Ils doivent leur nom en raison de l'homologie de JH1 et JH2 aux deux dieux face Janus. La différence entre les deux domaines est que JH2 manque de certains résidus impliqués dans l'activité kinase. Les protéines STAT sont des facteurs de transcription qui présentent cinq domaines conservés(Becerra-Díaz et al., 2011)

1.4.1. Les fonctions biologiques des STAT

1.4.1.1. Fonction dans la signalisation des cytokines

Des études biochimiques et génétiques ont démontré que les STAT jouent un rôle important dans l'expression des gènes activés par les cytokines. En outre, d'autres études biochimiques suggèrent que les STAT peuvent présenter soit des fonctions spécifiques soit des fonctions générales dans la signalisation des cytokines. Les stat qui sont proposés pour jouer des fonctions plus spécifiques sont: les Stat2, Stat4 et Stat6 (Shuai, 1999)

Dans ce travail, nous nous concentrerons sur deux protéines STAT, Stat6 et Stat4, qui sont activées spécifiquement par l'IL-4 et l'IL-12 ou l'IFN γ , respectivement. Ces deux STAT ont été jugés critiques pour la fonction et le développement des cellules T helper.

1.4.2. STAT4

Bien que le Stat4 soit exprimé à la fois dans les cellules Th1 et Th2, il ne peut être phosphorylé que par l'IL-12 dans les cellules TH1, en raison de la régulation négative de l'IL-12 spécifiquement dans les cellules Th2 (Shin et al., 2005). Cela suggère que le Stat4 joue un rôle important dans la différenciation Th1 (Lund et al., 2004)

1.4.3. STAT 6

L'IL-4 est une lymphokine pleiotropique qui joue un rôle important dans le système immunitaire. Elle active deux voies de signalisation à travers la phosphorylation des tyrosines de STAT 6. Il a été démontré dans plusieurs études que trois résidus centraux de tyrosine dans la chaîne d'IL-4R α , sont importants pour l'activation de STAT6 (Takeda et al., 1996a). Ces trois résidus Y575, Y603, Y631, deviennent phosphorylés par la stimulation du récepteur des peptides phosphorylés correspondant à ces phosphotyrosines et aux résidus voisins liant au STAT6 (Kim et al., 2012). Les phosphotyrosines fournissent ainsi des sites d'amarrages pour les monomères STAT 6, qui vont obtenir la tyrosine phosphorylé eux même par les récepteurs associés au JAK (Gregory et al., 2006). Par ailleurs la première voie décrite favorisant le destin TH2, est la cascade de signalisation impliquant le facteur de transcription STAT 6. Comme d'autres protéines de STAT, le STAT6 agit en tant qu'activateur transcriptionnel pour la grande majorité de sa cible. Bien qu'il favorise principalement l'expression des gènes, plusieurs études suggèrent que STAT 6 ait des actions inhibitrices et joue un rôle très important dans l'engagement des sous familles de TH (Elo L.L et al., 2010).

En plus de son rôle dans les cellules T et β , STAT6 fonctionne également dans les macrophages et les cellules dendritiques. Dans les macrophages, STAT6 favorise la différenciation induite par l'IL-4 de macrophages alternativement activés (MAA) et sert à

la médiation de l'expression induite par l'IL-13 de gènes tels que le CMH de classe II (Takeda et al., 1996b). L'activité STAT6 dans les MAA est associée à la suppression de la prolifération des lymphocytes T (Huber et al., 2010). Récemment, on a démontré que le STAT6, facilite la transcription médiée par le récepteur PPAR-gamma dans les macrophages et les cellules dendritiques (Szanto et al., 2010).

1.5. Lymphocyte T

Le système immunitaire humain se compose de l'ancien système immunitaire inné transmis le long de l'évolution des invertébrés et le système immunitaire adaptatif récemment acquis uniquement présent dans les vertébrés (Charles A Janeway et al., 2001b). Les fonctions principales du système immunitaire sont la reconnaissance avec l'élimination subséquente des antigènes étrangers, la formation de la mémoire immunologique et le développement de la tolérance aux auto-antigènes. La population de lymphocytes est composée principalement de lymphocytes dérivés du thymus (lymphocytes T), de lymphocytes β dérivés de la moelle osseuse et de cellules tueuses naturelles (cellules NK). Les lymphocytes T médiateurs de l'immunité cellulaire, ainsi que les lymphocytes β médiation de l'immunité humorale, fournissent une immunité adaptative, qui travaillent en étroite collaboration avec le système immunitaire inné (Szablewski, 2014). Les lymphocytes β mûrissent dans la moelle osseuse elle-même tandis que les lymphocytes T nécessitent la maturation du thymus avant d'être déployés dans les organes lymphoïdes périphériques pour une différenciation différenciée par l'antigène. Un petit sous-ensemble des cellules CD4+, y compris les cellules régulatrices naturelles et les cellules T killer naturelles (cellules NKT), sont déjà des cellules différenciées distinctes lors de la libération du thymus (Iwasaki and Medzhitov, 2015).

Les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ constituent la majorité des lymphocytes T. Les LT CD4+ après avoir été activés et différenciés en divers sous-types effecteurs jouent un rôle majeur dans la médiation de la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines spécifiques. Ces dernières exercent des fonctions multiples, allant de l'activation des cellules du système immunitaire inné, des lymphocytes β , des lymphocytes T cytotoxiques, ainsi que des cellules non immunisées, et jouent également un rôle critique dans la suppression de la réaction immunitaire. Des études continues ont permis d'identifier de nouveaux sous-groupes de cellules CD4+ en plus des cellules T-helper 1 (Th1) et T-helper 2 (Th2) classiques. Il s'agit de T-helper 17 (Th17), de lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh), de cellules régulatrices T induites (iTreg) et de cellules régulatrices de type 1 (Tr1) (Zhu et al., 2010).

1.5.1. Activation des lymphocytes T CD4+

L'étape initiale de différenciation des cellules naïves est la stimulation antigénique

résultant de l'interaction du TCR et du CD4 comme co-récepteur avec le complexe antigène-CMH II, présenté par les cellules professionnelles présentant l'antigène (CPA). Le TCR couplé à l'activation CD3 induit par conséquent un réseau de voies de signalisation en aval, qui conduisent finalement à une prolifération et une différenciation des cellules naïves en cellules effectrices spécifiques (Ye et al., 2008).

1.5.2. Rôle des lymphocytes T CD4+ dans la pathogenèse du DT1

Les Lymphocytes T jouent un rôle crucial dans le processus auto-immun qui conduit au DT1, ils sont considérés comme les exécuteurs finaux de la destruction des cellules β . Les actions opposées des cellules T auto réactives et des cellules T régulateurs, sont réglées par la production respective des cytokines (Miyara et al., 2009). Plusieurs recherches, suggèrent que les cellules T CD 4+ auto réactifs principalement la sous population des TH1, activées par les CPA via le complexe antigène bêta-CMH II, sont la cause majeure de la destruction des cellules bêta sécrétrices d'insuline. Les cellules TH1 activées, produisent IL- β et l'IFN γ , qui empêche la production d'IL-4 et IL-10 par les TH2. Par ailleurs l'IL-1 β et l'IFN γ activent les macrophages et les LT CD 8+ cytotoxiques, responsables de la destruction des cellules bêta des ilots de langerhans, par les interactions directes avec les antigènes des cellules β , présentés via les molécules de CMH I des cellules β , impliquant des interactions Fas/FasL , perforines et granzymes provoquant la lyse les cellules β productrices d'insuline (Yoon and Jun, 2005).

1.6. Lipides, lipoprotéines

1.6.1. Lipides

1.6.1.1. Définition

Les lipides, tels que le cholestérol et les triglycérides, sont insolubles dans l'eau, ces lipides doivent être transportés en association avec des protéines dans la circulation. Les grandes quantités d'acides gras des repas doivent être transportées sous forme de triglycérides pour éviter la toxicité.

Les lipides constituent une classe de molécule biologique définie par leur faible solubilité dans l'eau et leur grande solubilité dans les solvants non polaires (Alberts et al., 2002). Ils se trouvent dans les membranes cellulaires qui séparent les compartiments hydriques intra- et extracellulaires, ou à l'intérieur des adipocytes dans des vacuoles délimitées par des membranes où ils constituent l'essentiel des réserves énergétiques de l'organisme (Karunakaran and Fratti, 2013)

1.6.1.2. Fonctions des lipides

Les lipides constituent l'essentiel des réserves énergétiques de l'organisme : plus de

10 kg chez un adulte, 100 000 kcal localisées principalement dans le tissu adipeux (TA). Les lipides ont un rôle de médiateur et agissent comme des molécules d'information même à l'intérieur de la cellule où ils naissent, ils sont aussi considérés comme des déterminants de l'architecture et des fonctions membranaires (Dowhan, 2013).

1.6.2. Lipoprotéines

1.6.2.1. Définition

La majeure partie des lipides du corps (cholestérol, des phospholipides et triacylglycérols), sont transportés dans le plasma par de grands complexes appelés lipoprotéines. Les lipides s'associent à la protéine par interaction non covalente pour former des lipoprotéines (Daniels et al., 2009).

1.6.2.2. Structures des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules complexes qui ont un noyau hydrophobe central de lipides non polaires, principalement des esters de cholestérol et des triglycérides. Ce noyau hydrophobe est entouré d'une membrane hydrophile constituée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (figure 1). Les lipoprotéines plasmatiques sont divisées en sept classes en fonction de la taille, de la composition lipidique et des apolipoprotéines (Zhang et al., 2011) (Fig.1.8.).

Structure d'une lipoprotéine

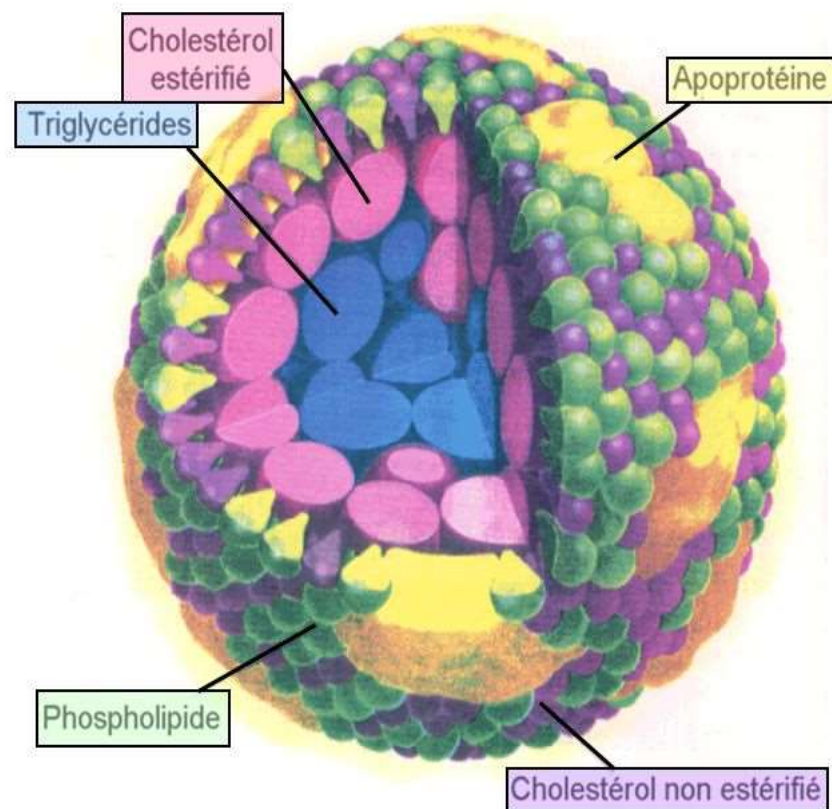


Figure 1.8. Structure d'une lipoprotéine (Feingold and Grunfeld, 2000)

1.6.2.3. Classification des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont classées en cinq grandes catégories en fonction de leur rôle et de propriété physique: Les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), Les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL) (German et al., 2006).

Tableau 1.2.classificatoon des lipoproteins:(Feingold and Grunfeld, 2000)

Lipoprotein	Density (g/ml)	Size (nm)	Major Lipids	Major Apoproteins
Chylomicrons	<0.930	75-1200	Triglycerides	Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV
Chylomicron Remnants	0.930-1.006	30-80	Triglycerides Cholesterol	Apo B-48, Apo E
VLDL	0.930-1.006	30-80	Triglycerides	Apo B-100, Apo E, Apo C
IDL	1.006-1.019	25-35	Triglycerides Cholesterol	Apo B-100, Apo E, Apo C
LDL	1.019-1.063	18- 25	Cholesterol	Apo B-100
HDL	1.063-1.210	5- 12	Cholesterol Phospholipids	Apo A-I, Apo A-II,

1.6.2.3.1. Les lipoprotéines de haute densité (HDL):

Les particules de HDL sont enrichies en cholestérol et en phospholipides. Les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III et E sont associées à ces particules. Apo A-I est la protéine structurale de noyau et chaque particule de HDL peut contenir plusieurs molécules d'Apo A-I. Les particules de HDL sont très hétérogènes et peuvent être classées en fonction de la densité, de la taille, de la charge ou de la composition d'apolipoprotéines (Lund-Katz and Phillips, 2010) (Fig.1.9.).

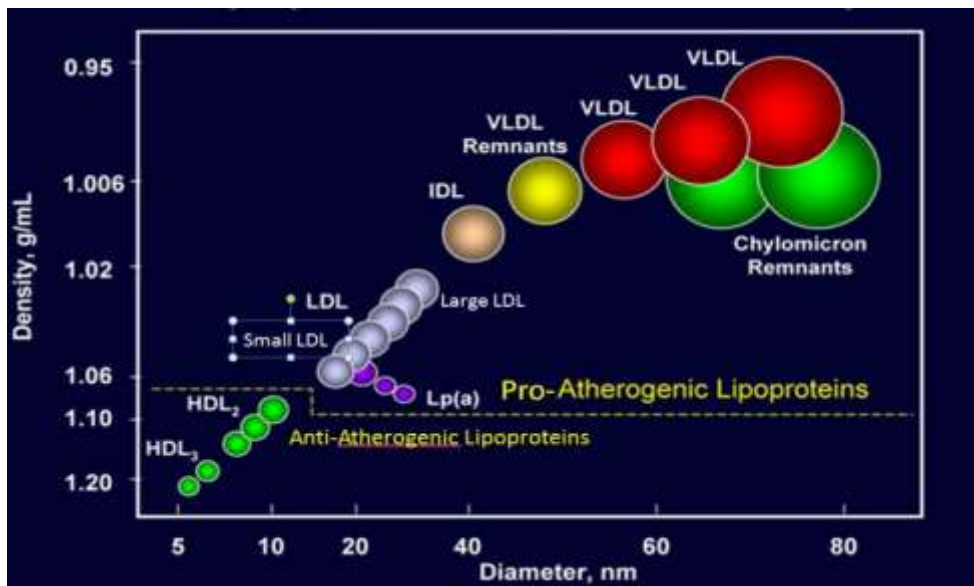


Figure. 1.9. Densité des HDL (Lund-Katz and Phillips, 2010)

Tableau 1.3. Classification des HDL

Method of classification	Types of HDL
Density gradient ultracentrifugation	HDL ₂ , HDL ₃ , Very high density HDL
Nuclear magnetic resonance	large, medium, and small
Gradient gel electrophoresis	HDL 2a, 2b, 3a, 3b, 3c
2-dimensional gel electrophoresis	pre-beta 1 and 2, alpha 1, 2, 3, 4
Apolipoprotein composition	A-I particles, A-I: A-II particles, A-I: E particles

1.6.2.3.2. Sous-fractions de HDL

On distingue deux sous fractions de HDL qui peuvent être séparées selon la fonction de leur taille. L'Apo A-I est la principale apoprotéine structurale et fonctionnelle du HDL et joue un rôle clé dans l'induction de l'efflux de cholestérol des cellules. Les particules de HDL peuvent être sous-classifiées en petites particules de HDL qui favorisent l'efflux de cholestérol à travers le

transporteur de cassette de liaison d'ATP A1 (ABCA1) (Alder-Baerens et al., 2005), de grandes particules de HDL2 qui interagissent avec les récepteurs de la classe B de type 1 (SR-B1), qui assure la libération du cholestérol dans le foie et l'intermédiaire HDL3 qui induit l'efflux du cholestérol à travers la cassette ATP-binding Transporteur G1 (ABCG1) (Connelly and Williams, 2004).

1.6.2.4. Les radeaux lipidiques :

Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines à membrane enrichie en cholestérol, sphingolipides et protéines associés à plusieurs processus biologiques pertinents, y compris la signalisation, le transport de protéines, l'adhésion. Les propriétés fonctionnelles des radeaux lipidiques dépendent strictement de leur composition lipidique. L'appauvrissement du cholestérol à partir de ces micro données diminue les voies de signalisation dans plusieurs cellules, y compris les cellules immunitaires et perturbent la capacité de présentation des antigènes (Pike, 2003). Les molécules du CMH de classe II, qui jouent un rôle dans la présentation de l'antigène et la transduction du signal, se localisent dans les micro-domaines riches en lipides dans les cellules présentatrices d'antigènes (APC). Le nombre de molécules du CMH de classe II présentes à la surface des APC est crucial pour l'activation des cellules T; concentré de MHC-peptide complexe APC surface, la diminution de la quantité d'antigène nécessaire pour l'activation des cellules T (Hiltbold et al., 2003) (Fig.1.10.).

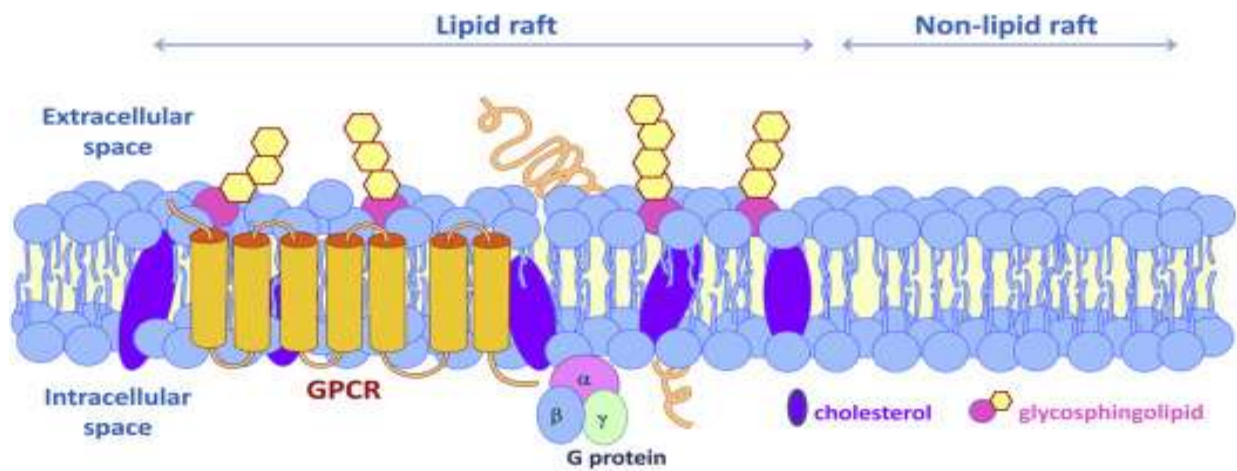


Figure.1.10. Radeau lipidique. Les radeaux lipidiques sont des microdomaines à membrane plasmique hautement organisés enrichis en phospholipides, en glycosphingolipides et en cholestérol, et servent de matrice pour les récepteurs, tels que les récepteurs G-couplés aux protéines (GPCR), et d'autres molécules de signalisation.

1.6.2.5. HDL et immunité cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire implique l'activation de plusieurs types cellulaires. Plusieurs études indiquent que le HDL peut influencer l'activité des monocytes / macrophages, DC et lymphocytes principalement en modulant la teneur en cholestérol dans les radeaux lipidiques et l'activité des récepteurs, ainsi qu'en influençant l'activation des cellules immunitaires (Fig 1.11).

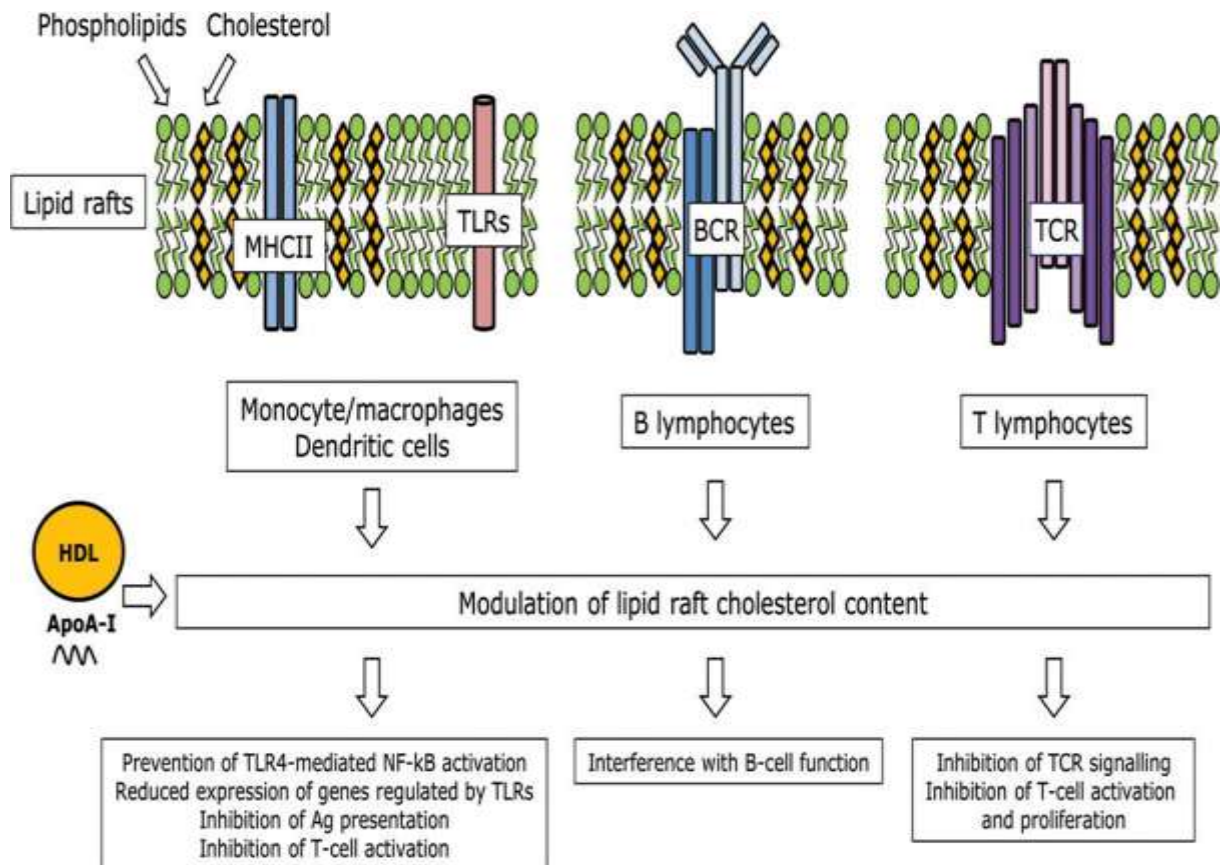


Figure 1.11. HDL et radeaux lipidiques (Catapano et al., 2014). HDL modulent la structure des radeaux lipidiques dans les cellules immunitaires. Le HDL et sa principale apolipoprotéine (apoA-I) réduisent la teneur en cholestérol dans les radeaux lipidiques de plusieurs types de cellules, ce qui entraîne la modulation de la fonction des récepteurs clés impliqués dans la réponse immunitaire innée et adaptative

Sur la base des différentes cytokines produites dans le microenvironnement, les monocytes peuvent se différencier en deux types de macrophages différents : **M1** et **M2** ils sont induits respectivement par les cytokines **Th1** et **Th2** (Liu and Yang, 2013). Les facteurs peuvent modifier l'équilibre entre le phénotype M1 et M2. Parmi eux, chez les souris, le HDL a augmenté l'expression de marqueurs de macrophages M2 entraînant des changements significatifs dans le contenu et les caractéristiques des macrophages dérivés des monocytes et dans la régression de la plaque athérosclérotique (Feig et al., 2011).

1.6.2.6. Fonction des HDL

Le HDL joue un rôle clé en tant que plateforme intégrant l'immunité innée et adaptative et exerce des effets bénéfiques sur d'autres composants du système immunitaire inné (Norata et al., 2012). Des preuves récentes ont montré que le cholestérol HDL peut inhiber la présentation des antigènes aux cellules T en réduisant le taux des radeaux lipidiques (Wang et al., 2012). Il peut influencer l'action des macrophages et des lymphocytes T en modulant le taux de cholestérol dans les radeaux

lipidiques par Apo A1 de HDL, ce qui bloquerait l'expression du CMH II et la différenciation des macrophages et provoquerait l'inactivation du LTCD4 +(Sorci-Thomas and Thomas, 2012). L'accumulation de données suggère qu'en plus du transport inverse du cholestérol de la périphérie au foie, les HDL jouent un rôle majeur dans la vasodilatation et dans la réduction de l'oxydation des LDL et ont d'autres propriétés, y compris antioxydantes, anti-inflammatoires et antithrombotiques. D'autre part, il a été montré que le HDL inhibe le récepteur Toll-like (TLR) qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires à partir de macrophages, il est capable de conduire le macrophage à un état anti-inflammatoire M2 (Sanson et al., 2013). De plus, d'autres études ont montré que le HDL et l'apoA-I inhibaient la capacité de présentation des antigènes des macrophages, puis la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T (Wang et al., 2012).

Par ailleurs plusieurs études ont montré qu'un faible niveau de HDL-C est également un facteur de risque indépendant pour le développement du diabète (Lee, 2014). D'autres études ont montré que les HDL sont très efficaces dans l'inhibition de l'apoptose des cellules bêta et ont un effet bénéfique concernant la survie de ces cellules (Fryirs et al., 2010). En outre, on a découvert que le HDL modulait la survie des îlots humains et des îlots murins en diminuant l'apoptose basale ainsi que l'IL-1beta et l'apoptose induite par le glucose et qu'il favorise aussi la sécrétion d'insuline par pancréas β cellules à travers des processus qui impliquent ABCA1. La capacité des HDL à protéger les cellules bêta pourrait être un mécanisme pour prévenir le DT1 (Yvan-Charvet et al., 2010) (Fig.1.12.)

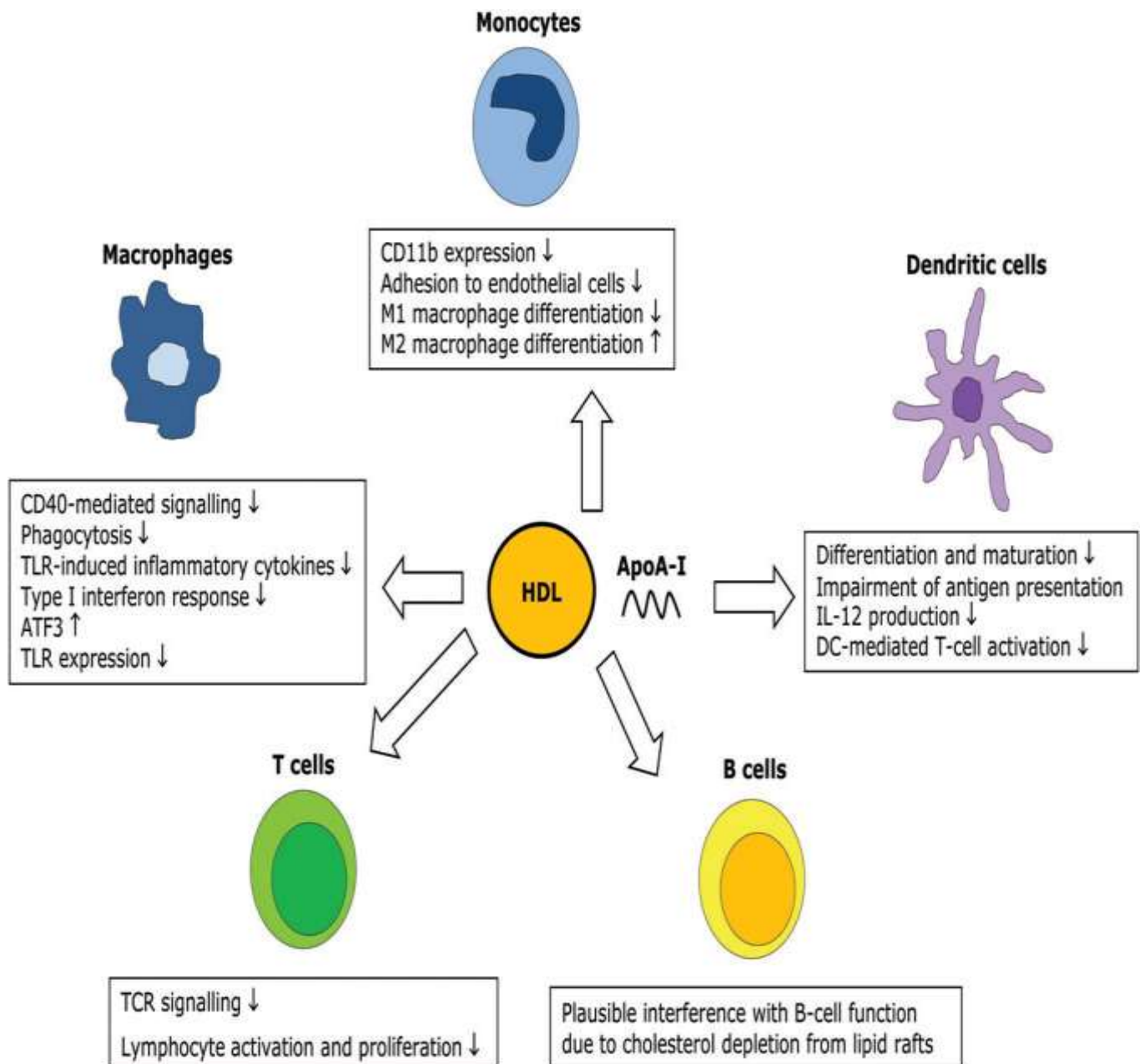


Figure 1.12. Les effets du HDL et apoA-I sur les fonctions des cellules immunitaires. (Catapano et al., 2014)

1.7. Problématique et objectif

Le diabète de type 1 (DT1), est une maladie auto-immune caractérisée par une insuffisance absolue de l'insuline. C'est un processus qui est induit par l'activation, des lymphocytes par des autoantigènes, qui vont détruire la cellule bêta pancréatique productrice d'insuline.

Par ailleurs le HDL est connu par ces propriétés spécifiques : anti-athérogène, anti-inflammatoire, antioxydant et antiapoptotique. De plus, il peut inhiber la présentation de

l'antigène, l'activation des lymphocytes T et bloquer ainsi la production des cytokines pro-inflammatoires. Ces effets donnent un aspect important de l'action du HDL sur les réponses immunitaires innées et adaptatives.

Compte tenu de ces nouvelles idées, nous avons évalué pour la première fois le rôle du HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages et sur la modulation de la production de cytokines pro et anti-inflammatoires dans le diabète de type 1 humain récemment diagnostiqué.

1.7.1. Problématique

1.7.2. Objectif

C'est évaluer l'effet du HDL sur l'inhibition des contacts macrophage/ lymphocyte T au cours du développement du diabète de type 1 nouvellement diagnostiqués

1.7.3. But

C'est prouver que les molécules de HDL pourrait avoir un effet sur les activités fonctionnelles des macrophages et sur la modulation de la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires dans le système de co-culture de macrophages et de cellules T CD4 + au cours du processus du diabète de type 1.

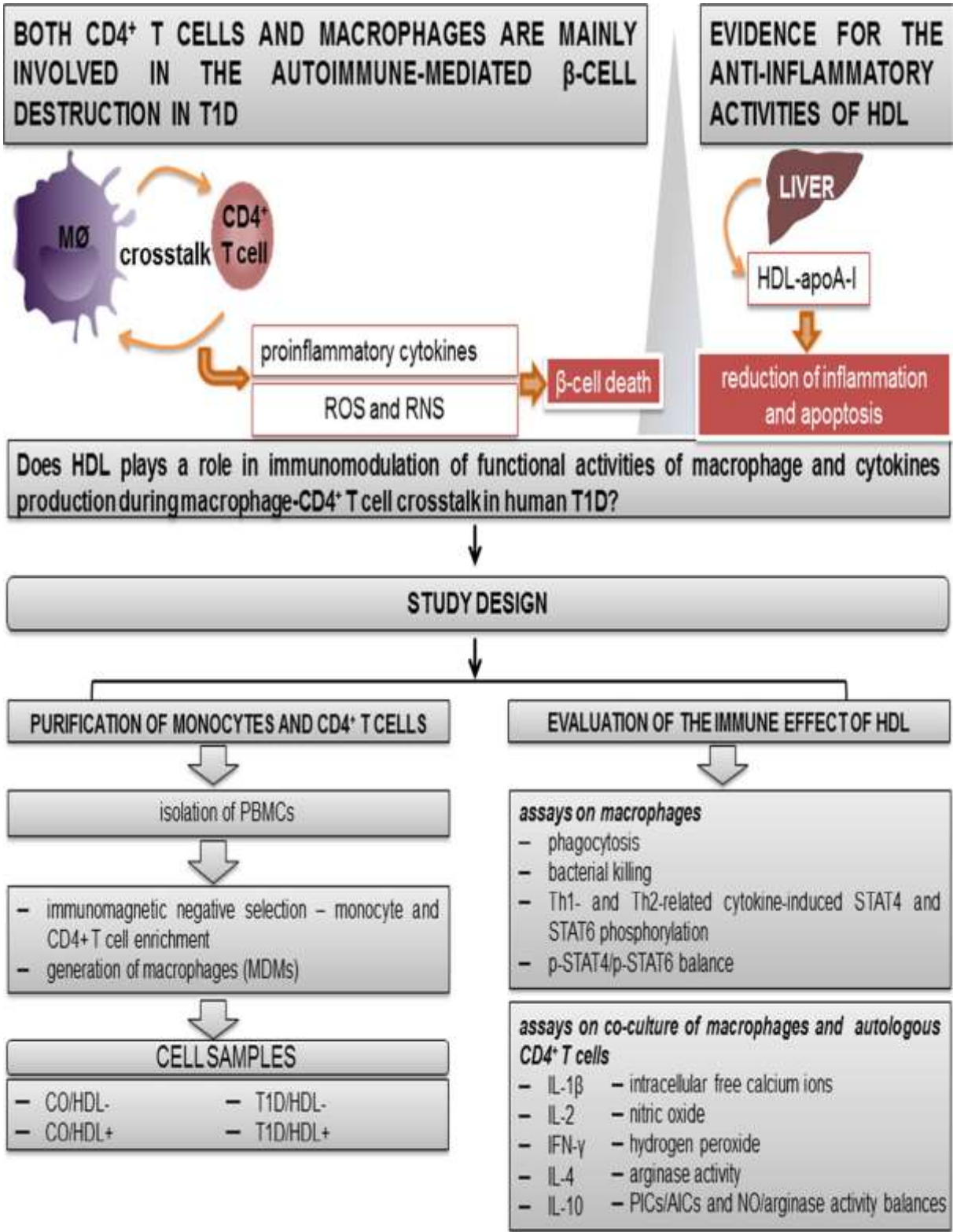


Figure 1.13. Conception de l'étude

Chapitre 2

La lipoprotéine de haute densité immunomodule, les activités fonctionnelles des macrophages et les cytokines produites lors des interactions ex vivo entre les macrophages et les cellules T CD4+ au cours du diabète de type 1 humain nouvellement diagnostiqué, « **High-density lipoprotein immunomodulates the functional activities of macrophage and cytokines produced during ex vivo macrophage-CD4+ T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes** »

- 2.1. Matériels et méthodes
- 2.2. Résultats
- 2.3. Discussion
- 2.4. Conclusions



High-density lipoprotein immunomodulates the functional activities of macrophage and cytokines produced during *ex vivo* macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes



Ibtissem Benghalem, Warda Meziane, Zeyneb Hadjidj, Lamia Ysmail-Dahlouk, Ahmed Belamri, Kheira Mouhadjer, Mourad Aribi *

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, PO Box: 262, Insana-Mansourah, 13000 Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2016

Received in revised form 8 February 2017

Accepted 1 March 2017

Keywords:

Autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells

HDL

Human Type 1 diabetes

Macrophage functional activities

Proinflammatory and anti-inflammatory

cytokines

p-STAT4 and p-STAT6

ABSTRACT

Background: Both CD4⁺ T cells and macrophages are mainly involved in the autoimmune-mediated β -cells destruction in type 1 diabetes (T1D). The aim of this study was to examine the effect of HDL on functional activities of macrophage and its ability to regulate the production of cytokines in autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells at the recent-onset human type 1 diabetes.

Methods: Cell samples were isolated from volunteers with recent-onset T1D or healthy controls.

Results: The levels of the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , nitric oxide (NO), and hydrogen peroxide (H₂O₂) were significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls. Similarly, those of intracellular free calcium ions (Ca^{2+}) were slightly, but not significantly increased ($p > 0.05$). Conversely, macrophage exhibited significantly decreased levels of the relative tyrosine phosphorylation of STAT6 (p-STAT6, Tyr641) in culture of T1D cells than in that of cells from healthy controls; while those of p-STAT4 (Tyr693) were significantly increased. Likewise, the levels of IL-4 and IL-10 were significantly decreased in the co-culture of T1D cells compared to co-culture of cells from healthy controls. Additionally, HDL treatment significantly down-regulated the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , NO, H₂O₂, phagocytosis, bacterial killing, the relative tyrosine phosphorylation of macrophage-expressed STAT4 (p-STAT4, Tyr693), as well as the ratio of IL-1 β /IL-10, NO production/arginase activity, p-STAT4/p-STAT6, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, and the combined proinflammatory (PRCs)/anti-inflammatory (AICs) cytokines. Moreover, HDL treatment significantly up-regulated the production of IL-4, IL-10, arginase activity, and p-STAT6 (Tyr641) (for all comparisons, $p < 0.001$).

Conclusions: We show for the first time that HDL may reverse both the functional activities of macrophages and immunoinflammatory response during reciprocal macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the beginning of T1D. These findings should open the way for therapeutic trials in the short- and medium-term.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the destruction of insulin-producing β -cells thereby affecting the control of blood glucose level [1,2]. T1D is caused by a loss of self-tolerance and can be initiated by the release of autoantigens within the pancreatic islet cells [3].

Many cells are involved in the destruction of β -cells, such as macrophages, dendritic cells, B cells, and T cells [4]. During the pathogenesis of T1D, pancreatic islets are infiltrated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Several evidences showed that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are crucial in T1D development [4,5]. It has been reported that autoreactive T cells differentiate into effectors by engaging β -cell antigens on local antigen-presenting cells (APCs) [6]. Multiple mechanisms have been invoked to elucidate how β -cells are destroyed. T cells can directly kill the β -cells by cell-to-cell contact, through a cytotoxic process [2], but they can also influence their destruction by the release of proinflammatory cytokines [7].

T cells, in particular, CD4⁺ T cells play a central role in the development of T1D [8]. Naive CD4⁺ T cells are activated after

* Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, Insana-Mansourah, Boudade # 2, Department of Biology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyt.2017.03.001>

1043-4666/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Conception de l'étude

L'effet du HDL a été examiné sur les macrophages et sur les autologues mélangés de macrophage et de lymphocyte T CD4+, isolés à partir de volontaires atteints de diabète 1 (DT1) nouvellement diagnostiqués et à partir de témoins sains.

Les échantillons ont été divisés en quatre groupes,

- Témoins sains traités ou non avec du HDL.
- Patients diabétiques de type 1 traités ou non avec du HDL.

La méthodologie adoptée dans ce protocole consiste à : effectuer quelques analyses sur les surnageants, et d'autres sur l'ensemble des lysats cellulaires. Les monocytes et les lymphocytes T CD4+ humains, ont été isolés à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) par sélection négative immunomagnétique. Les essais de niveaux de production de NO, H₂O₂, interleukine-1b (IL-1b), IL-2, IL-4, IL-10, interféron- γ (IFN- γ), protéines, 45 Ca²⁺ et activité arginase ont été réalisés sur des co-cultures contenant des macrophages dérivés de monocytes (MDM) et des lymphocytes T CD4 +, traitées ou non par des HDL purifiés. Les quantités relatives de transducteur de signal et d'activateur de la phosphorylation de transcription (STAT) à la tyrosine 693 (p-STAT4) et à la tyrosine 641 (p-STAT6) ont été évaluées dans des macrophages stimulés par les cytokines respectives liées à Th1 et Th2. La phagocytose et la destruction intracellulaire des bactéries ont été mesurées sur un mélange de MDMs et *Staphylococcus aureus* en présence ou en absence de HDL. Chaque expérience a été répétée indépendamment au moins 3 fois.

2.1.2. Préparation des PBMC humaines

Les échantillons de sang ont été prélevés sur des donneurs sains et sur des patients volontaires nouvellement diagnostiqué au DT1, après avoir obtenu leur consentement et leur approbation par le comité d'éthique local. Le sang veineux frais a été recueilli dans des tubes EDTA ou hépariné (BD, Becton Dickinson, Royaume-Uni). Les PBMC ont été isolées en utilisant une centrifugation à densité dégradée sur Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, États-Unis). Après un lavage répété deux fois avec du PBS (phosphate-buffered saline), les PBMC ont été mises en suspension dans 1 mL de RPMI 1640. La viabilité a été évaluée par coloration

au bleu Trypan (Richardson and Fedoroff, 1997).

2.1.3. Isolation des macrophages dérivés de monocytes

L'isolement des monocytes a été réalisé à partir de PBMC par sélection négative en utilisant le Kit EasySep Human Monocyte Enrichment (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). La purification des monocytes a été effectuée conformément aux instructions du fabricant. La pureté des suspensions cellulaires était de 90-95% selon la cytométrie en flux. Les monocytes ont étéensemencés dans des plaques de 24 ou 96 puits à $2,5-5 \times 10^5$ cellules/ml et différenciés en macrophages dans des milieux RPMI 1640 avec 2 mmol/L de L-glutamine contenant 10% de sérum autologue et 50 µL/mL de gentamycine dans 5% de CO₂ à 37 C. Après 48 h, les cellules non adhérentes ont été éliminées; tandis que les macrophages restent attachés au fond de la plaque.

2.1.4. Isolation des cellules T CD4 +

Les lymphocytes T CD4 + ont été hautement purifiés (atteignant jusqu'à 99%) par sélection négative à l'aide du kit d'enrichissement cocktail de cellules T CD4 + (Stem - Cell Technologies, Vancouver, Canada). Afin d'obtenir des lymphocytes T CD4+, 2 ml de sang total ont été mélangés avec 100 µL de cocktail d'enrichissement de cellules T CD4 + humain et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Après incubation, le mélange a été dilué avec du PBS contenant 2% de FBS, puis séparé avec un volume équivalent de Ficoll-Paque™ PLUS (catalogue n ° 07957).

Enfin, les cellules T CD4 + furent recueillies après centrifugation (1200 g pendant 20 min), puis maintenues dans le milieu RPMI 1640 avec 10% de sérum autologue et IL-2 (20 UI /mL) jusqu'à l'étape finale d'analyse.

2.1.5. Isolation du HDL

Les lipoprotéines ont été isolées à partir du plasma humain par ultracentrifugation du même donneur à jeun (Hasty et al., 2005; McPherson et al., 2007). Le plasma a été séparé par centrifugation à 1500 g et 4 °C pendant 15 min. Les HDL ont été identifiés entre les densités (1,063-1,210 g / mL), puis isolés par ultracentrifugation (Liu et al., 2012). La densité plasmatique a été ajustée à 1,346 g / mL avec KBr, et une solution saline normale (1,006 g/mL), a été placée sur le plasma ajusté pour former un gradient de densité discontinue de NaCl / KBr (Liu et al., 2011). L'échantillon chargé et les tubes en gradient ont été centrifugés à 350 000 g pendant 3,5 h à 4 °C. Le HDL de chaque patient a ensuite été stérilisé puis stocké à 20 °C pendant une durée de 6 mois maximum jusqu'à la phase d'analyse (Schebesch et al., 1997).

2.1.6. Co-culture de macrophages/ Cellules T CD4 + et traitement par HDL

Des échantillons de cellules, de sujets normaux et de patients diabétiques de type 1 ont été préparés de la même manière. Les MDM précédemment purifiés ont d'abord été mis en culture dans des plaques de 24 ou 96 puits à fond plat à 1×10^5 /100 mL par puits, ils ont ensuite été activés en cellules présentatrices d'antigène (CPA) après une incubation de 24 h avec 20 ng / mL d'IFN- γ (Arnold et al., 2015). Après élimination de l'IFN- γ , les MDM activés ont été co-cultivés avec des lymphocytes T CD4 + autologues à une concentration de 1×10^6 /100 mL par puits après stimulation avec 20 μ g/mL de phytohémagglutinine (PHA-L, Calbiochem) (Schebesch et al., 1997). Les co-cultures ont été incubées pendant 24 - 48 h à 37 °C et 5% de CO₂ dans le milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 50 μ g / ml de gentamycine et 10% de sérum autologue, en présence ou en l'absence de HDL à une dose de 50 μ g / ml (Perrin-Cocon et al., 2012; Sanson et al., 2013).

2.1.7. La lyse cellulaire

Pour les tests d'arginase et d'activité d'ions Ca^{2+} , les cellules ont été lysées par l'ajout de 500 μ L de 0,1% de Triton X 100 pendant 30 min ; la réaction a finalement été arrêtée par addition du mélange Tris-HCl et MnCl₂ (Nouari et al., 2016).

2.1.8. Effet du HDL sur le burst oxydatif

Le burst oxydatif (burst respiratoire) a été effectué par mesure du taux de monoxyde d'azote (NO) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) macrophagique (Iles et al., 2002; Nouari et al., 2016).

2.1.8.1. Dosage du monoxyde d'azote

Les niveaux de NO ont été évalués sur les surnageants en mesurant l'accumulation de métabolites oxydants stables (NOx, nitrite et Nitrate), avec la réaction colorimétrique sensible de Griess, en utilisant l'acide trichloracétique (TCA chlorure de Vanadium (III) et le réactif de Griess) comme décrit précédemment (Aribi et al., 2015). L'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde $\lambda=540$ nm sur le lecteur de plaque ELISA (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). La quantité de nitrite dans l'échantillon a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage standard dans un domaine de concentrations variant de 0 à 150 μ mol/L en nitrite de sodium.

2.1.8.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène

La concentration de H₂O₂ a été mesurée conformément à la méthode de Pick et Keisari (Pick and Keisari, 1980), modifiée ultérieurement par (Duane et al., 1993). Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une solution tampon rouge de phénol tampon (PRS)

(PHENOL RED PEROXIDE HRPO. La solution PRS a été préparée immédiatement avant l'analyse, en ajoutant du rouge phénol et du HRPO à 2,1 ml de PAB à une concentration finale de 0,46 mM et 0,046 U / mL, respectivement. Le mélange a été incubé pendant 1H à 37 °C. Les niveaux de H₂O₂ ont été mesurés par spectrophotométrie visible à λ= 610 nm contre un blanc (Pericone et al., 2000).

2.1.9. Dosage du calcium intracellulaire $_{i}Ca^{2+}$

Les niveaux des ions calcium libres intracellulaires ($_{i}Ca^{2+}$) ont été déterminés biochimiquement sur des lysats cellulaires avec la méthode de complexone orthocrésolphtaléine (OCP) (Gitelman, 1967), en fonction de la formation d'un complexe chromogène résultant de la réaction d'OCP avec des ions calcium dans une solution alcaline. Le contenu en ions calcium libre a été déterminé par spectrophotométrie Visible à λ=560 nm contre un blanc en utilisant un kit commercial (BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelone, Espagne). Les niveaux de $_{i}Ca^{2+}$ ont été exprimés en µg/mg de protéines.

2.1.10. Souche bactérienne utilisées : *Staphylococcus aureus*

La souche ATCC 6538 de *S. aureus* (American Type Culture Collection) a été utilisée pour la phagocytose et les tests de lyse bactérienne. Les bactéries ont été cultivées pendant 24h, dans le Bouillon Tryptique de Soja (TSB) à 37 °C. La densité optique (DO) de 0,5 turbidité de McFarland a été mesurée par colorimétrie à λ= 600 nm, puis confirmée par le nombre de bactéries estimé à 10⁸ CFU / mL (Rasigade et al., 2011).

2.1.11. Effet du HDL sur la phagocytose

Le test de phagocytose est basé sur une méthode modifiée décrite antérieurement (Gitelman, 1967; Hasty et al., 2005). La phagocytose de *S.aureus* par MDMS a été mesurée par le pourcentage de diminution du nombre de bactéries extracellulaires viables en suspension. 5 x 10⁵ de MDM ont été infectés par *S aureus* à MOI de 30. Après 1H d'incubation à 37°C dans 5% de CO₂ avec ou sans HDL, nous avons préparé une série de dilution à partir des surnageants, pour cela, 200 µl du mélange ont été placés sur la surface du milieu chapman. Les tests ont été effectués aux temps t0 et t60, pour déterminer le nombre d'unités formant des colonies bactériennes (UFC). Après une période d'incubation de 24-48h à 37 °C dans les boîtes de pétri, il a été possible de calculer le pourcentage de phagocytose conformément à la formule suivante:

$$\% \text{ phagocytose} = M_{t0} - 100 \times \frac{\frac{NEC}{NC_t / NC_0}}{M_{t0}}$$

Où:

Mt₀ est le nombre des bactéries dans le mélange à t₀,
NEC est le nombre des bactéries extracellulaires dans le mélange à t₁,
NC0 et NC1 correspondent au contrôle à t₀ et t₁, respectivement.

2.1.12. Effet du HDL sur la capacité bactéricide

Afin de lyser toutes les bactéries extracellulaires, les cellules phagocytaires infectées par S.aureus ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X et incubées pendant 1 h dans un milieu supplémenté avec 100 µg/mL de gentamicine. Après lavage avec du PBS 1X, 1 % de Triton X-100 dans du PBS a été ajouté dans certains puits pour lyser les macrophages et le nombre de bactéries intracellulaires a été déterminé au temps 0 (t₀). D'autres puits ont été incubés pendant 1 h (t₁) (Manni et al., 2011) dans un milieu sans antibiotique. La lyse a été arrêtée aux temps indiqués par addition de TSB (tryptic soy broth) et les bactéries intracellulaires et extracellulaires comptées après étalement des dilutions en série sur de la gélose au cétrimide, puis incubées pendant 48 heures à 37°C. Le nombre d'UFC a été lié à la suspension bactérienne originale. Des contrôles, y compris les puits de macrophages non infectés ou inoculés avec des bactéries seulement, ont été nécessaires pour tous les tests.

Deux conditions ont été prises en considération: (i) l'absence totale de colonies bactériennes dans les lysats de macrophages non infectés et (ii) la mort de toutes les bactéries incubées seules pendant une heure avec la gentamicine (<10 UFC). Une énumération au bleu Trypan a été effectuée pour vérifier la viabilité des macrophages après infection (Piao et al., 2012; Porto et al., 2011).

Le pourcentage de la lyse intracellulaire des bactéries a été calculée conformément aux méthodes décrites antérieurement (Aribi et al., 2015):

$$\% \text{ Capacité bactéricide} = 100 \times \left(\frac{N_{t0} - N_{t1}}{N_{t0}} \right), \text{ avec}$$

*N_{t0} et N_{t1} correspondent aux nombres des bactéries intracellulaires viables à t₀ et t₁.

2.1.13. Effet du HDL sur l'activité arginase

L'activité de l'arginase (EC 3.5.3.1) a été réalisée par un dosage spectrométrique basé sur la mesure de la concentration d'urée dans les lysats cellulaires après addition de l'arginine (Corraliza et al., 1994; Geyer and Dabich, 1971; Wynn et al., 2001). A cet effet, 25 ml de lysats cellulaires, activés par chauffage pendant 10 minutes à 56 °C, ont été ajoutés à une quantité aliquote (200 µl) de tampon d'arginine (L-arginine 10 mM, pH 6,4), puis incubés à 37 °C pendant 1 h. La réaction a été interrompue par ajout de 750

μL d'acide acétique (Dawson and Locher, 2006). La concentration d'urée générée après le catabolisme de l'arginine par l'arginase a été mesurée à $\lambda=600\text{ nm}$ à l'aide d'un kit commercial (UREA/BUN-COLOR, BioSystems, SA Costa Brava 30, Barcelone, Espagne). L'activité arginase a été exprimée en nanomoles d'urée libérés par mg de protéines par 1 h.

2.1.14. Effet du HDL sur les cytokines

Les niveaux de concentration d'IL-1b, d'IL-2, d'IFN-c, d'IL-4 et d'IL-10 ont été déterminés dans un système de co-culture contenant ou non des HDL. Ces cytokines ont été quantifiées avec des kits commerciaux respectifs, selon des instructions du fabricant (Sigma Aldrich Co., St. Louis, États-Unis). Les surnageants ont été incubés sous agitation pendant 2H et demi avec l'anticorps anti-cytokine primaire approprié, qui recouvre les puits d'une microplaque à raison de $100\ \mu\text{l}$ pour chaque cytokine. Après plusieurs lavages, $100\ \mu\text{L}$ d'anticorps biotinylés ont été ajoutés à chaque puits. Après une période d'incubation d'une heure, $100\ \mu\text{L}$ de streptavidine couplée à la peroxydase sont ajoutés aux différents puits. La révélation de l'activité enzymatique s'effectue après 45 min et $100\ \mu\text{L}$ de solution de substrat de tétraméthylbenzidine

(TMB) sont alors ajoutée à chaque puits. Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité, la réaction est finalement arrêtée par ajout de $50\ \mu\text{L}$ d'acide sulfurique. Les densités optiques sont alors immédiatement mesurées à $\lambda=450\text{ nm}$ (DO450)

avec un lecteur de plaques ELISA (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni).

2.1.15. Effet des HDL sur STAT4/STAT6

Les quantités relatives des tests STAT4 et STAT6 phosphorylés ont été effectuées dans des macrophages adhérents en utilisant les kits ELISA (Abcam, Allemagne), STAT4 (Tyr693) et STAT6 (Tyr641), selon les instructions du fabricant.

La méthode suivie consiste dans une première étape à incuber 5×10^5 cellules/ml dans une plaque de culture à 96 puits à $37\text{ }^\circ\text{C}$ et à 5% de CO_2 pendant 4 h. Dans une deuxième étape, les MDM seront activés avec 100 ng/mL de lipopolysaccharides (LPS) (*Escherichia coli* 0127: B8, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis) et traités ou non avec $50\ \mu\text{g/mL}$ de HDL, puis additionnés de 10 ng / mL de IFN- γ ou d'IL-4 pour la détermination de p-STAT4 et p-STAT6.

Après incubation pendant 30 min à $37\text{ }^\circ\text{C}$ dans 5% de CO_2 (Tiniakou et al., 2015), puis lavage des puits avec le tampon de lavage approprié (A), les cellules ont été fixées avec une solution contenant du formaldéhyde ($100\ \mu\text{l}$), puis incubées pendant 20 min à température ambiante. $200\ \mu\text{L}$ de solution de quenching ont été ensuite ajoutés à

chaque puits et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Après incubation d'une heure avec une solution de blocage de 100 µl, les puits furent lavés avec un deuxième tampon de lavage (B) et 50 µL d'anticorps primaire Anti-Phospho-STAT4 (Tyr693) et Anti-phospho-STAT6 (Tyr641) ont été ajoutés aux puits appropriés, puis incubés pendant 2 h à température ambiante. Enfin, 50 µl d'anticorps conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) furent à leur tour ajoutés aux puits appropriés.

Après 1 heure d'incubation, l'activité enzymatique a été révélée par ajout de TMB, puis incubé pendant 30 minutes dans l'obscurité. La réaction chromogène a été arrêtée par addition de 50 µL de solution d'arrêt d'acide phosphorique et l'absorbance a été mesurée à 450 nm. Les limites de détection étaient de 0,3 pg / mL pour l'IL-1b, 4 pg / mL pour l'IL-2, 8 pg / mL pour l'IFN-gamma, 10 pg / mL pour l'IL-4 et 1 pg / mL pour l'IL-10.

2.1.16. Analyse statistique des données

Toutes les expériences ont été répétées au minimum quatre fois et les données ont été présentées sous forme de valeurs \pm erreur standard de la valeur moyenne. Les analyses statistiques ont été effectués avec le logiciel SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney U ont été utilisés pour chercher des différences parmi tous les groupes et entre deux groupes respectifs (1990; Whitley and Ball, 2002). Une valeur du paramètre p inférieur à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

2.2. Résultats

Nous avons entrepris cette étude afin d'évaluer le rôle ex vivo des HDL, sur les contacts macrophages/lymphocyte T CD4 + chez les diabétiques de type 1. A cet effet nous avons testé plusieurs techniques dans notre laboratoire pour tenter de prouver pour la première fois que le HDL pouvait jouer avoir un rôle dans l'inhibition des contacts MDM/LT.

2.2.1. Effet du HDL sur la production d'IL-1 β

Les niveaux d'IL-1 β ont été mesurés en utilisant un dosage immunosorbant enzymatique en phase enzymatique (ELISA). Comme indiqué sur la Fig. 2, nous

remarquons que les niveaux de production de l'IL-1 β ont été augmentés dans la co-culture des cellules de DT1 par rapport aux niveaux des cellules des témoins sains ($p=$

0,029, a été obtenu par le test U de Mann Whitney). On remarque en outre, que le traitement par HDL a considérablement réduit la production de l'IL-1 β dans la co-culture des cellules de diabète DT1 par rapport aux cellules saines traitées par HDL ($p=0,014$, déterminé par le test U de Mann Whitney). Nous observons par ailleurs

que le traitement au HDL a entraîné une augmentation significative des taux de l'IL-1 β dans la co-culture des cellules de témoins sains ($p<0,01$ par le test U de Mann-Whitney). Pour toutes les comparaisons utilisant le test de Kruskal-Wallis, la valeur de p était $<0,01$.

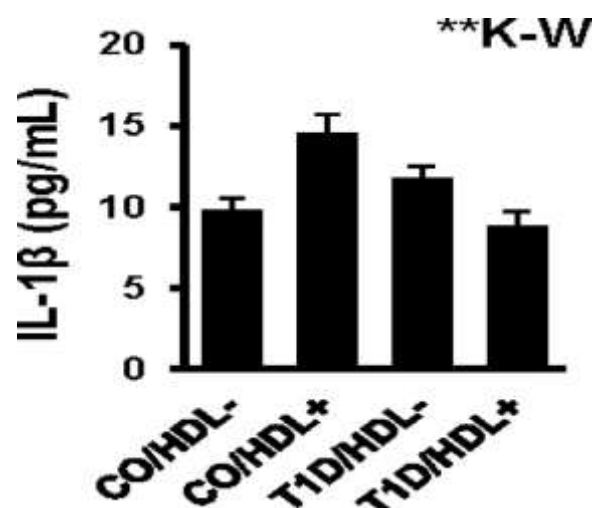


Figure. 2. 1. Effet du HDL sur la production d'IL-1 β dans le système de co-culture des macrophages/lymphocytes T CD4 + chez les diabétiques de type1. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes dans chaque groupe. HDL: lipoprotéines de haute densité, IL: interleukine, KW: test de Kruskal-Wallis, T1D: diabète de type 1, CO / HDL: cellules provenant de témoins sains non traités avec HDL, CO / HDL +: cellules provenant de témoins sains traités avec HDL, T1D / HDL: cellules T1D non traitées avec HDL, T1D / HDL +: cellules T1D traitées avec HDL. ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence parmi les différents groupes sont données comme suit par le test U de Mann-Whitney: CO / HDL vs. CO / HDL +, $p < 0,01$;

CO / HDL vs T1D / HDL, $p < 0,05$; CO / HDL + vs T1D / HDL, $p < 0,05$; CO / HDL + vs T1D / HDL +, $p < 0,01$; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,05$

2.2.2. Effet du HDL sur la production de l'IL-2.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 2.2., les niveaux de production de l'IL-2 ont été significativement augmentés dans la co-culture des cellules des DT1 par rapport à ceux des cellules de témoins sains ($p = 0,001$ par le test U de Mann Whitney). Nous constatons en plus, que le traitement au HDL a entraîné une diminution significative des niveaux de production de l'IL-2 dans la co-culture du DT1 et des cellules de témoins sains par rapport aux co-cultures sans HDL ($p < 0,001$ par test U de Mann-Whitney). La valeur de p obtenu d'après le test de Kruskal-Wallis était inférieure à 0,001.

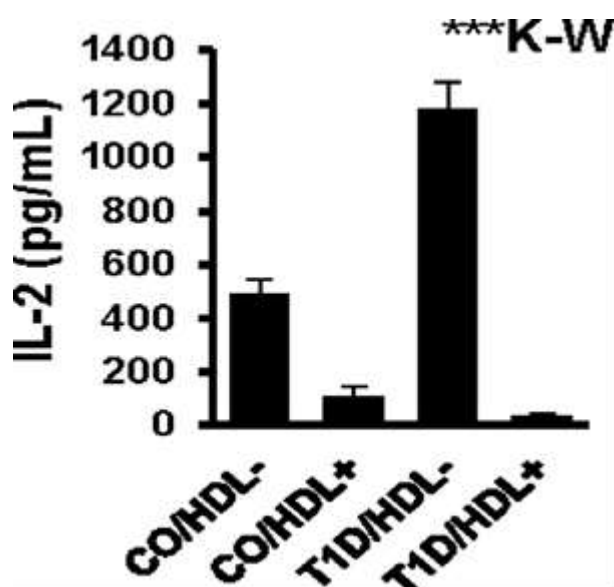


Figure. 2.2. Effet du HDL sur la production d'IL-2 dans le système de co-culture des macrophages / lymphocytes T CD4 +chez les diabétiques de type 1.

*** $p < 0,001$ par test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence parmi les différents groupes sont données comme suit par le test U de Mann-Whitney: CO / HDL vs. CO / HDL +, $p < 0,001$; CO / HDL vs. T1D / HDL, $p < 0,01$; CO / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$; CO / HDL + vs T1D / HDL, $p < 0,001$; CO / HDL + vs T1D / HDL +, $p < 0,01$; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$.

2.2.3. Effet du HDL sur la production de cytokines anti-inflammatoires / régulatrices IL-10

Comme le montre la figure 2.3, les niveaux de production de l'IL-10 sont significativement diminués dans la co-culture des cellules DT1 par rapport à ceux des cellules de témoins sains ($p = 0,004$ par le test U de Mann Whitney). Lorsque les cellules sont traitées au HDL, la co-culture des cellules DT1 et des contrôles, a montré une augmentation significative des niveaux de production de l'IL-10 (les valeurs respectifs de p étaient : $p < 0,001$ et $p = 0,035$ par test U de Mann-Whitney). Par contre en utilisant le test de Kruskal-Wallis, la valeur p était inférieure à 0,001.

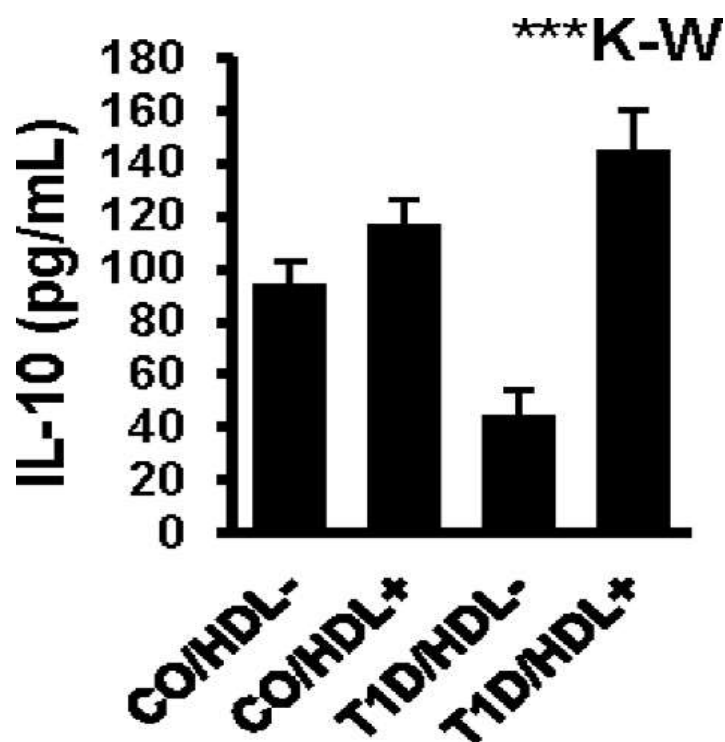


Figure. 2.3. Effet du HDL sur la production de cytokines anti-inflammatoires / régulatrices IL-10 dans le système de co-culture des macrophages /lymphocytes T CD4+ chez les diabétiques de type1. *** $p < 0,001$ par test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence parmi les différents groupes sont données comme suit par le test U de Mann-Whitney: CO / HDL vs. CO / HDL +, $p < 0,05$; CO / HDL vs. T1D / HDL, $p < 0,01$; CO / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,05$; CO / HDL + vs T1D / HDL, $p < 0,001$; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$.

2.2.4. Effet du HDL sur la production de cytokines liées à Th1 et Th2

La Figure 2.4 laisse apparaître des niveaux de production de l'IFN- γ significativement augmentés dans la co-culture des cellules DT1 par rapport aux niveaux des cellules de témoins sains; par contre les niveaux de production de l'IL-4 ont eux été significativement diminués (pour les deux comparaisons, $p < 0,001$ par le test U de Mann-Whitney). Nous remarquons par ailleurs que la production de l'IFN- γ a été pratiquement inhibée par traitement au HDL, c'est à dire dans la co-culture de DT1 et des cellules de témoins sains ($p < 0,001$ par test U de Mann-Whitney). D'un autre côté, nous constatons que le HDL a considérablement régulé la production d'IL-4 dans la co-culture de cellules de DT1 et de témoins sains par rapport à celle des cellules non traitées par HDL. La différence n'a pas atteint un niveau significatif pour les cellules de témoins sains (les valeurs respectives obtenues pour p sont ; $p < 0,001$ et $p = 0,070$ par test U de Mann-Whitney), alors que pour les deux cytokines, $p < 0,001$ par test de Kruskal-Wallis.

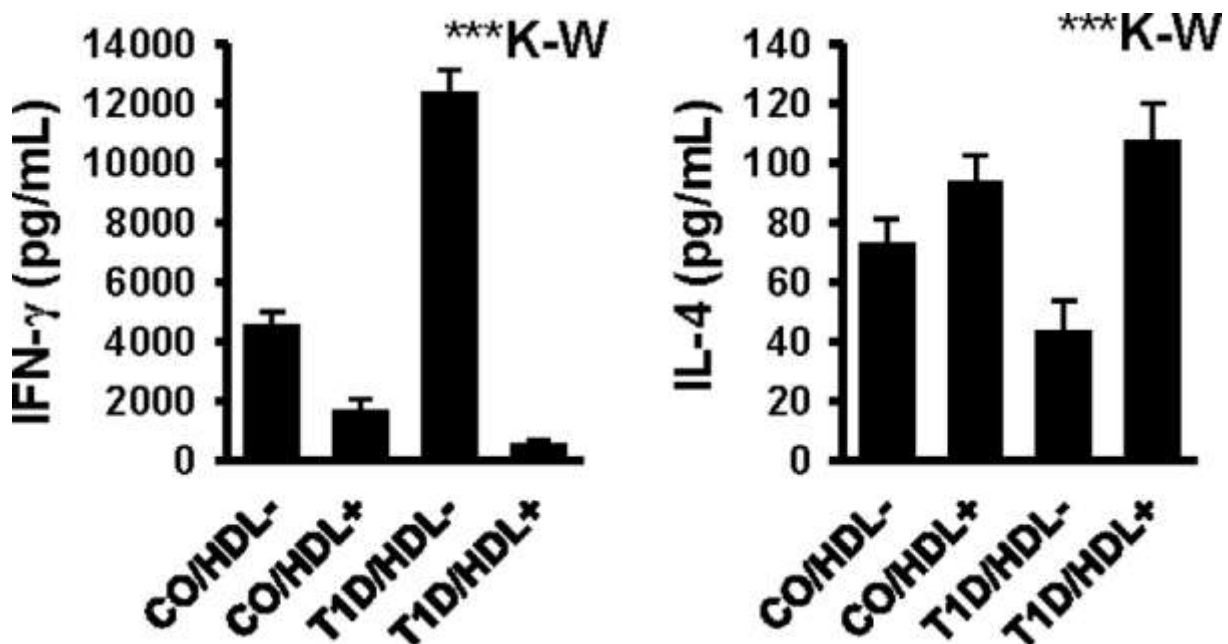


Figure. 2.4. Effet du HDL sur la production de cytokines liées au Th1 et Th2 dans le système de co-culture des macrophages/ lymphocytes T CD4+ chez les diabétiques. HDL: lipoprotéines de haute densité, IL: interleukine, IFN-c: interféron gamma, KW: test de Kruskal-Wallis, T1D: diabète de type 1, Th: T helper, CO / HDL: cellules provenant de témoins sains non traités avec HDL, CO / HDL +: cellules provenant de témoins sains traités avec HDL, T1D / HDL: cellules T1D non traitées avec HDL, T1D / HDL +: cellules T1D traitées avec HDL. *** $p < 0,001$ par test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence parmi les différents groupes sont données comme suit par le test U de Mann-Whitney:

(i) IFN-c; CO / HDL vs. CO / HDL +, $p < 0,001$; CO / HDL vs. T1D / HDL, $p < 0,001$; CO / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$; CO / HDL + vs T1D / HDL, $p < 0,001$; CO / HDL + vs T1D / HDL +, $p < 0,001$; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$, (ii) IL 4; CO / HDL vs. T1D / HDL, $p < 0,001$; CO / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,05$; CO / HDL + vs T1D / HDL, $p < 0,001$; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$.

2.2.5. Effet du HDL sur les ions de calcium libres intracellulaires $_{if}Ca^{2+}$

La Figure 2.5, montre des niveaux de $_{if}Ca^{2+}$ augmentés dans les co-cultures de DT1 par rapport à ceux des cellules des témoins sains; bien que la différence n'a pas atteint un niveau significatif ($p > 0,05$ par le test U de Mann-Whitney). On remarque en outre, le traitement par HDL a provoqué une légère augmentation des taux de $_{if}Ca^{2+}$ dans les co-cultures DT1; malgré une différence non statistiquement significative ($p > 0,05$ par le test U de Mann-Whitney). La valeur p pour les comparaisons multiples était égale à 0,003 (test de Kruskal-Wallis).

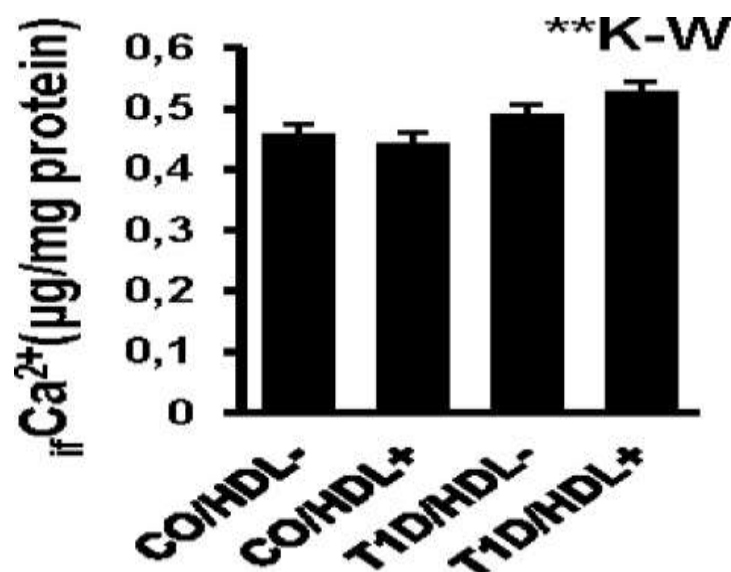


Figure. 2.5. Effet du HDL sur les ions de calcium intracellulaires libres dans le système de co-culture des macrophages T1D humains et des lymphocytes T CD4 +. Les niveaux d'ions de calcium intracellulaires libres ont été mesurés biochimiquement par la méthode de la complexone ortho-crésolphtaline-complexe. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de cinq expériences indépendantes dans chaque groupe. HDL: lipoprotéines de haute densité, $_{if}Ca^{2+}$: ions de calcium intracellulaires libres, KW: test de Kruskal-Wallis, T1D: diabète de type 1, CO / HDL: cellules provenant de témoins sains non traités avec HDL, CO / HDL +: cellules provenant de témoins sains traités avec HDL, T1D / HDL: cellules T1D non traitées avec HDL, T1D / HDL +: cellules T1D traitées avec HDL. ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal-Wallis. Aucune différence statistique n'a été mise en évidence parmi les différents groupes.

2.2.6. Effet du HDL sur l'activité arginase

On constate sur la Figure 2.6, des niveaux d'activité de l'arginase diminués dans les co-cultures de DT1 par rapport aux niveaux des cellules issues de témoins sains; la différence elle n'était pas significative ($p > 0,05$ par le test U de Mann-Whitney). De plus, le traitement par HDL a entraîné une régulation ascendante de l'activité de l'arginase dans la co-culture des cellules DT1 par rapport aux cellules DT1 traitées par HDL ($p < 0,001$ par test U de Mann-Whitney); cependant le traitement HDL n'a pas entraîné une différence entre les co-cultures des deux cellules à partir de témoins sains ($p > 0,05$ par le test U de Mann-Whitney). Pour toutes les comparaisons, $p = 0,005$ par test de Kruskal-Wallis.

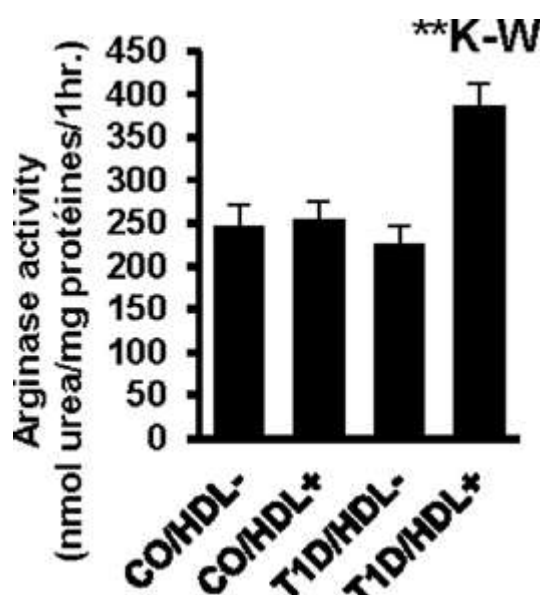


Figure. 2.6. Effet du HDL sur l'activité de l'arginase dans le système de co-culture des macrophages T1D humains et des lymphocytes T CD4 +.

Les niveaux d'activité de l'arginase ont été déterminés par spectrophotométrie par mesure de la concentration d'urée après l'addition de Larginine. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm erreur standard de moyenne (SEM) de cinq expériences indépendantes dans chaque groupe. HDL: lipoprotéines de haute densité, KW: test de Kruskal-Wallis, T1D: diabète de type 1, CO / HDL: cellules provenant de témoins sains non traités avec HDL, CO / HDL +: cellules provenant de témoins sains traités avec HDL, T1D / HDL: Cellules T1D non traitées avec HDL, T1D / HDL +: cellules T1D traitées avec HDL. ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence parmi les différents groupes sont données comme suit par le test U de Mann-Whitney: CO / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,01$; CO / HDL + vs T1D / HDL +, $p < 0,001$; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$

2.2.7. Effet du HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages

La production du NO et du H₂O₂ est considérée comme biomarqueurs du burst oxydatif du macrophage. Les concentrations du NO ont été déterminées dans les surnageants de culture par la méthode sensible de Griess ; alors que les concentrations du H₂O₂ étaient évaluées dans les lysats des co-cultures macrophages/lymphocyte T CD4+.

Les résultats de la Figure 2.7, montrent que le burst oxydatif, évalué par la production de NO et H₂O₂, a été significativement augmenté dans la co-culture des cellules de DT1 par rapport à celui des cellules de témoins sains (pour la production de NO, $p < 0,001$ et pour H₂O₂, $p < 0,01$ par test U de Mann-Whitney). Ces résultats démontrent de façon claire les effets du traitement par HDL car :

- i) il a considérablement réduit les niveaux de production de NO et de H₂O₂ dans la co-culture des cellules DT1 (pour les deux variables, $p < 0,001$ par test U Mann-Whitney).
- ii) il a entraîné une importante régulation négative des deux biomarqueurs du burst respiratoires des macrophages dans la co-culture des cellules de témoins sains (production de NO, $p < 0,001$, H₂O₂, $p = 0,003$ par test de Mann-Whitney U).

Les résultats de la phagocytose et les tests de lyse bactérienne ont montré des différences significatives à la fois dans la phagocytose et dans les niveaux de mortalité bactérienne entre les co-cultures de DT1 et les cellules de témoins sains (pour les deux dosages, $p > 0,05$ par test U Mann-Whitney). Le traitement par HDL a lui entraîné une diminution significative des niveaux de phagocytose et de lyse bactérienne dans les deux co-cultures de cellule DT1 et de cellules témoins ($p < 0,001$ pour toutes les comparaisons par le test U de Mann-Whitney). Lors de la comparaison des activités globales des macrophages entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis, les valeurs de p étaient inférieures à 0,001 pour toutes les variables ($p < 0,001$ pour toutes les comparaisons par le test U de Mann-Whitney). Lors de la comparaison des activités fonctionnelles des macrophages globales entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis, les valeurs p étaient inférieures à 0,001 pour toutes les variables.

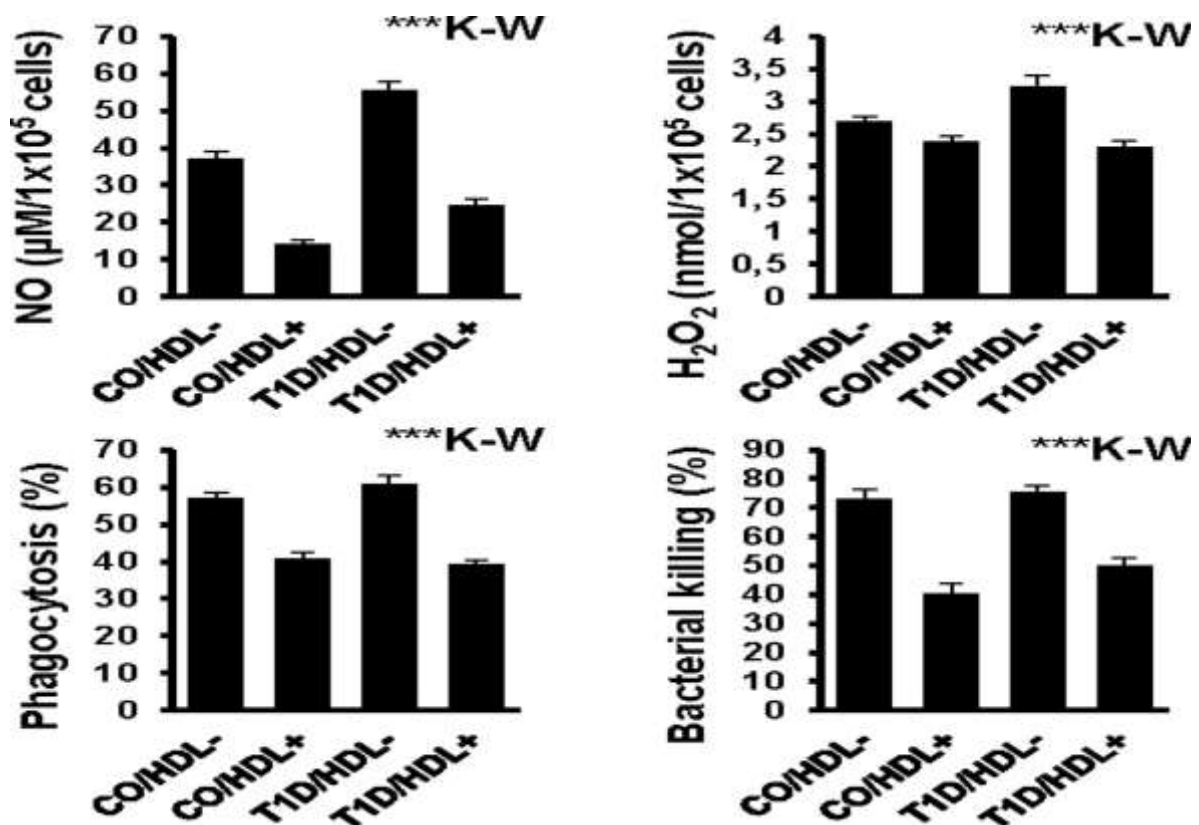


Figure. 2.7. Effet du HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages dans le

système de co-culture des macrophages/ lymphocyte T CD4+ chez les diabétiques de type 1. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM)

de quatre (essais 'activité phagocytaire et bactéricide des macrophages.) ou de cinq expériences indépendantes (essai de NO et H₂O₂) dans chaque groupe. *** p <0,001 par test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiques mises en évidence parmi les différents groupes sont données comme suit par le test U de Mann-Whitney: (i) production de NO; CO / HDL vs. CO / HDL +, p <0,001; CO / HDL vs. T1D / HDL, p <0,001; CO / HDL vs. T1D / HDL +, p <0,001; CO / HDL + vs T1D / HDL, p <0,001; CO / HDL + vs T1D / HDL +, p <0,001; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, p <0,001, (ii) production de H₂O₂; CO / HDL vs. CO / HDL +, p <0,001; CO / HDL vs. T1D / HDL, p <0,001; CO / HDL vs. T1D / HDL +, p <0,001; CO / HDL + vs T1D / HDL, p <0,001; CO / HDL + vs T1D / HDL +, p <0,001; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, p <0,001, (iii) Phagocytose; CO / HDL vs. CO / HDL +, P <0,001; CO / HDL vs. T1D / HDL +, p <0,001; CO / HDL + vs T1D / HDL, p <0,001; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, p <0,001, (iv) Blessure bactérienne; CO / HDL vs. CO / HDL +, p <0,001; CO / HDL vs. T1D / HDL +, p <0,001; CO / HDL + vs T1D / HDL, p <0,001; CO / HDL + vs T1D / HDL +, p <0,01; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, p <0,001.

2.2.8. Effet du HDL sur la phosphorylation STAT4 et STAT6 dans les macrophages stimulés par les cytokines respectives Th1 et Th

La Figure 2.8, laisse apparaitre des taux relatifs de phosphorylation de tyrosine STAT4 (p-STAT4, Tyr693) significativement augmentés dans les macrophages de DT1 par rapport à ceux des témoins sains; et des taux considérablement diminués pour ceux de

p-STAT6 (Tyr641) ; pour les deux comparaisons, $p < 0,001$ par test U de Mann-Whitney. Nous observons en outre, que les niveaux relatifs de p-STAT4 ont été significativement réduits pour des macrophages de DT1 traités avec HDL, en revanche, ceux de la phosphorylation STAT6 ont été régulés (pour les deux comparaisons, $p < 0,001$ par Mann-Whitney U test). Des résultats similaires ont été observés pour des macrophages issues de témoins sains traités au HDL (p-STAT4; $p = 0,006$, p-STAT6; $p = 0,001$ par test de Mann-Whitney U). Pour la comparaison entre les groupes par le test de Kruskal-Wallis, la valeur p était inférieure à 0,001 pour les deux p-STAT4 et p-STAT6.

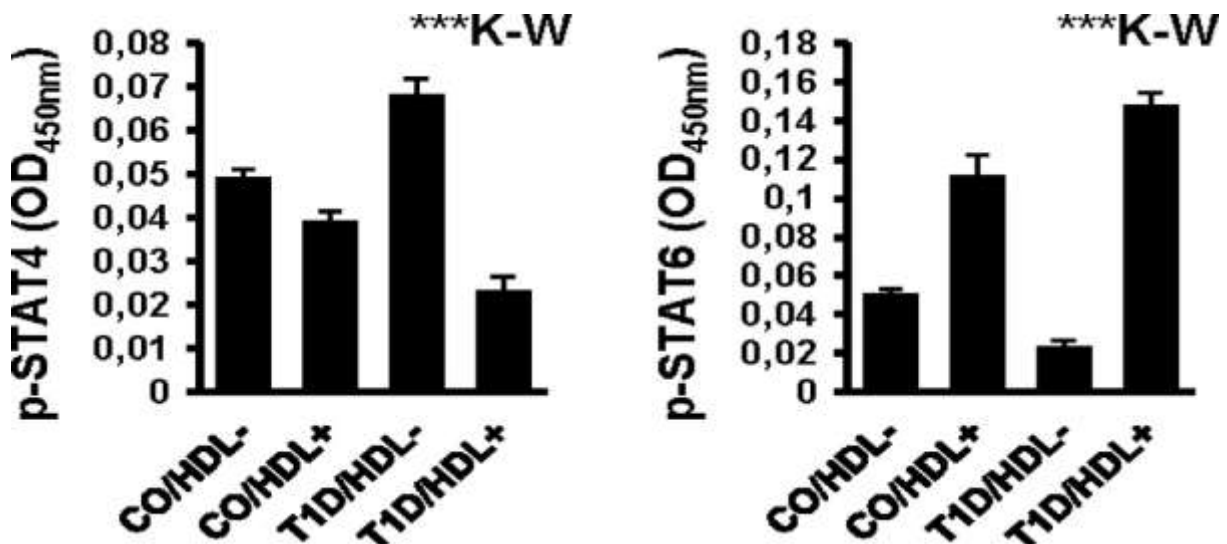


Figure 2.8. Effet du HDL sur la phosphorylation STAT4 et STAT6 dans les macrophages stimulés par les cytokines respectives Th1 et Th2. Les valeurs

correspondent à la moyenne \pm standard Erreur de moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes dans chaque groupe, pour les deux STAT4 et STAT6 essais de phosphorylation. HDL: lipoprotéines de haute densité, K-W: Test de Kruskal-Wallis, p-STAT: transducteur de signal phosphorylé et activateur de Transcription, T1D: diabète de type 1, *** $p < 0,001$ par test de Kruskal-Wallis. Différences statistiques mises en évidence parmi Différents groupes sont donnés comme suit par le test U de Mann-Whitney: (i) p-STAT4; CO/ HDL vs. CO / HDL +, $p < 0,01$; CO / HDL vs. T1D / HDL, $p < 0,001$; CO / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$, CO / HDL + par rapport à T1D / HDL, $p < 0,001$; CO / HDL + vs T1D / HDL +, $P < 0,01$; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$, (ii) p-STAT6; CO / HDL vs. CO / HDL +, $P < 0,01$; CO / HDL vs. T1D / HDL, $p < 0,001$; CO / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$, CO / HDL + vs T1D / HDL, $p < 0,001$; CO / HDL + vs T1D / HDL +, $p < 0,01$; T1D / HDL vs. T1D / HDL +, $p < 0,001$

2.3. Discussion

La littérature rapporte que plusieurs études ont confirmé les propriétés anti-athérogène, anti-inflammatoire, antioxydant et antiapoptotique des HDL (Kameda et al., 2015; Mineo et al., 2006). Certaines études ont démontré que le traitement avec HDL peut inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IL-1 β secrétée par les macrophages (Negre-Salvayre et al., 2006). D'autres études ont confirmé le rôle des HDL à exercer de multiples effets d'immuno-modulation. Il est cependant connu que les radeaux lipidiques de la membrane plasmique sont la structure clé responsable des effets résultant de l'épuisement du cholestérol à partir des microdomaines après leur interaction avec l'HDL (Larbi et al., 2014). Il est aussi connu que, les HDL ont la capacité de conduire le macrophage à l'état anti-inflammatoire M2, modulent le recrutement / l'adhésion des monocytes et inhibent leur réponse inflammatoire (Feig et al., 2011). Il a de plus été confirmé que les HDL peuvent inhiber la présentation de l'antigène, l'activation et la prolifération des lymphocytes T (Wang et al., 2012). Ces effets donnent un aspect important de l'action des HDL sur les réponses immunitaires innées et adaptées (Catapano et al., 2014). Compte tenu de ces nouvelles idées, nous avons entrepris d'évaluer pour la première fois l'effet du HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages et sur la modulation de la production de cytokines pro et anti-inflammatoires lors de la diaphonie des lymphocytes T de macrophage ex vivo - CD4 + au type humain à déclenchement récent 1 diabète.

2.3.1. Effet du HDL sur la production d'IL-1 β

Bien que l'IL-1 β puisse être généré par différentes lignées cellulaires, y compris les cellules Th17 polarisées (Martin et al., 2016), elle est considérée comme une cytokine de signature pour les macrophages pro-inflammatoires classiquement activés (CAM, M1) (Alvarez et al., 2016; Bułdak et al., 2016; Nouari et al., 2016). C'est un médiateur inflammatoire impliqué dans une variété d'activités cellulaires, y compris la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose.

Dans cette présente étude, nous avons observé que le traitement par HDL a d'une part diminué les taux de l'IL-1 β dans la co-culture des cellules DT1, mais qu'il a d'autre part régulé la production de cette cytokine dans la co-culture des cellules de témoins sains. Un nombre restreint d'études ont montré l'effet inhibiteur des HDL ou leur contenu sur la production de cytokines pro-inflammatoires (Carpintero et al., 2010; Hyka et al., 2001), nous ne pouvons toutefois comparer nos résultats par manque de données

bibliographiques exploitables. En outre, les résultats contradictoires peuvent refléter en partie les différences dans le type de maladie étudiés et le type de cellules utilisés.

2.3.2. Effet du HDL sur la production d'IL-2

L'IL-2 a été caractérisée, en tant que cytokine Th1 (Hwang et al., 2005), celle-ci joue un rôle central dans l'activation et la prolifération des lymphocytes, qui ont été amorcés par des antigènes. Cette cytokine a un rôle pleiotropique, qui conduit à la différenciation, à la survie et à l'expansion de multiples types de cellules (Long et al., 2013), en stimulant les gènes anti-apoptotiques, du cycle cellulaire et des cytokines. Notre étude, a révélé que le traitement par HDL a entraîné une diminution de la production d'IL-2. Dans le diabète de type 1, la diminution de la production d'IL-2 pourrait être une épée double, car l'activation de cellules régulatrices protégeant les cellules β contre les lymphocytes T auto-réactifs, nécessite la présence d'une telle cytokine. Ainsi, bien que l'IL-2 joue un rôle clé dans l'activation et l'expansion des lymphocytes T, il n'empêche qu'elle sert de régulateur négatif de l'auto-immunité (Sharma et al., 2011). Cette observation conduit à établir l'hypothèse que les HDL pourraient avoir un effet conséquent sur la fonction des cellules régulatrices dans le DT1 humain.

2.3.3. Effet du HDL sur la production de la cytokine régulatrice/anti-inflammatoire l'IL-10.

L'IL-10 est fréquemment appelée cytokine anti-inflammatoire dérivée de cellules Th2 qui joue un rôle crucial et souvent essentiel dans la prévention des pathologies inflammatoires et auto-immunes (Asadullah et al., 2003). Elle est spécifiquement produite comme une cytokine régulatrice par les lymphocytes CD4 + T régulateurs de type 1 (Tr1) (Yao et al., 2015), et aussi par les macrophages anti-inflammatoires (M2) (Nakamura et al., 2015; Oishi et al., 2016; Stijn et al., 2015). L'activité immunosuppressive de l'IL-10 est médiée par un récepteur hétérodimère d'IL-10 (IL-10R1, IL-10R2). Bien que le complexe du récepteur de l'IL-10 soit exprimé à des degrés divers dans une myriade de types de cellules, les monocytes et les macrophages semblent être la cible principale de l'IL-10. La ligature des récepteurs active la signalisation JAK/STAT, ce qui entraîne de grands changements dans le profil d'expression des gènes immunomodulateurs, cet effet, servira à inhiber la libération de médiateurs pro-inflammatoires, et à diminuer la présentation et la phagocytose de l'antigène (Iyer and Cheng, 2012).

Par ailleurs, l'IL-10 peut aussi agir sur les cellules T régulatrices pour maintenir l'expression du facteur de transcription Foxp3 (Wang et al., 2016), ce qui peut conduire

au développement d'une anergie dans des cellules T spécifiques in vitro (Akdis and Blaser, 1999). Compte tenu de cela, il a été considéré comme une molécule de biomarqueur critique pour la prévention des pathologies inflammatoires et auto-immunes (Sabat et al., 2010). Ce qui est intéressant c'est qu'en diminuant le nombre et/ou la fonction des cellules régulatrices, elle s'est révélée être impliquée dans le développement du DT1. Nous confirmons ici les résultats récents concernant la diminution des niveaux d'IL-10 dans le DT1 (Cetkovic-Cvrlje et al., 2016; Kikodze et al., 2013; Ysmail-Dahlouk et al., 2016). En outre, l'effet des HDL sur l'augmentation de l'expression de l'IL-10 pourrait être démontré par l'observation récente indiquant que le HDL et son principal composant protéique l'apoA-I exercent des effets anti-inflammatoires, inhibent l'adhésion des monocytes et réduisent le contenu des macrophages vasculaires dans des conditions inflammatoires, et aussi régulent l'expression de l'IL-10 induite par le LPS (Smythies et al., 2010).

Cependant, la difficulté réside dans le manque d'études similaires sur le DT1 qui nous permettent d'établir une comparaison logique de nos résultats. Il serait en outre très intéressant de déterminer, à l'aide d'une étude mécanistique, le type de cellule capable de constituer un moteur de la modification des niveaux d'IL-10.

2.3.4. Effet du HDL sur la production de cytokines liées à Th1 et Th2

Il est établi que le diabète de type 1 résulte de la destruction des cellules β par des cellules T auto réactives, suite à l'action de cytokines pro-inflammatoires. Certaines recherches ont suggéré que les cytokines IFN- γ , IL-1 β et IL-2 produites par les lymphocytes T et les macrophages jouent un rôle important dans le DT1 et sont considérées comme des médiateurs du stress et de la mort des cellules β (Graham et al., 2012). Les activités immunitaires des cellules Th1 et Th2 sont mutuellement contre-régulées, définissant un équilibre Th1 / Th2 et un contrôle homéostatique. Les cytokines qui favorisent l'activité Th1 ont tendance à réguler négativement l'activité Th2, et à leur tour la domination Th2 inhibe l'activité Th1. L'équilibre entre la production des cellules T helper de l'IFN- γ par opposition à l'IL-4 et à l'IL-10 est particulièrement important, car les cytokines IL-4 et IL-10 inhibent l'activité Th1 et la cytokine IFN- γ inhibe l'activité Th2. Des études rapportent d'autre part que le déséquilibre dans la polarisation des lymphocytes T contribuait à la différence entre les sexes dans le développement du DT1 chez les souris NOD (Sia, 2005), dans lequel la sensibilité accrue des souris femelles au développement du DT1, a été liée à l'amélioration de la réponse immunitaire Th1, grâce à l'augmentation de l'activation des STAT4 induite par IL-12 (Bao et al., 2002). Les résultats de notre étude qui montrent des niveaux accrus d'IFN- γ et/ou une diminution des niveaux de l'IL-4, corroborent de nombreuses études (Bluestone et al., 2010; Kikodze et al., 2013; Mahmoud et al., 2015; Singh et al., 2015; Ysmail-Dahlouk et al., 2016). Ils

montrent en outre des niveaux des deux cytokines inversés après un traitement par HDL, ce qui a induit une régulation négative de l'IFN γ et une régulation ascendante de l'IL-4. Nos résultats se révèlent ainsi en accord avec une étude récente menée spécifiquement sur les macrophages polarisés M1 et M2 (Sanson et al., 2013).

Toutefois, l'interprétation de nos résultats est rendue difficile par manque de données comparatives complémentaires, et par le fait que nous sommes pionniers dans l'étude des effets des HDL sur la modulation de l'expression de ces cytokines dans le DT1.

2.3.5. Effet du HDL sur les ions de calcium libres intracellulaires

Bien qu'aucun effet n'a été observé dans les co-cultures de cellules de témoins sains, nous avons pu observer que le traitement par HDL induit une augmentation des niveaux de Ca^{2+} dans la co-culture des cellules de DT1. Il est bien connu que le HDL entraîne une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire dans différents types de cellules en culture, y compris les cellules endothéliales (Mineo and Shaul, 2012) et les macrophages (Al-Jarallah et al., 2014). L'augmentation des niveaux des ions Ca^{2+} peut être impliquée en tant que second messager pour l'activation précoce des lymphocytes T CD4⁺ et induire la production d'IL-2 (Au-Yeung et al., 2014; Gardner, 1989). Nos résultats démontrent ainsi de façon claire que, bien que les niveaux d'IL1 β ; d'IL-2, et d'autres marqueurs proinflammatoires aient diminué par traitement au HDL, les niveaux des ions Ca^{2+} ont eux été augmentés, ce qui s'explique principalement par une diaphonie entre les voies de signalisation cellulaire dépendantes du calcium. D'autre part, il a été rapporté que les niveaux accrus du Ca^{2+} pouvaient également servir, de signal pour que les macrophages modulent l'inflammation (Beceiro et al., 2017) et le burst respiratoire (Hoyal et al., 1996) et de moyen important pour la régulation de l'activation des lymphocytes T, la tolérance des auto-antigènes, et l'homéostasie à travers la diaphonie (Fracchia et al., 2013). Il reste enfin à voir si l'effet de régulation négative du HDL sur l'inflammation serait indépendant du calcium.

2.3.6. Effet du HDL sur les activités fonctionnelles des macrophages

Il a déjà été montré dans le modèle des souris diabétiques que le stress oxydatif est l'un des principaux facteurs impliqués dans la destruction des îlots de

Langerhans (Haskins et al., 2003). Les macrophages peuvent augmenter le stress oxydatif pendant le burst respiratoire en produisant les ROS et les RNS, y compris le NO et l' H_2O_2 (Forman and Torres, 2002; Seres et al., 2000), et participent donc à la mort de la cellule β . Il est à noter que l'évaluation du rôle des macrophages dans la pathogenèse du DT1 devrait tenir compte de toutes ses activités fonctionnelles, à savoir non seulement le burst oxydatif, mais aussi l'activité de la phagocytose et la destruction

bactérienne intracellulaire. Nous avons observé dans notre étude, que le traitement par HDL entraînait une diminution significative des activités fonctionnelles globales des macrophages. Une étude récente a elle démontré que le HDL joue un rôle clé dans la régulation de l'activité des cellules phagocytaires par ApoA-I et apoA-II et la stabilisation du transporteur de cassette ATP binding endogène A7 (ABCA7) (Tanaka et al., 2010). Nos résultats peuvent ainsi être considérés comme compatibles avec les rapports des études précédentes qui affirment que les HDL sont capables de diminuer le burst oxydatif dans les neutrophiles polymorpho-nucléaires (PMN) (Kopprasch et al., 2004).

2.3.7. Effet du HDL sur l'activité arginase

L'arginase est considéré comme l'un des principaux médiateurs anti-inflammatoires dans les macrophages. Le NO peut être synthétisé directement par la conversion enzymatique de l'arginine par la NO synthase inductible de type II (iNOS). L'iNOS et l'arginase sont induits dans les macrophages activés. Elles sont en concurrence pour leur substrat commun, L-arginine. L'action enzymatique de l'arginase sur l'arginine se traduit par la génération de L-ornithine et l'urée. L'arginase inhibe la production de NO, mais aussi l'activation des cellules T en diminuant les niveaux de L-arginine (Najac et al., 2016), et cela semble être un mécanisme essentiel de l'immunosuppression associée à l'inflammation. Par conséquent, une augmentation de l'activité de l'arginase et / ou de la diminution des niveaux de production de NO pourrait être utilisée comme un bon marqueur de l'efficacité des anti-inflammatoires ou pour vérifier le rôle des molécules bioactives soupçonnées avoir un effet anti-inflammatoire ou immuno-modulateur. Nous montrons ainsi dans ce travail, pour la première fois que le HDL est capable d'augmenter et de réguler l'activité de l'arginase dans le diabète de type 1.

2.3.8. L'effet du HDL sur la phosphorylation STAT4 et STAT6 dans les macrophages stimulés par les cytokines respectives Th1 et Th2.

Les protéines STAT sont impliquées dans la régulation de divers processus cellulaires tels que la croissance, la différenciation, la survie et l'apoptose, ainsi que les cytokines induites par la réponse immunitaire. Les STAT sont activés par Janus tyrosine kinases (JAK), qui à leur tour sont activées par des cytokines. Les STAT4 sont nécessaires pour le développement de cellules Th1 et sont principalement activés par IL-12, mais peuvent également être activés avec le micro-environnement enrichi en cytokine IFN- γ . En revanche, les STAT6 sont activés par l'IL-4 et sont essentiels pour le développement des cellules Th2. Nos résultats confirment ceux récemment démontrés dans les monocytes

de DT1 (Ysmail-Dahlouk et al., 2016). En outre, de nouvelles approches thérapeutiques du HDL pourraient être démontrées dans la présente étude, notamment celles mettant en évidence sa propriété anti-inflammatoire potentielle, ce traitement des macrophages avec du HDL pourrait donc aboutir à une régulation élevée de la phosphorylation de STAT6 sur la tyrosine 641 (Y641) et à une régulation négative de celle de STAT4 sur la tyrosine 693 (Y693) chez les DT1 nouvellement diagnostiqués.

2.4. Conclusion :

Notre étude a pu ainsi soutenir l'hypothèse selon laquelle les lipoprotéines de haute densité sont capables de moduler à la fois les activités fonctionnelles des macrophages et la réponse immuno-inflammatoire lors de la diaphonie des macrophages/lymphocytes T CD4+, au début du diabète humain de type 1.

Chapitre 3

Conclusions et perspectives

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune spécifique d'un organe caractérisée par une carence absolue en insuline, due à une destruction progressive et sélective des cellules β pancréatiques. L'incidence de la maladie n'a cessé d'augmenter dans le monde pendant les dernières décennies. Le DT1 est donc considéré comme un problème de santé publique majeur.

Le HDL ou bon cholestérol, est connu pour ses effets bénéfiques au corps humain. Ces dernières années plusieurs d'études ont montré un intérêt particulier pour les HDL à cause de leurs propriétés anti-athérogène, anti-inflammatoire, antioxydante, et anti-apoptotique. Certains auteurs ont montré que les HDL inhibent l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. Collectivement, ces effets constituent un aspect important de l'action du HDL sur l'immunité innée et adaptative.

Le métabolisme du HDL représente une cible majeure pour le développement de thérapies. Beaucoup d'études ont mis en évidence la complexité et le rôle intrigant du HDL dans différentes conditions pathologiques, telles que les infections, les néoplasmes et les maladies auto-immunes. En outre, il semble que le HDL, pourrait avoir un rôle dans l'inhibition de l'apoptose des cellules bêta et un effet bénéfique sur la survie de ces cellules. Ces effets combinés nous ont amené à émettre l'hypothèse suivante : la capacité des HDL à protéger les cellules β pourrait être un mécanisme préventif pour le DT1. Il est alors impératif d'évaluer son effet sur les activités fonctionnelles des macrophages et sur la modulation de la production de cytokines pro et anti-inflammatoires au cours du processus du diabète de type 1.

Dans ce présent travail, nous nous sommes proposé de vérifier l'hypothèse avancée précédemment.

Pour ce faire, nous avons commencé par évaluer l'effet du HDL sur la balance TH1/TH2 par le moyen de dosages variés de cytokines pro et anti inflammatoires (IL1 β , IL2, IFN- γ , IL4, IL10). Les résultats obtenus, ont permis non seulement de confirmer l'effet inhibiteur du HDL à présenter les antigènes aux cellules T, mais aussi, de prouver sa capacité à conduire les macrophages à un état anti inflammatoire M2. Ils démontrèrent de façon plus étendue les effets anti-inflammatoires et immuno-régulateurs du HDL au début du DT1.

Ces résultats, nous ont permis ainsi d'établir les rôles des HDL sur l'activité fonctionnelle des macrophages, d'abord sur le burst oxydatif, en évaluant le taux de la production du NO et du H₂O₂ par le macrophage, puis sur l'activité de la phagocytose et la destruction

bactérienne intracellulaire des macrophages. Nous sommes ainsi en mesure d'avancer que : le traitement par HDL, engendrerait sans nul doute une diminution des activités fonctionnelles globales des macrophages. Ces résultats bien que précurseurs, ils méritent une attention particulière, et nécessitent plus de confirmations pour vérifier et étayer l'hypothèse proposée.

Par ailleurs, aucune étude sur la signification biologique des protéines STAT4 / STAT6 dans les cellules β pancréatiques n'a été menée à ce jour. Cette étude se veut donc une contribution vers le développement de l'effet du HDL, sur la balance STAT4 / STA6 dans le diabète de type 1 et une confirmation du HDL à induire la phosphorylation de STAT6. En outre, l'analyse quantitative nous a permis de prouver pour la première fois que le HDL était capable de conduire les macrophages vers un état anti-inflammatoire M2, comme en témoigne l'induction du marqueur majeur Arg-1. Ces effets dépendaient du STAT6 qui est également utilisé par un inducteur classique de l'état M2 qui est l'IL-4.

En termes de perspectives, Il serait intéressant d'essayer :

- i) d'autres approches du mécanisme moléculaire du HDL sur les populations individuelles des deux cellules ;
- ii) de voir ses effets sur la présentation de l'antigène et les contacts cellule-cellule.

En plus, bien qu'il soit maintenant établi que les cellules T CD4 + et les monocytes/macrophages isolés des diabétiques de type 1, présentent une caractéristique inflammatoire et sécrètent des taux accrus de cytokines pro-inflammatoires, il serait judicieux de déterminer les populations de départ des lymphocytes T CD4 +, les sous-ensembles des macrophages, et les niveaux de base des cytokines produites par chacun d'eux. En outre, il serait intéressant de vérifier mécaniquement l'effet du HDL sur les ifCa^{2+} dans les cellules mononucléaires immunitaires lors du DT1 nouvellement diagnostiqué. Enfin, l'évaluation clinique serait toujours nécessaire pour déterminer l'impact in vivo du HDL chez les patients diabétiques de type 1 nouvellement diagnostiqués pour inverser l'activation des voies inflammatoires.

Chapitre 4

Bibliographie

Chapitre 4

Bibliographie

A

Ablamunits, V., Elias, D., Reshef, T., and Cohen, I.R. (1998). Islet T cells secreting IFN-gamma in NOD mouse diabetes: arrest by p277 peptide treatment. *J. Autoimmun.* *11*, 73–81.

Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 593–623.

Akdis, C.A., and Blaser, K. (1999). IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *13*, 603–609.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *The Lipid Bilayer*.

Alder-Baerens, N., Müller, P., Pohl, A., Korte, T., Hamon, Y., Chimini, G., Pomorski, T., and Herrmann, A. (2005). Headgroup-specific exposure of phospholipids in ABCA1-expressing cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 26321–26329.

Al-Jarallah, A., Chen, X., González, L., and Trigatti, B.L. (2014). High Density Lipoprotein Stimulated Migration of Macrophages Depends on the Scavenger Receptor Class B, Type I, PDZK1 and Akt1 and Is Blocked by Sphingosine 1 Phosphate Receptor Antagonists. *PLOS ONE* *9*, e106487.

Alvarez, M.M., Liu, J.C., Trujillo-de Santiago, G., Cha, B.-H., Vishwakarma, A., Ghaemmaghami, A.M., and Khademhosseini, A. (2016). Delivery strategies to control inflammatory response: Modulating M1–M2 polarization in tissue engineering applications. *J. Controlled Release* *240*, 349–363.

Aribi, M., Moulessehoul, S., Kendouci-Tani, M., Benabadji, A.-B., Hichami, A., and Khan, N.A. (2007). Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *13*, CR372-378.

Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., and Aymeric, J.-L. (2015). Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLOS ONE* *10*, e0135515.

Arnold, C.E., Gordon, P., Barker, R.N., and Wilson, H.M. (2015). The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. *Immunobiology* *220*, 10–19.

Asadullah, K., Sterry, W., and Volk, H.D. (2003). Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach. *Pharmacol. Rev.* 55, 241–269.

Au-Yeung, B.B., Zikherman, J., Mueller, J.L., Ashouri, J.F., Matloubian, M., Cheng, D.A., Chen, Y., Shokat, K.M., and Weiss, A. (2014). A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E3679–E3688.

B

Baek, H.S., and Yoon, J.W. (1991). Direct involvement of macrophages in destruction of beta-cells leading to development of diabetes in virus-infected mice. *Diabetes* 40, 1586–1597.

Bao, M., Yang, Y., Jun, H.-S., and Yoon, J.-W. (2002). Molecular mechanisms for gender differences in susceptibility to T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 5369–5375.

Beceiro, S., Radin, J.N., Chaturvedi, R., Piazuelo, M.B., Horvarth, D.J., Cortado, H., Gu, Y., Dixon, B., Gu, C., Lange, I., et al. (2017). TRPM2 ion channels regulate macrophage polarization and gastric inflammation during *Helicobacter pylori* infection. *Mucosal Immunol.* 10, 493–507.

Becerra-Díaz, M., Valderrama-Carvajal, H., and Terrazas, L.I. (2011). Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Family Members in Helminth Infections. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1371–1381.

van Belle, T.L., Coppieters, K.T., and von Herrath, M.G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91, 79–118.

Bluestone, J.A., Herold, K., and Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464, 1293–1300.

Bułdak, Ł., Machnik, G., Bułdak, R.J., Łabuzek, K., Bołdys, A., Belowski, D., Basiak, M., and Okopień, B. (2016). Exenatide (a GLP-1 agonist) expresses anti-inflammatory properties in cultured human monocytes/macrophages in a protein kinase A and B/Akt manner. *Pharmacol. Rep.* 68, 329–337.

C

Canton, J., Khezri, R., Glogauer, M., and Grinstein, S. (2014). Contrasting phagosome pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages. *Mol. Biol. Cell* 25, 3330–3341.

Carpintero, R., Gruaz, L., Brandt, K.J., Scanu, A., Faille, D., Combes, V., Grau, G.E., and Burger, D. (2010). HDL Interfere with the Binding of T Cell Microparticles to Human Monocytes to Inhibit Pro-Inflammatory Cytokine Production. *PLOS ONE* 5, e11869.

Catapano, A.L., Pirillo, A., Bonacina, F., and Norata, G.D. (2014). HDL in innate and adaptive immunity. *Cardiovasc. Res.* 103, 372–383.

Cetkovic-Cvrlje, M., Olson, M., Schindler, B., and Gong, H.K. (2016). Exposure to DDT metabolite p,p'-DDE increases autoimmune type 1 diabetes incidence in NOD mouse model. *J. Immunotoxicol.* 13, 108–118.

Chang, C.I., Liao, J.C., and Kuo, L. (1998). Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am. J. Physiol.* 274, H342-348.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001a). Macrophage activation by armed CD4 TH1 cells.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001b). Principles of innate and adaptive immunity.

Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D., and Mosmann, T.R. (1987). Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 166, 1229–1244.

Connelly, M.A., and Williams, D.L. (2004). Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 287–295.

Corraliza, I.M., Campo, M.L., Soler, G., and Modolell, M. (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* 174, 231–235.

D

Daigneault, M., De Silva, T.I., Bewley, M.A., Preston, J.A., Marriott, H.M., Mitchell, A.M., Mitchell, T.J., Read, R.C., Whyte, M.K.B., and Dockrell, D.H. (2012). Monocytes regulate the mechanism of T-cell death by inducing Fas-mediated apoptosis during bacterial infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002814.

Daniels, T.F., Killinger, K.M., Michal, J.J., Wright Jr., R.W., and Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 474–488.

Darnell, J.E. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630–1635.

Dawson, R.J.P., and Locher, K.P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443, 180–185.

Dowhan, W. (2013). Functional Roles of Lipids in Membranes. In *Encyclopedia of Biophysics*, G.C.K. Roberts, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 868–875.

Duane, P.G., Rubins, J.B., Weisel, H.R., and Janoff, E.N. (1993). Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* *61*, 4392–4397.

E

Ehret, G.B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C.M., Fritz, S., Nabholz, M., and Bucher, P. (2001). DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J. Biol. Chem.* *276*, 6675–6688.

Emre, Y., Hurtaud, C., Nübel, T., Criscuolo, F., Ricquier, D., and Cassard-Doulcier, A.-M. (2007). Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochem. J.* *402*, 271–278.

F

Feig, J.E., Rong, J.X., Shamir, R., Sanson, M., Vengrenyuk, Y., Liu, J., Rayner, K., Moore, K., Garabedian, M., and Fisher, E.A. (2011). HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7166–7171.

Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*, L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.

Forman, H.J., and Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *166*, S4-8.

Fracchia, K.M., Pai, C., and Walsh, C.M. (2013). Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. *Front. Immunol.* *4*.

Freeman, S.A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol. Rev.* *262*, 193–215.

Fryirs, M.A., Barter, P.J., Appavoo, M., Tuch, B.E., Tabet, F., Heather, A.K., and Rye, K.-A. (2010). Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 1642–1648.

G

Gardner, P. (1989). Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* *59*, 15–20.

- Geenen, V., Brilot, F., Louis, C., Hansenne, I., Renard, C., and Martens, H. (2005). [Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes]. *Rev. Med. Liege* 60, 291–296.
- Genuth, S., Alberti, K.G.M.M., Bennett, P., Buse, J., Defronzo, R., Kahn, R., Kitzmiller, J., Knowler, W.C., Lebovitz, H., Lernmark, A., et al. (2003). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26, 3160–3167.
- German, J.B., Smilowitz, J.T., and Zivkovic, A.M. (2006). Lipoproteins: When size really matters. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 171–183.
- Geyer, J.W., and Dabich, D. (1971). Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 39, 412–417.
- Gitelman, H.J. (1967). An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.* 18, 521–531.
- Goldsby, R.A., and Goldsby, R.A.K. immunology (2003). *Immunology* (New York ; Houndmills : W.H. Freeman).
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593–604.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.
- Graham, K.L., Sutherland, R.M., Mannering, S.I., Zhao, Y., Chee, J., Krishnamurthy, B., Thomas, H.E., Lew, A.M., and Kay, T.W.H. (2012). Pathogenic mechanisms in type 1 diabetes: the islet is both target and driver of disease. *Rev. Diabet. Stud. RDS* 9, 148–168.
- Gregory, G.D., Raju, S.S., Winandy, S., and Brown, M.A. (2006). Mast cell IL-4 expression is regulated by Ikaros and influences encephalitogenic Th1 responses in EAE. *J. Clin. Invest.* 116, 1327–1336.
- Gruaz, L., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P., Dayer, J.-M., and Burger, D. (2010). Blockade of T cell contact-activation of human monocytes by high-density lipoproteins reveals a new pattern of cytokine and inflammatory genes. *PLoS One* 5, e9418.

H

- Haskins, K., Bradley, B., Powers, K., Fadok, V., Flores, S., Ling, X., Pugazhenti, S., Reusch, J., and Kench, J. (2003). Oxidative Stress in Type 1 Diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1005, 43–54.
- Hasty, A.H., Plummer, M.R., Weisgraber, K.H., Linton, M.F., Fazio, S., and Swift, L.L. (2005). The recycling of apolipoprotein E in macrophages influence of HDL and apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 46, 1433–1439.

Helm, O., Held-Feindt, J., Schäfer, H., and Sebens, S. (2014). M1 and M2: there is no —goodll and —badll—How macrophages promote malignancy-associated features in tumorigenesis. *Oncoimmunology* 3.

Hiltbold, E.M., Poloso, N.J., and Roche, P.A. (2003). MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 1329–1338.

Holman, D.M., and Kalaaji, A.N. (2006). Cytokines in dermatology. *J. Drugs Dermatol. JDD* 5, 520–524.

Horta, M.F., Mendes, B.P., Roma, E.H., Noronha, F.S.M., Macêdo, J.P., Oliveira, L.S., Duarte, M.M., and Vieira, L.Q. (2012). Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J. Parasitol. Res.* 2012, 203818.

Hoyal, C.R., Thomas, A.P., and Forman, H.J. (1996). Hydroperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271, 29205–29210.

Huber, S., Hoffmann, R., Muskens, F., and Voehringer, D. (2010). Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood* 116, 3311–3320.

Hutchings, P.R., and Cooke, A. (1990). The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males. *J. Autoimmun.* 3, 175–185.

Hutchings, P., Rosen, H., O'Reilly, L., Simpson, E., Gordon, S., and Cooke, A. (1990). Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. *Nature* 348, 639–642.

Hwang, E.S., Hong, J.-H., and Glimcher, L.H. (2005). IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J. Exp. Med.* 202, 1289–1300.

Hyka, N., Dayer, J.-M., Modoux, C., Kohno, T., Edwards, C.K., Roux-Lombard, P., and Burger, D. (2001). Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 97, 2381–2389.

I

Ihle, J.N. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 211–217.

Iles, K.E., Dickinson, D.A., Watanabe, N., Iwamoto, T., and Forman, H.J. (2002). AP-1 activation through endogenous H₂O₂ generation by alveolar macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1304–1313.

Imagawa, A., Hanafusa, T., Miyagawa, J., and Matsuzawa, Y. (2000). A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N. Engl. J. Med.* *342*, 301–307.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* *16*, 343–353.

Iyer, S.S., and Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* *32*, 23–63.

J

Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado, J. de D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, S., and Guerau-de-Arellano, M. (2015). Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLOS ONE* *10*, e0145342.

Jatiani, S.S., Baker, S.J., Silverman, L.R., and Reddy, E.P. (2010). JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders. *Genes Cancer* *1*, 979–993.

Johnson, A.R., Milner, J.J., and Makowski, L. (2012). The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol. Rev.* *249*, 218–238.

K

Kameda, T., Ohkawa, R., Yano, K., Usami, Y., Miyazaki, A., Matsuda, K., Kawasaki, K., Sugano, M., Kubota, T., and Tozuka, M. (2015). Effects of Myeloperoxidase-Induced Oxidation on Antiatherogenic Functions of High-Density Lipoprotein. *J. Lipids* *2015*, e592594.

Karimian, P., Kavosi, G., and Amirghofran, Z. (2014). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* *4*, 219–227.

Karlsson, F.A., Berne, C., Björk, E., Kullin, M., Li, Z., Ma, J.Y., Schölin, A., and Zhao, L. (2000). Beta-cell activity and destruction in type 1 diabetes. *Ups. J. Med. Sci.* *105*, 85–95.

Karunakaran, S., and Fratti, R.A. (2013). The lipid composition and physical properties of the yeast vacuole affect the hemifusion-fusion transition. *Traffic Cph. Den.* *14*, 650–662.

Kawasaki, E. (2014). Type 1 Diabetes and Autoimmunity. *Clin. Pediatr. Endocrinol.* *23*, 99–105.

Kida, K., Kaino, Y., Ito, T., and Hirai, H. (1998). Controversies on the prevention of insulin-dependent diabetes mellitus by immunomodulation: lessons from NOD mice

treated with beta-1,6;1,3-D-glucan and rhIGF-I. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* *À Suppl 2*, 327–333.

Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* *8*, 223–246.

Kikodze, N., Pantsulaia, I., Rekhviashvili, K., Iobadze, M., Dzhakhutashvili, N., Pantsulaia, N., Kukuladze, N., Bikashvili, N., Metreveli, D., and Chikovani, T. (2013). Cytokines and T regulatory cells in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Georgian Med. News* 29–35.

Kim, Y., Kwon, E.-K., Jeon, J.-H., So, I., Kim, I.-G., Choi, M.-S., Kim, I.-S., Choi, J.-K., Jung, J.U., and Cho, N.-H. (2012). Activation of the STAT6 transcription factor in Jurkat T-cells by the herpesvirus saimiri Tip protein. *J. Gen. Virol.* *93*, 330–340.

Knip, M., and Siljander, H. (2008). Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* *7*, 550–557.

Kopprasch, S., Pietzsch, J., and Graessler, J. (2004). The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL. *Mol. Cell. Biochem.* *258*, 121–127.

Korhonen, S., Knip, M.M., Kulmala, P., Savola, K., Akerblom, H.K., Knip, M., and Finnish Study Group for ICA Screening (2002). Autoantibodies to GAD, IA-2 and insulin in ICA-positive first-degree relatives of children with type 1 diabetes: a comparison between parents and siblings. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *18*, 43–48.

L

Labonte, A.C., Tosello-Tramont, A.-C., and Hahn, Y.S. (2014). The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. *Mol. Cells* *37*, 275–285.

Lanzavecchia, A., Iezzi, G., and Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* *96*, 1–4.

Larbi, A., Fortin, C., Dupuis, G., Berrougui, H., Khalil, A., and Fulop, T. (2014). Immunomodulatory role of high-density lipoproteins: impact on immunosenescence. *AGE* *36*, 9712.

Lee, D.H. (2014). Lipoproteins and β -Cell Functions: From Basic to Clinical Data. *Diabetes Metab. J.* *38*, 274–277.

Lee, E.J., Lee, Y.R., Joo, H.K., Cho, E.J., Choi, S., Sohn, K.-C., Lee, S.D., Park, J.B., and Jeon, B.H. (2013). Arginase II inhibited lipopolysaccharide-induced cell death by regulation of iNOS and Bcl-2 family proteins in macrophages. *Mol. Cells* *35*, 396–401.

Lee, Y.-S., Li, N., Shin, S., and Jun, H.-S. (2009). Role of nitric oxide in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice. *J. Virol.* *83*, 8004–8011.

Li, M., Song, L.-J., and Qin, X.-Y. (2014). Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J. Cell. Mol. Med.* *18*, 749–758.

Liadis, N., Murakami, K., Eweida, M., Elford, A.R., Sheu, L., Gaisano, H.Y., Hakem, R., Ohashi, P.S., and Woo, M. (2005). Caspase-3-Dependent β -Cell Apoptosis in the Initiation of Autoimmune Diabetes Mellitus. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 3620–3629.

Liew, F.Y. (2002). TIMELINE: TH1 and TH2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 55–60.

Liu, G., and Yang, H. (2013). Modulation of macrophage activation and programming in immunity. *J. Cell. Physiol.* *228*, 502–512.

Liu, D., Ji, L., Tong, X., Pan, B., Han, J.-Y., Huang, Y., Chen, Y.E., Pennathur, S., Zhang, Y., and Zheng, L. (2011). Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *301*, C739–C748.

Liu, D., Ji, L., Zhang, D., Tong, X., Pan, B., Liu, P., Zhang, Y., Huang, Y., Su, J., Willard, B., et al. (2012). Nonenzymatic glycation of high-density lipoprotein impairs its anti-inflammatory effects in innate immunity. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *28*, 186–195.

Long, A.E., Gillespie, K.M., Rokni, S., Bingley, P.J., and Williams, A.J.K. (2012). Rising incidence of type 1 diabetes is associated with altered immunophenotype at diagnosis. *Diabetes* *61*, 683–686.

Long, S.A., Buckner, J.H., and Greenbaum, C.J. (2013). IL-2 therapy in type 1 diabetes. *Clin. Immunol.* *149*, 324–331.

Lund, R.J., Chen, Z., Scheinin, J., and Lahesmaa, R. (2004). Early Target Genes of IL-12 and STAT4 Signaling in Th Cells. *J. Immunol.* *172*, 6775–6782.

Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2010). High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport. *Subcell. Biochem.* *51*, 183–227.

M

Mackanness, G.B. (1962). Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* *116*, 381–406.

Mahmoud, M.H., Badr, G., Badr, B.M., Kassem, A.U., and Mohamed, M.S. (2015). Elevated IFN- α / β levels in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model promote oxidative stress and mediate depletion of spleen-homing CD8 + T cells by apoptosis through impaired CCL21/CCR7 axis and IL-7/CD127 signaling. *Cell. Signal.* *27*, 2110–2119.

Martin, B.N., Wang, C., Zhang, C., Kang, Z., Gulen, M.F., Zepp, J.A., Zhao, J., Bian, G., Do, J., Min, B., et al. (2016). T cell-intrinsic ASC critically promotes TH17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Immunol.* 17, 583–592.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6.

Mauvais, F.-X., Diana, J., and van Endert, P. (2016). Beta cell antigens in type 1 diabetes: triggers in pathogenesis and therapeutic targets. *F1000Research* 5.

McPherson, P.A.C., Young, I.S., McKibben, B., and McEneny, J. (2007). High density lipoprotein subfractions: isolation, composition, and their duplicitous role in oxidation. *J. Lipid Res.* 48, 86–95.

Mineo, C., and Shaul, P.W. (2012). Novel Biological Functions of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Circ. Res.* 111, 1079–1090.

Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J.H., and Shaul, P.W. (2006). Endothelial and Antithrombotic Actions of HDL. *Circ. Res.* 98, 1352–1364.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* 30, 899–911.

Morio, L.A., Chiu, H., Sprowles, K.A., and Laskin, D.L. (2000). Functional heterogeneity of rat hepatic and alveolar macrophages: effects of chronic ethanol administration. *J. Leukoc. Biol.* 68, 614–620.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.

Muraille, E., Leo, O., and Moser, M. (2014). Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism? *Front. Immunol.* 5.

N

Najac, C., Chaumeil, M.M., Kohanbash, G., Guglielmetti, C., Gordon, J.W., Okada, H., and Ronen, S.M. (2016). Detection of inflammatory cell function using ¹³C magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized [6-¹³C]-arginine. *Sci. Rep.* 6, 31397.

Nakamura, K., Ito, I., Kobayashi, M., Herndon, D.N., and Suzuki, F. (2015). Orosomucoid 1 drives opportunistic infections through the polarization of monocytes to the M2b phenotype. *Cytokine* 73, 8–15.

Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158, 670–689.

Negre-Salvayre, A., Dousset, N., Ferretti, G., Bacchetti, T., Curatola, G., and Salvayre, R. (2006). Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic. Biol. Med.* *41*, 1031–1040.

Nicolas, C.S., Amici, M., Bortolotto, Z.A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A., Dournaud, P., Gressens, P., Collingridge, G.L., and Peineau, S. (2013). The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAK-STAT* *2*.

Norata, G.D., Pirillo, A., Ammirati, E., and Catapano, A.L. (2012). Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis* *220*, 11–21.

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

O

Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., et al. (2007). Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* *447*, 1116–1120.

Oishi, S., Takano, R., Tamura, S., Tani, S., Iwaizumi, M., Hamaya, Y., Takagaki, K., Nagata, T., Seto, S., Horii, T., et al. (2016). M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. *Immunology* *149*, 320–328.

Onengut-Gumuscu, S., and Concannon, P. (2005). The genetics of type 1 diabetes: lessons learned and future challenges. *J. Autoimmun.* *25 Suppl*, 34–39.

P

Parra, S., Castro, A., and Masana, L. (2015). The pleiotropic role of HDL in autoimmune diseases. *Clin. E Investig. En Arterioscler. Publicacion Of. Soc. Espanola Arterioscler.* *27*, 97–106.

Pekarova, M., and Lojek, A. (2015). The crucial role of L-arginine in macrophage activation: What you need to know about it. *Life Sci.* *137*, 44–48.

Pericone, C.D., Overweg, K., Hermans, P.W.M., and Weiser, J.N. (2000). Inhibitory and Bactericidal Effects of Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* on Other Inhabitants of the Upper Respiratory Tract. *Infect. Immun.* *68*, 3990–3997.

Perrin-Cocon, L., Diaz, O., Carreras, M., Dollet, S., Guironnet-Paquet, A., André, P., and Lotteau, V. (2012). High-density lipoprotein phospholipids interfere with dendritic cell Th1 functional maturation. *Immunobiology* *217*, 91–99.

Piao, Z.-H., Kim, M.S., Jeong, M., Yun, S., Lee, S.H., Sun, H.-N., Song, H.Y., Suh, H.-W., Jung, H., Yoon, S.R., et al. (2012). VDUP1 exacerbates bacteremic shock in mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell. Immunol.* 280, 1–9.

Pick, E., and Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38, 161–170.

Pike, L.J. (2003). Lipid rafts bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655–667.

Porto, P.D., Cifani, N., Guarnieri, S., Di Domenico, E.G., Marigliò, M.A., Spadaro, F., Guglietta, S., Anile, M., Venuta, F., Quattrucci, S., et al. (2011). Dysfunctional CFTR Alters the Bactericidal Activity of Human Macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 6.

R

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

Rachmiel, M., Bloch, O., Bistrizter, T., Weintrob, N., Ofan, R., Koren-Morag, N., and Rapoport, M.J. (2006). TH1/TH2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma. *Cytokine* 34, 170–176.

Rasigade, J.P., Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., Laurent, F., and Dumitrescu, O. (2011). Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 11, 263.

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

Richardson, S.J., Morgan, N.G., and Foulis, A.K. (2014). Pancreatic pathology in type 1 diabetes mellitus. *Endocr. Pathol.* 25, 80–92.

Roep, B.O., and Peakman, M. (2012). Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a007781.

S

Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., and Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 331–344.

Sanson, M., Distel, E., and Fisher, E.A. (2013). HDL Induces the Expression of the M2 Macrophage Markers Arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-Dependent Process. *PLoS ONE* 8.

- Schebesch, C., Kodelja, V., Müller, C., Hakij, N., Bisson, S., Orfanos, C.E., and Goerdts, S. (1997). Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology* 92, 478–486.
- Seres, T., Knickelbein, R.G., Warshaw, J.B., and Johnston, R.B. (2000). The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 3333–3340.
- Sharma, R., Fu, S.M., and Ju, S.-T. (2011). IL-2: A two-faced master regulator of autoimmunity. *J. Autoimmun.* 36, 91–97.
- Shuai, K. (1999). The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 405–422.
- Sia, C. (2005). Imbalance in Th Cell Polarization and its Relevance in Type 1 Diabetes Mellitus. *Rev. Diabet. Stud.* 2, 182–186.
- Sica, A., Invernizzi, P., and Mantovani, A. (2014). Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 59, 2034–2042.
- Singh, K., Kadesjö, E., Lindroos, J., Hjort, M., Lundberg, M., Espes, D., Carlsson, P.-O., Sandler, S., and Thorvaldson, L. (2015). Interleukin-35 administration counteracts established murine type 1 diabetes – possible involvement of regulatory T cells. *Sci. Rep.* 5, 12633.
- Smythies, L.E., White, C.R., Maheshwari, A., Palgunachari, M.N., Anantharamaiah, G.M., Chaddha, M., Kurundkar, A.R., and Datta, G. (2010). Apolipoprotein A-I mimetic 4F alters the function of human monocyte-derived macrophages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1538-1548.
- Sokol, R.J., Hudson, G., James, N.T., Frost, I.J., and Wales, J. (1987). Human macrophage development: a morphometric study. *J. Anat.* 151, 27–35.
- Sorci-Thomas, M.G., and Thomas, M.J. (2012). High Density Lipoprotein Biogenesis, Cholesterol Efflux, and Immune Cell Function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2561–2565.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287–292.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13, 139–145.
- Stijn, C.M.W. van, Kim, J., Lusi, A.J., Barish, G.D., and Tangirala, R.K. (2015). Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. *FASEB J.* 29, 636–649.
- Suarez-Pinzon, W., Sorensen, O., Bleackley, R.C., Elliott, J.F., Rajotte, R.V., and Rabinovitch, A. (1999). Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes* 48, 21–28.

Szablewski, L. (2014). Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 22, 182–191.

Szanto, A., Balint, B.L., Nagy, Z.S., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R.M., et al. (2010). STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR γ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* 33, 699–712.

T

Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996a). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627–630.

Takeda, K., Kamanaka, M., Tanaka, T., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996b). Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *J. Immunol.* 157, 3220–3222.

Tanaka, N., Abe-Dohmae, S., Iwamoto, N., Fitzgerald, M.L., and Yokoyama, S. (2010). Helical apolipoproteins of high-density lipoprotein enhance phagocytosis by stabilizing ATP-binding cassette transporter A7. *J. Lipid Res.* 51, 2591–2599.

Tiniakou, I., Drakos, E., Sinatkas, V., Van Eck, M., Zannis, V.I., Boumpas, D., Verginis, P., and Kardassis, D. (2015). High-density lipoprotein attenuates Th1 and th17 autoimmune responses by modulating dendritic cell maturation and function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 4676–4687.

Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., and Asadullah, K. (2003). Cytokine and anticytokine therapy in dermatology. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3, 733–743.

Twigg, H.L. (2004). Macrophages in innate and acquired immunity. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 25, 21–31.

V

Vaseghi, H., and Jadali, Z. (2016). Th1/Th2 cytokines in Type 1 diabetes: Relation to duration of disease and gender. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 20, 312–316.

Vatansever, F., de Melo, W.C.M.A., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N.A., Yin, R., et al. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 955–989.

W

Wang, S., Gao, X., Shen, G., Wang, W., Li, J., Zhao, J., Wei, Y.-Q., and Edwards, C.K. (2016). Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Sci. Rep.* 6, 24249.

Wang, S.-H., Yuan, S.-G., Peng, D.-Q., and Zhao, S.-P. (2012). HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells. *Atherosclerosis* 225, 105–114.

Whitley, E., and Ball, J. (2002). Statistics review 6: Nonparametric methods. *Crit. Care* 6, 509.

Willcox, A., Richardson, S.J., Bone, A.J., Foulis, A.K., and Morgan, N.G. (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 155, 173–181.

Wynn, T.A., Barron, L., Thompson, R.W., Madala, S.K., Wilson, M.S., Cheever, A.W., and Ramalingam, T. (2001). Quantitative Assessment of Macrophage Functions in Repair and Fibrosis. In *Current Protocols in Immunology*, (John Wiley & Sons, Inc.), p.

Y

Yagi, H., Matsumoto, M., Kunimoto, K., Kawaguchi, J., Makino, S., and 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.

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

Yao, Y., Vent-Schmidt, J., McGeough, M.D., Wong, M., Hoffman, H.M., Steiner, T.S., and Levings, M.K. (2015). Tr1 Cells, but Not Foxp3+ Regulatory T Cells, Suppress NLRP3 Inflammasome Activation via an IL-10–Dependent Mechanism. *J. Immunol.* 195, 488–497.

Ye, Z., Ahmed, K.A., Hao, S., Zhang, X., Xie, Y., Munegowda, M.A., Meng, Q., Chibbar, R., and Xiang, J. (2008). Active CD4+ helper T cells directly stimulate CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in wild-type and MHC II gene knockout C57BL/6 mice and transgenic RIP-mOVA mice expressing islet beta-cell ovalbumin antigen leading to diabetes. *Autoimmunity* 41, 501–511.

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

Ysmail-Dahlouk, L., Nouari, W., and Aribi, M. (2016). 1,25-dihydroxyvitamin D3 down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and

enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes. *Immunol. Lett.* 179, 122–130.

Yvan-Charvet, L., Wang, N., and Tall, A.R. (2010). The role of HDL, ABCA1 and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 139–143.

Z

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

Zhang, L., Song, J., Cavigliolo, G., Ishida, B.Y., Zhang, S., Kane, J.P., Weisgraber, K.H., Oda, M.N., Rye, K.-A., Pownall, H.J., et al. (2011). Morphology and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy. *J. Lipid Res.* 52, 175–184.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489.

(1990). *Practical Statistics for Medical Research.*



High-density lipoprotein immunomodulates the functional activities of macrophage and cytokines produced during ex vivo macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes



Ibtissem Benghalem, Warda Meziane, Zeyneb Hadjidj, Lamia Ysmail-Dahlouk, Ahmed Belamri, Kheira

Mouhadjer, Mourad Aribi [†]

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, PO Box: 262, Imama-Mansourah, 13000 Tlemcen, Algeria

article info

Article history:

Received 21 October 2016

Received in revised form 8 February 2017

Accepted 1 March 2017

Keywords:

Autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells HDL

Human type 1 diabetes

Macrophage functional activities

Proinflammatory and anti-inflammatory

cytokines

p-STAT4 and p-STAT6

abstract

Background: Both CD4⁺ T cells and macrophages are mainly involved in the autoimmune-mediated b-cells destruction in type 1 diabetes (T1D). The aim of this study was to examine the effect of HDL on functional activities of macrophage and its ability to regulate the production of cytokines in autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells at the recent-onset human type 1 diabetes.

Methods: Cell samples were isolated from volunteers with recent-onset T1D or healthy controls. **Results:** The levels of the production of IL-1b, IL-2, IFN- γ , nitric oxide (NO), and hydrogen peroxide (H₂O₂) were significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls. Similarly, those of intracellular free calcium ions ($[Ca^{2+}]_i$) were slightly, but not significantly increased ($p > 0.05$). Conversely, macrophage exhibited significantly decreased levels of the relative tyrosine phosphorylation of STAT6 (p-STAT6, Tyr641) in culture of T1D cells than in that of cells from healthy controls; while those of p-STAT4 (Tyr693) were significantly increased. Likewise, the levels of IL-4 and IL-10 were significantly decreased in the co-culture of T1D cells compared to co-culture of cells from healthy controls. Additionally, HDL treatment significantly down-regulated the production of IL-1b, IL-2, IFN- γ , NO, H₂O₂, phagocytosis, bacterial killing, the relative tyrosine phosphorylation of macrophage-expressed STAT4 (p-STAT4, Tyr693), as well as the ratio of IL-1b/IL-10, NO production/ arginase activity, p-STAT4/p-STAT6, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, and the combined proinflammatory (PICs)/ anti-inflammatory (AICs) cytokines. Moreover, HDL treatment significantly up-regulated the production of IL-4, IL-10, arginase activity, and p-STAT6 (Tyr641) (for all comparisons, $p < 0.001$).

Conclusions: We show for the first time that HDL may reverse both the functional activities of macrophages and immunoinflammatory response during reciprocal macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the beginning of T1D. These findings should open the way for therapeutic trials in the short- and medium-term.

2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the destruction of insulin-producing b-cells thereby affecting the control of blood glucose level [1,2]. T1D is caused by a loss of self-tolerance and can be initiated by the release of autoantigens within the pancreatic islet cells [3].

Many cells are involved in the destruction of b-cells, such as macrophages, dendritic cells, B cells, and T cells [4]. During the pathogenesis of T1D, pancreatic islets are infiltrated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Several evidences showed that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are crucial in T1D development [4,5]. It has been reported that autoreactive T cells differentiate into effectors by engaging b-cell antigens on local antigen-presenting cells (APCs) [6]. Multiple mechanisms have been invoked to elucidate how b-cells are destroyed. T cells can directly kill the b-cells by cell-to-cell contact, through a cytotoxic process [2], but they can also influence their destruction by the release of proinflammatory cytokines [7].

T cells, in particular, CD4⁺ T cells play a central role in the development of T1D [8]. Naive CD4⁺ T cells are activated after

[†] Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, Imama-Mansourah, Rodeo # 2, Department of Biology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

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

interaction with major histocompatibility complex (MHC) expressed by professional APCs, and differentiate to either the T helper 1 (Th1) or Th2 subtypes, depending on the exogenous cyto-kine environment [9]. It has been shown that proinflammatory cytokines, in particular interleukin 1b (IL-1b) [10] and IFN- γ secreting CD4⁺ T cells (Th1) are overproduced at the onset of the autoimmune response, which leads to the shift toward Th1-like phenotype [11,12].

Although T1D is considered as a T cell mediated disease, innate immune cells, including macrophages, are highly involved in disease induction. Macrophages are professional phagocytic cells, and can interact as professional APCs with CD4⁺ helper T cells through MHC class II molecules [13]. Macrophages are primary contributors to the creation of the immune environment for the development and activation of cytotoxic T cells that destroy pancreatic β -cells [14]. They can activate CD4⁺ T cells, and subsequently promote their production of IL-2 and IFN- γ , which may help with the maximal activation of CD8⁺ T cells. Additionally, the mechanism of β -cell destruction by macrophages could be also mediated through the release of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) [15,16].

High-density lipoproteins (HDLs) are one of the five groups of lipoproteins. These complex mixture of lipid and protein contain phospholipids, triglycerides, and various proteins, including apolipoproteins A-I (ApoA-I), ApoE and ApoC-II [17]. The most abundant HDL apolipoproteins are apoA-I and apoA-II. Apo A-I is the main structural and functional apoprotein of HDL and plays a key role in the induction of cholesterol efflux from cells. HDL particles can be sub-classified into small HDL particles that promote cholesterol efflux through the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) [18], large HDL₂ particles that interact with liver scavenger receptors class B type 1 (SR-B1), which ensures the delivery of cholesterol to the liver, and intermediate HDL₃ that induces cholesterol efflux through the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) [19].

Lipid rafts are dynamic microdomains within the plasma membrane, which contain high concentrations of cholesterol and sphingolipids [20]. An important function suggested for the lipid raft microdomain is to act as a platform for cell signaling. Of note, MHC class II is located in microdomains rich in lipids. Therefore, the decrease in cholesterol in lipid rafts may cause numerous changes in cell activation and immune responses [21,22].

Interestingly, recent evidence has shown that HDL can inhibit antigen presentation to T cells by reducing the lipid raft [23]. It may influence the action of macrophages and T cells by modulating cholesterol levels in lipid rafts by ApoA-I, which would block the expression of MHC class II molecules and differentiation of macrophages, and therefore cause the inactivation of CD4⁺ T cells [24]. Accumulating evidence suggests that in addition to reverse transport of cholesterol from the periphery to the liver, HDLs play a major role in vasodilation, as well as in the reduction of LDL oxidation, inflammation and apoptosis [25], and they have other important properties, including antioxidant and antithrombotic effects [26]. Additionally, it has been shown that HDLs inhibit toll-like receptor (TLR)-induced proinflammatory cytokine production by macrophages, and are able to induce the macrophage to the activated alternative anti-inflammatory M2 phenotype [27]. Moreover, other researches showed that HDLs and apoA-I inhibit antigen presentation capacity of macrophages and then IL-2 secretion by T cells [28].

In this first report, we have tried to show that HDL molecules could have an *ex vivo* effect on functional activities of macrophage and on the modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines production in co-culture system of macrophage and autologous CD4⁺ T cells at the recent-onset human type 1 diabetes.

2. Materials and methods

2.1. Study design

The effect of HDL was examined on macrophages and on autologous mixed macrophage and CD4⁺ T cells isolated from volunteers with recent-onset human T1D or healthy controls. Samples were divided into four groups, including cells from healthy controls and type 1 diabetics, treated or not (critical controls) with HDL. Assays were performed on the supernatants or on the whole cell lysates. The human monocytes and CD4⁺ T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by immunomagnetic negative selection. The levels of NO production, H₂O₂, interleukin-1b (IL-1b), IL-2, IL-4, IL-10, interferon- γ (IFN- γ), protein, iCa²⁺, and arginase activity assays were carried out on co-cultures containing monocyte-derived macrophages (MDMs) and CD4⁺ T cells, supplemented or not with purified HDL. The relative amounts of signal transducer and activator of transcription (STAT) phosphorylation at tyrosine 693 (p-STAT4) and tyrosine 641 (p-STAT6) were evaluated in macrophages stimulated by the respective Th1- and Th2-related cytokines. Phagocytosis and bacterial killing were performed on a mixture of macrophage, *Staphylococcus aureus* and HDL. Each experiment was repeated independently at least 4 times, each run in duplicate or triplicate (Fig. 1).

2.2. Preparation of human PBMCs

Blood samples were obtained from healthy donors and patient volunteers with recent-onset T1D, after obtaining informed consent and approval by the local Ethics Committee. Fresh venous blood was collected into EDTA or heparin tubes (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) or heparin tubes (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). PBMCs were isolated by using gradient density centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). After washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), PBMCs were suspended in 1 mL of RPMI 1640. Viability was assessed using Trypan Blue Exclusion Test (TBET).

2.3. Monocyte-derived macrophages isolation

Isolation of monocytes was performed from PBMCs by negative selection using the Human Enrichment EasySep Monocytes kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Monocytes purification was performed according to the manufacturer's instructions. The cell suspensions purity was 90–95% as assessed by flow cytometry. Monocytes were seeded in 24 or 96 well plates at 2.5×10^5 cells/mL and differentiated into macrophages in RPMI 1640 media with 2 mmol/L L-glutamine containing 10% autologous serum and 50 μ g/mL gentamycin in 5% CO₂ at 37 °C. After 48 h, non-adherent cells were removed; whilst macrophages remained attached to the bottom of the plate.

2.4. Isolation of CD4⁺ T cells

CD4⁺ T cells were highly purified (reaching up to 99%) by negative selection using Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Briefly, 2 mL of whole blood were mixed with 100 μ L of human CD4⁺ T cell enrichment cocktail and incubated for 20 min at room temperature, after dilution with PBS containing 2% FBS, then separated with Ficol-Paque™ PLUS (Catalog # 07957) with an equal volume. Finally, CD4⁺ T cells were collected after centrifugation (1200 g for 20 min), and then maintained in RPMI 1640 medium with 10% autologous serum and IL-2 (20 UI/mL) until analyzed.

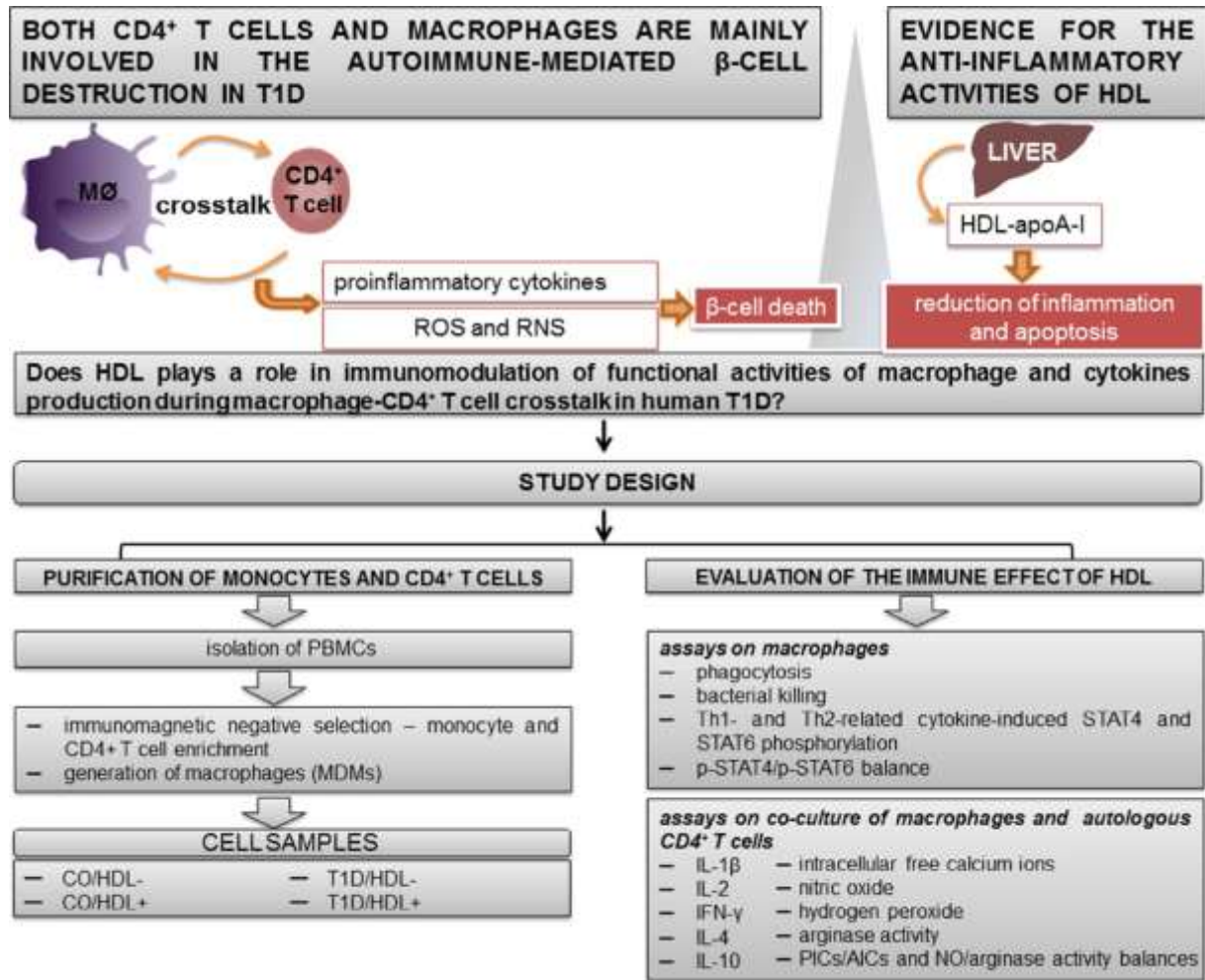


Fig. 1. Study flow-chart. In the current study, we evaluated the ex vivo effect of HDL on immunomodulation of functional activities of macrophage and the production of pro- and anti-inflammatory cytokines during ex vivo macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk in human early T1D. AICs: anti-inflammatory cytokines, apoA-I: apolipoprotein A-I, CO/HDL: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, IFN- γ : interferon gamma, MDM: monocyte-derived macrophage, NO: nitric oxide, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, PICs: proinflammatory cytokines, p-STAT4 (Tyr693): STAT4 phosphorylation on tyrosine 693, p-STAT6 (Tyr641): STAT6 phosphorylation on tyrosine 641, ROS: reactive oxygen species, RNS: reactive nitrogen species, STAT: signal transducer and activator of transcription, T1D/HDL: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL, Th: T helper cells.

2.5. Isolation of HDL

Lipoproteins were isolated from human plasma by sequential ultracentrifugation from the same fasted donor as described [29,30]. Plasma was separated by centrifugation at 1500 g at 4 °C for 15 min. HDL were identified at the following between densities (1.063–1.210 g/mL), and isolated by ultracentrifugation too as described earlier [31]. Plasma density was adjusted to 1.346 g/mL with KBr, and normal saline (1.006 g/mL) was layered over the adjusted plasma to form a discontinuous density gradient of NaCl/KBr [32]. The sample loaded and the gradient tubes were centrifuged and spun at 350 000 g for 3.5 h at 4 °C. HDL from each patient was then sterilized and stored at 20 °C until analysis within 6 months [33].

2.6. Co-culture system of macrophages and CD4⁺ T cells and HDL treatment

Cell samples from normal subjects and type 1 diabetic patients were prepared in the same way. First, purified MDMs were seeded into 96 or 24 well flat bottom plates at 1×10^5 /100 mL per well, and were activated into APCs after incubation for 24 h with 20 ng/mL of

IFN- γ [34]. After removal of IFN- γ , activated MDMs were co-cultured with autologous CD4⁺ T cells at a concentration of 1×10^6 /100 mL per well after stimulation with 20 μ g/mL phyto-haemagglutinin (PHA-L, Calbiochem) [33]. Co-cultures were incubated for 24–48 h at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 μ g/mL gentamycin and 10% autologous serum, in the presence or absence of HDL at a dose of 50 mg/mL [35,36].

2.7. Cell lysis assay

For protein, 45 Ca²⁺ and arginase activity assays, cells were lysed as described [37]. Briefly, cells were treated for 30 min with 500 μ L of 0.1% Triton X 100. Reaction was stopped by the addition of a mixture containing Tris-HCl and MnCl₂.

2.8. Protein assay

Protein concentration was measured on the cell lysates at 540 nm using a commercial kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Middletown, USA).

2.9. Respiratory burst assay

Respiratory burst assay was carried out by the determination of the levels of NO production and H₂O₂ [37,38].

2.9.1. Nitric oxide assay

NO levels were assessed on supernatants by measuring the accumulation of stable oxidative metabolites (NOx, nitrite and nitrate), with the sensitive colorimetric Griess reaction, using tri-chloroacetic acid (TCA), vanadium (III) and Griess reagent chloride, as described [39]. Absorbance was measured at 540 nm on the ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The amount of nitrite in the sample was achieved by reference to a standard curve constructed using sodium nitrite.

2.9.2. Hydrogen peroxide assay

H₂O₂ was measured by the adapted method of Pick and Keisari [40] with some modifications [41]. This method is based on the use of a buffered Phenol Red Solution (PRS), which contains a peroxide assay buffer (PAB) (5.0 mM K₂HPO₄, 1.0 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 0.5 mM glucose adjusted to pH 7.4), 0.28 mM (0.1 g/L) of phenol red (phenolsulfonphthalein) and 8.5 U/L (50 mg/mL) of horseradish peroxidase (HRPO, EC 1.11.1.7). The PRS solution was prepared immediately prior to the assay, by adding phenol red and HRPO to 2.1 mL of PAB at a final concentration of 0.46 mM and 0.046 U/mL, respectively. Supernatant were added to the assay mixture at a ratio of 1:4 and then incubated for 30 min at 37 °C [42]. To stop the reaction, 10 mL of 1 N NaOH was added. The H₂O₂ levels were measured spectrophotometrically at 610 nm against a blank containing buffered PRS and NaOH at the appropriate concentrations. A standard curve was prepared by the use of dilutions of 30% H₂O₂.

2.10. Intracellular free calcium ions assay

The levels of intracellular free calcium ions ($_{i}Ca^{2+}$) were bio-chemically determined on cell lysates with the ortho-cresolphthalein (OCP) complexone method [43], based on the formation of a chromogenic complex resulting from the reaction of OCP with calcium ions in alkaline solution. The free calcium ions content were spectrophotometry determined at 560 nm against a blank using a commercial kit (BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain). The levels of $_{i}Ca^{2+}$ were expressed as mg/mg proteins.

2.11. Staphylococcus aureus strain

S. aureus ATCC 6538 strain (American Type Culture Collection) was used for the phagocytosis and bacterial killing assays. Bacteria were grown overnight in trypticase soy broth (TSB) at 37 °C. The optical density (OD) of 0.5 McFarland turbidity as measured by a colorimeter at 600 nm and confirmed by bacterial count corresponded to 10⁸ CFU/mL [44].

2.12. Phagocytosis and bacterial killing assays

These assays were performed as described in detail [37,39]. Phagocytosis results were evaluated based on the percentage decrease in the number of viable extracellular bacteria. The percentage of intracellular bacterial killing was determined after the macrophage viability assay after infection using Trypan Blue counting test.

2.13. Arginase activity assay

The activity of arginase (EC 3.5.3.1) were achieved by a spectrophotometric assay based on measuring the concentration of urea in cell lysates after the addition of L-arginine [45,47]. 25 mL of cell lysates, activated by heating for 10 min at 56 °C, were added to 200 mL aliquot of arginine buffer (10 mM L-arginine, pH 6.4), and then incubated at 37 °C for 1 h. The reaction was terminated by adding 750 μ L of acetic acid [48]. The concentration of urea generated after arginine catabolism by arginase was measured at 600 nm using a commercial kit (UREA/BUN-COLOR, BioSystems, S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain), The arginase activity was expressed as nanomoles of urea released per mg of proteins per 1 h.

2.14. Cytokine assays

Concentration levels of IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-10 were determined in co-culture system containing or not HDL. These cytokines were quantified in supernatants after 24 h by a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with respective commercial kits, according to the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). Optical densities were measured at 450 nm with an ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The limits of detection were 0.3 pg/mL for IL-1b, 4 pg/mL for IL-2, 8 pg/mL for IFN- γ , 10 pg/mL for IL-4, and 1 pg/mL for IL-10.

2.15. STAT4 and STAT6 phosphorylation assays

The relative amounts of phosphorylated STAT4 and STAT6 assays were performed in adherent macrophages using STAT4 (Tyr693) and STAT6 (Tyr641) ELISA Kits (Abcam, Germany), according to the manufacturer's instructions. First, 5 $\times 10^5$ cell/mL were incubated in 96-well plate culture at 37 °C and 5% CO₂ during 4 h. Thereafter, MDMs were activated with 100 ng/mL lipopolysaccharides (LPS) (*Escherichia coli* 0127:B8, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (instead of PHA) and treated with 50 μ M HDL. STAT4 and STAT6 were activated with 10 ng/mL Th1 signature cytokine IFN- γ or Th2 signature cytokine IL-4, respectively. The absorbance was measured at 450 nm.

2.16. Statistical analyses

All data were expressed as the means \pm standard error of mean (SEM). The assumption of normality of data distribution was examined prior to statistical procedures. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U non-parametric tests were used to search differences among all groups and between two groups, respectively [49,50].

3. Results

3.1. Effect of HDL on the production of IL-1b

As indicated in Fig. 2, the production levels of IL-1b were increased in the co-culture of T1D cells compared with that of cells from healthy controls ($p = 0.029$ by Mann-Whitney U test). Additionally, HDL treatment significantly down-regulated the production of IL-1b in the co-culture of T1D cells compared with not HDL treated-cells ($p = 0.014$ by Mann-Whitney U test). Whereas, treatment with HDL resulted in a significant increase in IL-1b levels in the co-culture of cells from healthy controls ($p < 0.01$ by Mann-Whitney U test). For all comparisons using Kruskal-Wallis test, p -value was < 0.01 .

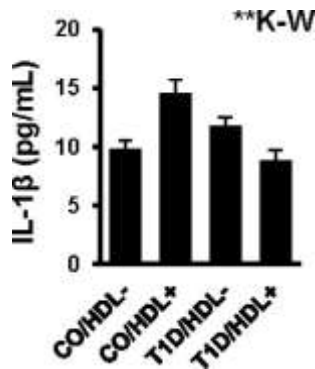


Fig. 2. Effect of HDL on the production of IL-1 β in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. IL-1 β levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.01$; CO/HDL vs. T1D/HDL, $p < 0.05$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL, $p < 0.05$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.01$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.05$.

3.2. Effect of HDL on the production of IL-2

As depicted in Fig. 3, the IL-2 production levels were significantly increased in the co-culture of T1D cells as compared to that of cells from healthy controls ($p = 0.001$ by Mann-Whitney U test). In addition, HDL treatment induced a significant decrease in IL-2 production levels in the co-culture of both T1D and cells from healthy controls in comparison to co-cultures without HDL ($p < 0.001$ by Mann-Whitney U test). When using Kruskal-Wallis test, p -value was less than 0.001.

3.3. Effect of HDL on the production of anti-inflammatory/regulatory cytokine IL-10

As shown in Fig. 4, the production levels of IL-10 are significantly decreased in the co-culture of T1D cells in comparison to

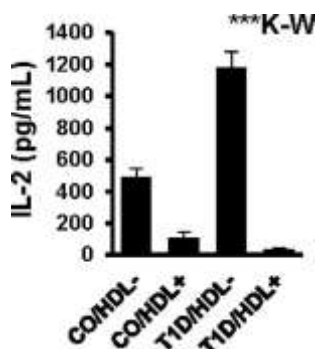


Fig. 3. Effect of HDL on the production of IL-2 in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. IL-2 levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL, $p < 0.01$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.01$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

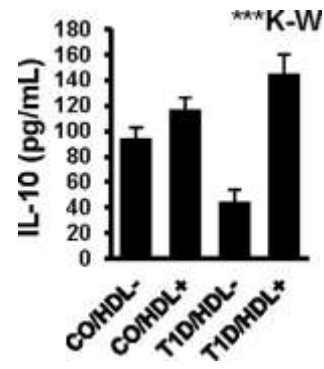


Fig. 4. Effect of HDL on the production of anti-inflammatory/regulatory cytokine IL-10 in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. IL-10 levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.05$; CO/HDL vs. T1D/HDL, $p < 0.01$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.05$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

that of cells from healthy controls ($p = 0.004$ by Mann-Whitney U test). When treated cells with HDL, the co-culture of T1D cells, but also of control, exhibited a significant increase of IL-10 production levels (respectively, $p < 0.001$ and $p = 0.035$ by Mann-Whitney U test). P -value was less than 0.001 using Kruskal-Wallis test.

3.4. Effect of HDL on the production of Th1- and Th2-related cytokines

We see in Fig. 5 that the production levels of IFN- γ were significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls; while those of IL-4 were significantly decreased (for both comparisons, $p < 0.001$ by

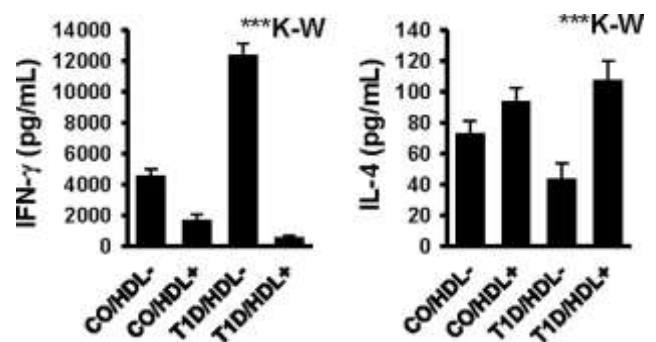


Fig. 5. Effect of HDL on the production of Th1- and Th2-related cytokines in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. IFN- γ and IL-4 were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as respective Th1 and Th2 cell-related cytokines. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group for both IFN- γ and IL-4 assays. HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, IFN- γ : interferon gamma, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, Th: T helper, CO/HDL: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: (i) IFN- γ : CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (ii) IL-4: CO/HDL vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.05$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

Mann-Whitney U test). Additionally, the production of IFN- γ was substantially inhibited by treatment with HDL, either in the co-culture of T1D and cells from healthy controls ($p < 0.001$ by Mann-Whitney U test). However, HDL significantly up-regulated the production of IL-4 in the co-culture of cells from both T1D and healthy controls compared with that of not HDL-treated cells; nevertheless, the difference did not reach significant level for cells from healthy controls (respectively, $p < 0.001$ and $p = 0.070$ by Mann-Whitney U test). For the two cytokines, $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test.

3.5. Effect of HDL on intracellular free calcium ions

We see in Fig. 6 that the levels of i_fCa^{2+} were increased in the co-cultures of T1D compared to that of cells from healthy controls; while the difference did not reach a significant level ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, treatment with HDL induced a slight increase in the i_fCa^{2+} levels in T1D co-cultures; whereas the difference was not statistically significant ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). P-value for multiple comparisons was equal to 0.003 by Kruskal-Wallis test.

3.6. Effect of HDL on functional activities of macrophage

The results in Fig. 7 shows that respiratory burst, as evaluated by NO production and H_2O_2 , was significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls (NO production; $p < 0.001$, H_2O_2 ; $p < 0.01$ by Mann-Whitney U test). We showed that HDL treatment significantly down-regulated the levels of NO production and H_2O_2 in the co-culture of T1D cells (for both variables, $p < 0.001$ by Mann-Whitney U test). Likewise, HDL treatment resulted in significant down-regulation of the two macrophage respiratory burst biomarkers in the co-culture of cells from healthy controls (NO production; $p < 0.001$, H_2O_2 ; $p = 0.003$ by Mann-Whitney U test). Additionally, the results of phagocytosis and bacterial killing assays show that there was no significant differences in both phagocytosis and bacterial killing levels between the co-cultures of T1D and cells from healthy controls (for the two assays, $p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). However, HDL treatment induced a significant decrease in the levels of phagocytosis and bacterial killing in both co-cultures of T1D and controls cells

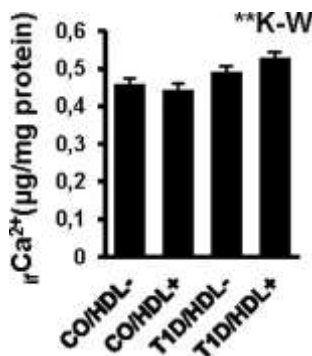


Fig. 6. Effect of HDL on intracellular free calcium ions in the co-culture system of human T1D macrophages and $CD4^+$ T cells. Intracellular free calcium ions levels were biochemically measured by the ortho-cresolphthalein complexone method. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of five independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, i_fCa^{2+} : intracellular free calcium ions, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. No statistical difference was highlighted among different groups.

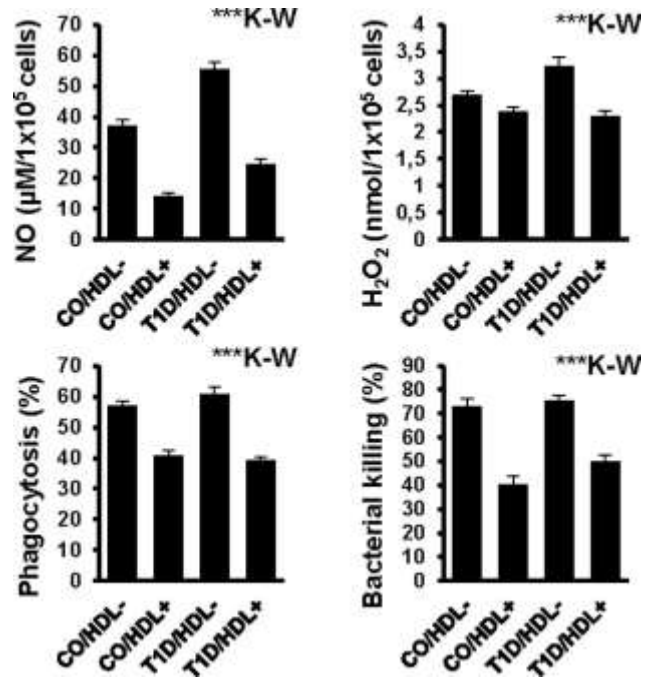


Fig. 7. Effect of HDL on functional activities of macrophage in the co-culture system of human T1D macrophages and $CD4^+$ T cells. Functional activities of macrophage were determined by phagocytosis, bacterial killing and respiratory burst assays. The respiratory burst (also referred to as oxidative burst) was performed by measurements of nitric oxide and hydrogen peroxide production. The levels of nitric oxide production were measured by the sensitive Griess reaction. Hydrogen peroxide levels were measured by the adapted method of Pick and Keisari. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four (phagocytosis and bacterial killing assays) or five (NO production and H_2O_2 assays) independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, H_2O_2 : hydrogen peroxide, NO: nitric oxide, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL-: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL-: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: (i) NO production; CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (ii) H_2O_2 production; CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (iii) Phagocytosis; CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (iv) Bacterial killing; CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (iii) Phagocytosis; CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (iv) Bacterial killing; CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL-, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

($p < 0.001$ for all comparisons by Mann-Whitney U test). When comparing the overall macrophage functional activities between all groups by Kruskal-Wallis test, p-values were less than 0.001 for all variables.

3.7. Effect of HDL on arginase activity

As shown in Fig. 8, the levels of arginase activity was decreased in the co-cultures of T1D when compared to that of cells from healthy controls; while the difference was not significant ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, treatment with HDL resulted in up-regulation of arginase activity in the co-culture of T1D cells compared with that of not HDL-treated T1D cells ($p < 0.001$ by Mann-Whitney U test); whereas HDL treatment did not result in a difference between the co-cultures of the two cells from healthy controls ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). For all comparisons, $p = 0.005$ by Kruskal-Wallis test.

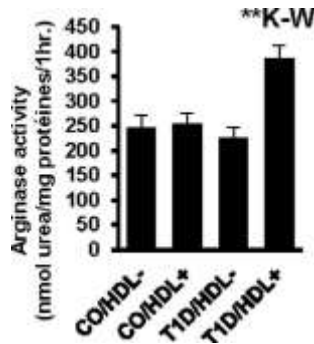


Fig. 8. Effect of HDL on arginase activity in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. Arginase activity levels were spectrophotometrically determined by measurement of the concentration of urea after the addition of L-arginine. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of five independent experiments in each group. HDL: high density lipoprotein, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. *** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.01$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

3.8. Effect of HDL on STAT4 and STAT6 phosphorylation in macrophage stimulated by the respective Th1- and Th2-related cytokines

We show in Fig. 9 that the relative levels of STAT4 tyrosine phosphorylation (p-STAT4, Tyr693) were significantly increased in macrophages of T1D when compared to that of healthy controls; while those of p-STAT6 (Tyr641) were significantly decreased (for the two comparisons, $p < 0.001$ by Mann-Whitney U test). Additionally, we observe that the relative levels of p-STAT4 were significantly down-regulated when macrophage cells from T1D were treated with HDL and, in contrast, those of STAT6 phosphorylation were up-regulated (for both comparisons, $p < 0.001$ by Mann-

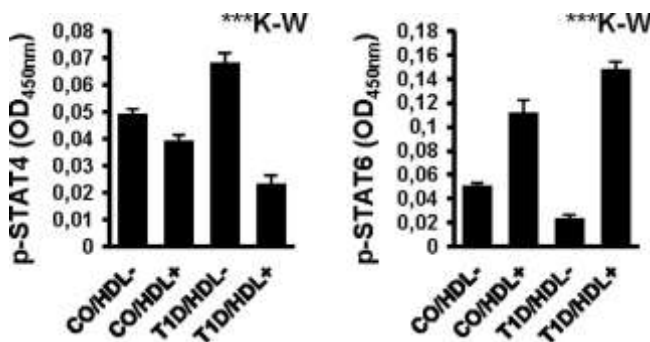


Fig. 9. Effect of HDL on STAT4 and STAT6 phosphorylation in macrophage stimulated by the respective Th1- and Th2-related cytokines. The relative amounts of phosphorylated STAT4 (Tyr693) and STAT6 (Tyr641) levels were measured in macrophage using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), after contact with Th1 or Th2 signature cytokine. Values correspond to the mean \pm standard error of mean (SEM) of four independent experiments in each group, for both STAT4 and STAT6 phosphorylation assays. HDL: high density lipoprotein, K-W: Kruskal-Wallis test, p-STAT: phosphorylated signal transducer and activator of transcription, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL: cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL: T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL.

*** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: (i) p-STAT4; CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.01$; CO/HDL vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, (ii) p-STAT6; CO/HDL vs. CO/HDL+, $p < 0.01$; CO/HDL vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; CO/HDL vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$, CO/HDL+ vs. T1D/HDL, $p < 0.001$; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, $p < 0.001$.

Whitney U test). Similar results were seen when macrophages from healthy controls were treated with HDL (p-STAT4; $p = 0.006$, p-STAT6; $p = 0.001$ by Mann-Whitney U test). When comparing between all groups using Kruskal-Wallis test, p-value was less than 0.001 for both p-STAT4 and p-STAT6.

3.9. Effect of HDL on the balance of proinflammatory versus anti-inflammatory cytokines, NO production versus arginase activity and p-STAT4 versus p-STAT6

The results illustrated in Fig. 10 shows that the ratio of IL-1b/IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, combined proinflammatory (PICs, IL-1b + IL-2 + IFN- γ)/anti-inflammatory (AICs, IL-4 + IL-10) cytokines and NO production/arginase activity were significantly increased in the co-culture of T1D cells than in that of cells from healthy controls (IL-1b/IL-10, $p < 0.01$; IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10 and PICs/AICs, $p < 0.001$; NO/arginase activity, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Similarly, p-STAT4/p-STAT6 ratio was significantly increased in macrophages of T1D than in macrophages of healthy controls ($p < 0.001$ by Mann-Whitney U test). Additionally, treatment of cells with HDL induced a significant decrease in the levels of the all evaluated ratios, whether in the cultures of T1D cells or in that of cells from healthy controls (T1D cells: IL-1b/IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10 and NO/arginase activity, $p < 0.001$; PICs/AICs and p-STAT4/p-STAT6, $p < 0.01$. Healthy control cells: IL-1b/IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, NO/arginase activity and p-STAT4/p-STAT6, $p < 0.001$; PICs/AICs, $p < 0.01$ by Mann-Whitney U test). Exceptionally, treatment with HDL resulted, in contrast, in a slight but not statistically significant increase in the level of IL-1b/IL-10 ratio in the co-culture of cells from healthy controls ($p = 0.366$ by Mann-Whitney U test). For multiple comparisons using Kruskal-Wallis test, p-values were less than 0.001 for all the evaluated ratios.

4. Discussion

Various studies reported the specific properties of HDL such as anti-atherogenic, anti-inflammatory, antioxidant, and anti-apoptotic [51,52]. Additionally, some studies demonstrated that HDL treatment can inhibit the production of proinflammatory cytokines, including macrophage IL-1b [53].

It has been reported that HDL can also exert multiple immunomodulation effects. Lipid rafts of the plasma membrane are the key structure responsible for such effects that result from the depletion of cholesterol from microdomains after their interaction with HDL [54]. HDL has also the ability to drive the macrophage to M2 anti-inflammatory state, modulates recruitment/adhesion of monocytes, and inhibits their inflammatory response [55]. Additionally, HDL can inhibit antigen presentation, T cell activation and proliferation [56]. These effects give an important aspect of the HDL action on both innate and adaptive immune responses [26].

Considering these new insights, we have evaluated for the first time the effect of HDL on functional activities of macrophage and on the modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines production during ex vivo macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes.

4.1. Effect of HDL on the production of IL-1b

Although IL-1b could be generated by different cell lines, including polarized Th17 cells [57], it is considered as a specific signal 3 macrophage-derived cytokine required for CD4⁺ T cell activation [58], and as a signature cytokine for classically proinflammatory activated macrophage (CAM, M1) [37,59,60]. It is an

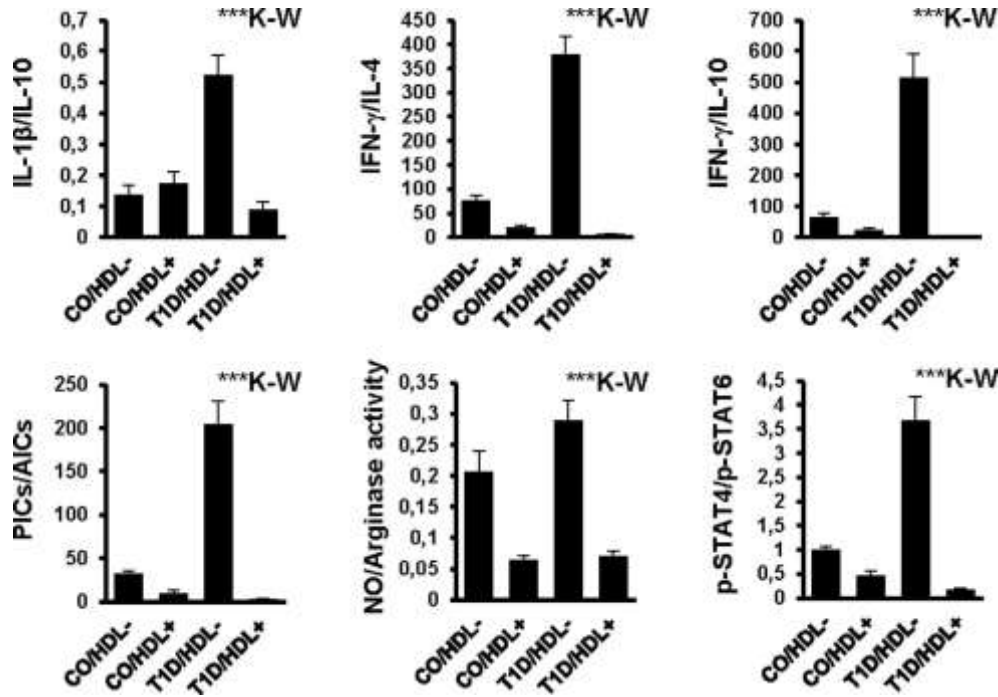


Fig. 10. Effect of HDL on the balance of proinflammatory versus anti-inflammatory cytokines, NO production versus arginase activity and p-STAT4 versus p-STAT6 in the co-culture system of human T1D macrophages and CD4⁺ T cells. The PICs/AICs ratio was estimated from the [IL-1b + IL-2 + IFN-C]/[IL-4 + IL-10] ratio. Values correspond to the mean ± standard error of mean (SEM) of four (IL-1b/IL-10, IFN-C/IL-4, IFN-C/IL-10, PICs/AICs, and p-STAT4/p-STAT6 ratios) or Pve (NO production/arginase activity ratio) independent experiments in each group. AICs: anti-inflammatory cytokines, HDL: high density lipoprotein, IL: interleukin, IFN-C: interferon gamma, NO: nitric oxide, PICs: proinflammatory cytokines, p-STAT: phosphorylated signal transducer and activator of transcription, Th: T helper, K-W: Kruskal-Wallis test, T1D: type 1 diabetes, CO/HDL : cells from healthy controls not treated with HDL, CO/HDL+: cells from healthy controls treated with HDL, T1D/HDL : T1D cells not treated with HDL, T1D/HDL+: T1D cells treated with HDL. ***p < 0.001 by Kruskal-Wallis test. Statistical differences highlighted among different groups are given as follows by Mann-Whitney U test: (i) IL-1b/IL-10; CO/HDL vs. T1D/HDL , p < 0.01; CO/HDL vs. T1D/HDL + , p < 0.01, CO/HDL + vs. T1D/HDL , p < 0.01; CO/HDL + vs. T1D/HDL+, p < 0.01; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001. (ii) NO production/arginase activity; CO/HDL vs. CO/HDL+, p < 0.001; CO/HDL vs. T1D/HDL , p < 0.05; CO/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, CO/HDL+ vs. T1D/HDL , p < 0.001; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, (iii) p-STAT4/p-STAT6; CO/HDL vs. CO/HDL+, p < 0.01; CO/HDL vs. T1D/HDL , p < 0.001; CO/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, CO/HDL + vs. T1D/HDL , p < 0.001; CO/HDL + vs. T1D/HDL+, p < 0.001; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, (iv) IFN-C/IL-4; CO/HDL vs. CO/HDL+, p < 0.001; CO/HDL vs. T1D/HDL , p < 0.001; CO/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, CO/HDL+ vs. T1D/HDL , p < 0.001; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, p < 0.01; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, (v) IFN-C/IL-10; CO/HDL vs. CO/HDL+, p < 0.001; CO/HDL vs. T1D/HDL , p < 0.001; CO/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, CO/HDL+ vs. T1D/HDL , p < 0.001; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, p < 0.01; T1D/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, (vi) PICs/AICs; CO/HDL vs. CO/HDL+, p < 0.001; CO/HDL vs. T1D/HDL , p < 0.001; CO/HDL vs. T1D/HDL+, p < 0.001, CO/HDL+ vs. T1D/HDL , p < 0.001; CO/HDL+ vs. T1D/HDL+, p < 0.001.

important inflammatory mediator involved in a variety of cellular activities, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis. In our study, we observed that HDL treatment down-regulated the production of IL-1b levels in the co-culture of T1D cells, but up-regulated the production of such cytokine in the co-culture of cells from healthy controls. Although a number of studies have shown the inhibitory effect of HDLs or their content on the production of proinflammatory cytokines [61,62], we cannot compare our results with other data because no studies have been done in the same context of our work. Additionally, conflicting results may reflect in part the differences in the type of disease studied and cell types used.

4.2. Effect of HDL on the production of IL-2

IL-2 has been characterized as a Th1-like cytokine [63] that plays a central role in the activation and proliferation of lymphocytes that have been primed by antigens. This cytokine has a pleiotropic role, which drives differentiation, survival and expansion of multiple cell types [64], by stimulating anti-apoptotic, cell cycle, and cytokine genes. It has been reported that IL-2 can override PD-1-mediated inhibition, and that PD-1 may inhibit T cell function and survival indirectly through IL-2 [65]. In our study we observed that HDL treatment resulted in decreased production of IL-2. In T1D, decreasing production of IL-2 could be a double-edged sword, because the activation of regulatory cells protecting

b-cells against autoreactive T cells requires necessarily the presence of such cytokine. So although IL-2 plays a key role in T cell activation and expansion, it serves as a negative regulator of autoimmunity [66]. This observation leads to raising the hypothesis as to whether or not HDLs could have an effect on the function of regulatory cells in human T1D.

4.3. Effect of HDL on the production of regulatory/anti-inflammatory cytokine IL-10

IL-10 is frequently referred to as Th2 cell-derived anti-inflammatory cytokine [67]. It is specifically produced as a regulatory cytokine by Foxp3 type 1 CD4⁺ regulatory T (Tr1) cells [68], but also by alternatively anti-inflammatory activated macrophages (AAM, M2) [69,71]. Numerous other subtypes of CD4⁺ T cells have, however, been shown to produce IL-10 depending on environment cytokines and intrinsic factors [72]. Its main biological functions seem to limit and terminate the inflammatory responses and inhibits both antigen presentation by macrophage [73], as well as subsequent release of proinflammatory cytokines [74], including IFN-C, IL-1, and IL-2 [75]. Additionally, IL-10 can also act on regulatory T cells to maintain transcription factor Foxp3 expression [76], which can lead to the development of anergic in specific T cells [77]. In view of that, IL-10 has been considered as a critical biomarker molecule for preventing inflammatory and autoimmune pathologies [78]. Of interest, decreasing in the number and/or

function of regulatory cells has been shown to be involved in T1D development. Here, we confirm recent findings regarding the decrease in the levels of IL-10 in T1D [79,81]. Additionally, the effect of HDLs on the increased expression of IL-10 could be demonstrated by the recent observation indicating that HDL and its major protein component apoA-I exert anti-inflammatory effects, inhibit monocyte chemotaxis/adhesion, and reduce vascular macrophage content in inflammatory conditions, as well as up-regulate LPS-induced IL-10 expression [82]. Nevertheless, the difficulty lies in the lack of similar studies on T1D allowing us to compare our results with others. Additionally, it would be of great interest to determine, using a mechanistic study, which cell type is the driver of the change in IL-10 levels.

4.4. Effect of HDL on the production of Th1- and Th2-related cytokines

It is well known that T1D results from the destruction of β -cells by autoreactive T cells, following the action of proinflammatory cytokines. Some research have suggested that IFN- γ , IL-1 β and IL-2 cytokines produced by T cells and macrophages, play an important role in T1D, and are considered to be mediators of stress and death of β -cells [8]. The immune activities of Th1 and Th2 cells are mutually counterregulated, defining a Th1/Th2 balance and homeostatic control. Cytokines that promote Th1 activity tend to down-regulate Th2 activity and in turn Th2 domination inhibits Th1 activity. The balance between T helper cell production of IFN- γ as opposed to IL-4 and IL-10 is particularly important since the Th2 cytokines IL-4 and IL-10 inhibit Th1 activity and the Th1 cytokine IFN- γ inhibits Th2 activity [83]. It has previously been reported that the imbalance in T helper cell polarization contributes to the gender difference in T1D development in NOD mice [84], in which the increased susceptibility of female mice to the development of T1D has been related to the enhancement of the Th1 immune response through the increase of IL-12-induced STAT4 activation by estrogen [85]. In our study, the increased levels of IFN- γ and/or the decreased of those of IL-4 corroborate numerous studies [79,81,86,88]. Levels of both cytokines were reversed after treatment with HDL, which induced down-regulation of IFN- γ and up-regulation of IL-4. Our results can agree with recent study conducted specifically on polarized M1 and M2 macrophages [35]. Nevertheless, it is not easy to discuss our results by comparing them with other findings because we investigate for the first time the effect of HDLs on the modulation of the expression of such cytokines in T1D.

4.5. Effect of HDL on intracellular free calcium ions

Although no effect was noticed in co-cultures of cells from healthy controls, we observed that the HDL treatment induces an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels in the co-culture of T1D cells. Hence, it is well known that HDL leads to an increase of the intracellular calcium concentration in various types of cells in culture, including endothelial cells [89] and macrophages [90]. The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels may be involved as a second messenger for early activation of CD4⁺ T cells [91], and can be able to drive IL-2 production [92]. In our study, although the levels of IL-1 β and IL-2, as well as other proinflammatory markers were decreased following the HDL treatment, those of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were increased, which can mainly explained by a crosstalk between calcium-dependent cell signaling pathways. Thus, it has been reported that the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels could also serve as a signal for macrophage to modulate inflammation [93] and respiratory burst [94], and as an important mean for the regulation of T cell activation, tolerance of self-antigens, and homeostasis through crosstalk [95]. Finally, it remains to be seen whether the down-regulation effect of HDL on inflammation would be calcium-independent.

4.6. Effect of HDL on functional activities of macrophage

It has previously shown in mouse model of T1D that oxidative stress is one of the main factors involved in islets and vascular tissue damage [96]. Macrophages are able to increase oxidative stress during respiratory burst by producing ROS and RNS, including NO and H₂O₂ [97,98], and therefore participate in the β -cell death. Of note, the evaluation of macrophage role in the pathogenesis of T1D should consider all its functional activities, i.e. not only the oxidative burst, but also the activity of phagocytosis and intracellular bacterial killing. In our study, we observed that HDL treatment markedly induced decrease in the overall macrophage functional activities. Accordingly, recent study demonstrated that HDL plays a key role in the regulation of phagocytic cell activity by ApoA-I and apoA-II and stabilization of endogenous ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7) [99]. Additionally, our results can be considered consistent with previous report indicating that HDL are able to decrease oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils (PMN) [100].

4.7. Effect of HDL on arginase activity

The arginase is considered as one of the main anti-inflammatory mediators in the macrophage. It inhibits the NO production, but also T cell activation by decreasing levels of L-arginine [101], and this appears to be as an essential mechanism of inflammation-associated immunosuppression. Therefore, increased activity of arginase and/or the decreased levels of NO production could be used as a good marker of the efficacy of anti-inflammatory drugs, or to check the role and the efficacy of bioactive molecules that are suspected to have an anti-inflammatory or an immunomodulatory effect. So to the best of our knowledge, we show for the first time that HDL up-regulated the activity of arginase in T1D.

4.8. Effect of HDL on STAT4 and STAT6 phosphorylation in macrophage stimulated by the respective Th1- and Th2-related cytokines

STAT proteins are involved in the regulation of various cellular processes such as growth, differentiation, survival, and apoptosis, as well as immune response-induced cytokines. STAT are activated by Janus tyrosine kinases (JAK), which in turn are activated by cytokines. Of the STAT family, STAT4 is mainly activated after stimulation of T cells by IL-12, but can also be activated with Th1 cytokine-enriched microenvironment IFN- γ . In contrast, the Th2 cytokine-enriched IL-4 activates STAT6, which is in turn critical for the development of Th2 cells. Our results confirm those we recently demonstrated in monocytes of recent-onset T1D [79]. Additionally, new therapeutic approaches of HDL could be demonstrated in the current study by highlighting its potential anti-inflammatory property by up-regulation of the relative phosphorylation of STAT6 on tyrosine 641 (Y641) and down-regulation of that of STAT4 on tyrosine 693 (Y693) in macrophage at the recent-onset T1D.

4.9. Effect of HDL on the balance of proinflammatory versus anti-inflammatory cytokines, NO production versus arginase activity and p-STAT4 versus p-STAT6

Our results show increased inflammation-related immune dysregulation at the beginning of T1D, as evidenced by increased ratio of IL-1 β /IL-10, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, PICs/AICs, NO production/ arginase activity and p-STAT4/p-STAT6. Of note, in addition to the phosphorylation levels of STAT4 and STAT6, the classically activated proinflammatory M1 macrophages and the alternatively activated anti-inflammatory M2 macrophages can be respectively

defined by NOS and arginase [102]. CD4⁺ T cell-related cytokines, including that derived from T helper sub-types and Treg cells, play a crucial role in the macrophage polarization. In turn, the macrophage has also the ability to promote inflammation and Th1 cells (M1 macrophages), or regulation/repair and Th2 cells (M2 macrophages). Therefore, this reciprocal relationship between macrophages and CD4⁺ T cells could be influenced in the same way by the cellular microenvironment. Additionally, it has been reported that, in T1D, the loss of B-cell mass is not caused only by increased production of proinflammatory cytokines, but it can also be induced by a concomitant loss of anti-inflammatory cytokines [79,103]. Consequently, ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production would be of great interest to determine the overall immunomodulatory efficacy of any drug. In support of this opinion, we observed that HDL treatment induced decreased not only in the individual ratio of proinflammatory/anti-inflammatory cytokines, but also in the ratio of combined proinflammatory/anti-inflammatory cytokines. These results more extensively demonstrate the anti-inflammatory and immunoregulatory effects of HDL at the beginning of T1D.

5. Conclusions and future prospects

HDL metabolism represents a major target for the development of therapies. This study supported the hypothesis that high density lipoproteins can modulate both the functional activities of macrophages and immunoinflammatory response during reciprocal macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the recent-onset human T1D. It would be interesting to try other approaches on the molecular mechanisms of HDL on individual populations of the two cells and its effects on antigen presentation and cell-cell contacts. Additionally, although it is now well-established that both CD4⁺ T cells and monocytes/macrophages isolated from type 1 diabetics exhibit an inflammatory feature and secrete increased levels of proinflammatory cytokines, it would be wise to determine the starting populations of both CD4⁺ T cell and macrophage subsets and baseline levels of cytokines produced by each of them. Additionally, it would be of great interest to check mechanistically the effect of HDL on $i\text{Ca}^{2+}$ in immune mononuclear cells at the recent-onset T1D. Finally, the clinical evaluation will always be necessary to determine the in vivo impact of HDL in newly-diagnosed type 1 diabetic patients to reverse the activation of inflammatory pathways.

Conflict of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like give full acknowledgment to Dr. Malik Hamaidia (GIGA-Cancer, Laboratory of Cellular and Molecular Epigenetics, University of Liège, Belgium) for his intellectual input, various suggestions and proofreading of the manuscript.

References

- [1] T.L. van Belle, K.T. Coppieters, M.G. von Herrath, Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 79D118, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00003.2010>.
- [2] M. Li, L.-J. Song, X.-Y. Qin, Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes, *J. Cell Mol. Med.* 18 (2014) 749D758, <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12270>.
- [3] B.O. Roep, M. Peakman, Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (2012) a007781, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a007781>.
- [4] H. Yagi, M. Matsumoto, K. Kunimoto, J. Kawaguchi, S. Makino, M. Harada, Analysis of the roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in autoimmune diabetes of

- NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice, *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 2387D2393, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830220931>.
- [5] P.R. Hutchings, A. Cooke, The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males, *J. Autoimmun.* 3 (1990) 175D185.
- [6] A.E. Long, K.M. Gillespie, S. Rokni, P.J. Bingley, A.J.K. Williams, Rising incidence of type 1 diabetes is associated with altered immunophenotype at diagnosis, *Diabetes* 61 (2012) 683D686, <http://dx.doi.org/10.2337/db11-0962>.
- [7] A. Lehuen, J. Diana, P. Zaccane, A. Cooke, Immune cell crosstalk in type 1 diabetes, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 501D513, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2787>.
- [8] K.L. Graham, R.M. Sutherland, S.I. Mannering, Y. Zhao, J. Chee, B. Krishnamurthy, et al., Pathogenic mechanisms in type 1 diabetes: the islet is both target and driver of disease, *Rev. Diabet. Stud. RDS* 9 (2012) 148D168, <http://dx.doi.org/10.1900/RDS.2012.9.148>.
- [9] L. Steinman, A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage, *Nat. Med.* 13 (2007) 139D 145, <http://dx.doi.org/10.1038/nm1551>.
- [10] M. Aribi, S. Moulessehoul, M. Kendouci-Tani, A.B. Benabadi, A. Hichami, N.A. Khan, Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients, *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 3 (2007) CR372D378.
- [11] A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes, *Cell Biochem. Biophys.* 48 (2007) 159D163.
- [12] M. Rachmiel, O. Bloch, T. Bistritz, N. Weintrob, R. Ofan, N. Koren-Morag, et al., TH1/TH2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma, *Cytokine* 34 (2006) 170D176, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2006.04.012>.
- [13] H.L. Twigg, Macrophages in innate and acquired immunity, *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 25 (2004) 21D31, <http://dx.doi.org/10.1055/s-2004-822302>.
- [14] J.-W. Yoon, H.-S. Jun, Autoimmune destruction of pancreatic beta cells, *Am. J. Ther.* 12 (2005) 580D591.
- [15] H.S. Baek, J.W. Yoon, Direct involvement of macrophages in destruction of beta-cells leading to development of diabetes in virus-infected mice, *Diabetes* 40 (1991) 1586D1597.
- [16] Y.-S. Lee, N. Li, S. Shin, H.-S. Jun, Role of nitric oxide in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice, *J. Virol.* 83 (2009) 8004D8011, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00205-09>.
- [17] K.R. Feingold, C. Grunfeld, Introduction to Lipids and Lipoproteins, in: L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, et al. (Eds.), *Endotext*, MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000.
- [18] X. Zhu, J.S. Owen, M.D. Wilson, H. Li, G.L. GrifPths, M.J. Thomas, et al., Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 3196D3206, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M006486>.
- [19] K. Yin, D. Liao, C. Tang, ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport, *Mol. Med. Camb. Mass* 16 (2010) 438D449, <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2010.00004>.
- [20] M.G. Sorci-Thomas, M.J. Thomas, High density lipoprotein biogenesis, cholesterol efflux, and immune cell function, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 2561D2565, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300135>.
- [21] E.M. Hiltbold, N.J. Poloso, P.A. Roche, MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse, *J. Immunol. Baltim. Md.* 2003 (170) (1950) 1329D1338.
- [22] N.J. Poloso, P.A. Roche, Association of MHC class II-peptide complexes with plasma membrane lipid microdomains, *Curr. Opin. Immunol.* 16 (2004) 103D 107.
- [23] L. Gruaz, C. Delucinge-Vivier, P. Descombes, J.-M. Dayer, D. Burger, Blockade of T cell contact-activation of human monocytes by high-density lipoproteins reveals a new pattern of cytokine and inflammatory genes, *PLoS ONE* 5 (2010) e9418, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009418>.
- [24] S. Parra, A. Castro, L. Masana, The pleiotropic role of HDL in autoimmune diseases, *Clinica E Investig. En Arterioscler. Publ. Soc. Esp. Arterioscler.* 27 (2015) 97D106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2014.09.002>.
- [25] A.J. Murphy, J.P.F. Chin-Dusting, D. Sviridov, K.J. Woollard, The anti inflammatory effects of high density lipoproteins, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 667D675.
- [26] A.L. Catapano, A. Pirillo, F. Bonacina, G.D. Norata, HDL in innate and adaptive immunity, *Cardiovasc. Res.* 103 (2014) 372D383, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvu150>.
- [27] D. De Nardo, L.I. Labzin, H. Kono, R. Seki, S.V. Schmidt, M. Beyer, et al., High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3, *Nat. Immunol.* 15 (2014) 152D160, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2784>.
- [28] I. Tiniakou, E. Drakos, V. Sinatkas, M. Van Eck, V.J. Zannis, D. Boumpas, et al., High-density lipoprotein attenuates Th1 and Th17 autoimmune responses by modulating dendritic cell maturation and function, *J. Immunol. Baltim. Md.* 2015 (194) (1950) 4676D4687, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1402870>.
- [29] A.H. Hasty, M.R. Plummer, K.H. Weisgraber, M.F. Linton, S. Fazio, L.L. Swift, The recycling of apolipoprotein E in macrophages: influence of HDL and apolipoprotein A-I, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 1433D1439, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M400418-JLR200>.
- [30] P.A.C. McPherson, I.S. Young, B. McKibben, J. McEneny, High density lipoprotein subfractions: isolation, composition, and their duplicative role in oxidation, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 86D95, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M600094-JLR200>.

- [31] D. Liu, L. Ji, D. Zhang, X. Tong, B. Pan, P. Liu, et al., Nonenzymatic glycation of high-density lipoprotein impairs its anti-inflammatory effects in innate immunity, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 28 (2012) 186D195, <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.1297>.
- [32] D. Liu, L. Ji, X. Tong, B. Pan, J.-Y. Han, Y. Huang, et al., Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301 (2011) C739D748, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00055.2011>.
- [33] C. Schebesch, V. Kodolja, C. Mýller, N. Hakij, S. Bisson, C.E. Orfanos, et al., Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro, *Immunology* 92 (1997) 478D486.
- [34] C.E. Arnold, P. Gordon, R.N. Barker, H.M. Wilson, The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses, *Immunobiology* 220 (2015) 10D19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.09.022>.
- [35] M. Sanson, E. Distel, E.A. Fisher, HDL induces the expression of the M2 macrophage markers arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-dependent process, *PLoS ONE* 8 (2013) e74676, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074676>.
- [36] L. Perrin-Cocon, O. Diaz, M. Carreras, S. Dollet, A. Guironnet-Paquet, P. Andr z, et al., High-density lipoprotein phospholipids interfere with dendritic cell Th1 functional maturation, *Immunobiology* 217 (2012) 91D99, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.030>.
- [37] W. Nouari, L. Ysmail-Dahlouk, M. Aribi, Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. Immunopharmacol.* 30 (2016) 94D101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>.
- [38] K.E. Iles, D.A. Dickinson, N. Watanabe, T. Iwamoto, H.J. Forman, AP-1 activation through endogenous H₂O₂ generation by alveolar macrophages, *Free Radic Biol. Med.* 32 (2002) 1304D1313.
- [39] M. Aribi, W. Meziane, S. Habi, Y. Boulatika, H. Marchandin, J.-L. Aymeric, Macrophage bactericidal activities against staphylococcus aureus are enhanced in vivo by selenium supplementation in a dose-dependent manner, *PLoS ONE* 10 (2015) e0135515, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>.
- [40] E. Pick, Y. Keisari, A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J. Immunol. Methods* 38 (1980) 161D170.
- [41] P.G. Duane, J.B. Rubins, H.R. Weisel, E.N. Janoff, Identification of hydrogen peroxide as a streptococcus pneumoniae toxin for rat alveolar epithelial cells, *Infect. Immun.* 61 (1993) 4392D4397.
- [42] C.D. Pericone, K. Overweg, P.W. Hermans, J.N. Weiser, Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract, *Infect. Immun.* 68 (2000) 3990D3997.
- [43] H.J. Gitelman, An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens, *Anal. Biochem.* 18 (1967) 521D531, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90110-8](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(67)90110-8).
- [44] J.P. Rasigade, A. Moulay, Y. Lhoste, A. Tristan, M. Bes, F. Vandenesch, et al., Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by staphylococcus aureus, *BMC Microbiol.* 11 (2011) 263, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-263>.
- [45] T.A. Wynn, L. Barron, R.W. Thompson, S.K. Madala, M.S. Wilson, A.W. Cheever, et al., Quantitative assessment of macrophage functions in repair and fibrosis, *Curr. Protoc. Immunol. Ed. John E Coligan Al.* (2011), <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im1422s93> (Chapter 14:Unit14.22).
- [46] I.M. Corraliza, M.L. Campo, G. Soler, M. Modolell, Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod, *J. Immunol. Methods* 174 (1994) 231D235.
- [47] J.W. Geyer, D. Dabich, Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates, *Anal. Biochem.* 39 (1971) 412D417.
- [48] X. Zhang, J. Zhang, R. Zhang, Y. Guo, C. Wu, X. Mao, et al., Structural, enzymatic and biochemical studies on helicobacter pylori arginase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 995D1002, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.008>.
- [49] D.G. Altman, *Practical Statistics for Medical Research*, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Fla, 1999.
- [50] E. Whitley, J. Ball, Statistics review 6: nonparametric methods, *Crit. Care. Lond. Engl.* 6 (2002) 509D513.
- [51] T. Kameda, R. Ohkawa, K. Yano, Y. Usami, A. Miyazaki, K. Matsuda, et al., Effects of myeloperoxidase-induced oxidation on antiatherogenic functions of high-density lipoprotein, *J. Lipids*. 2015 (2015) 592594, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/592594>.
- [52] C. Mineo, H. Deguchi, J.H. Griffin, P.W. Shaul, Endothelial and antithrombotic actions of HDL, *Circ. Res.* 98 (2006) 1352D1364, <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000225982.01988.93>.
- [53] A. Negre-Salvayre, N. Doussset, G. Ferretti, T. Bacchetti, G. Curatola, R. Salvayre, Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 1031D1040, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.006>.
- [54] A. Larbi, C. Fortin, G. Dupuis, H. Berrougui, A. Khalil, T. Fulop, Immunomodulatory role of high-density lipoproteins: impact on immunosenescence, *Age Dordr. Neth.* 36 (2014) 9712, <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-014-9712-6>.
- [55] J.E. Feig, J.X. Rong, R. Shamir, M. Sanson, Y. Vengrenyuk, J. Liu, et al., HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 7166D7171, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1016086108>.
- [56] S.-H. Wang, S.-G. Yuan, D.-Q. Peng, S.-P. Zhao, HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells, *Atheroscler.* 225 (2012) 105D114, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.029>.
- [57] B.N. Martin, C. Wang, C. Zhang, Z. Kang, M.F. Gulen, J.A. Zepp, et al., T cell-intrinsic ASC critically promotes T(H)17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis, *Nat. Immunol.* 17 (2016) 583D592, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3389>.
- [58] J.M. Curtsinger, M.F. Mescher, Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation, *Curr. Opin. Immunol.* 22 (2010) 333D340, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.013>.
- [59] M.M. Alvarez, J.C. Liu, G. Trujillo-de Santiago, B.-H. Cha, A. Vishwakarma, A.M. Ghaemmaghami, et al., Delivery strategies to control inflammatory response: modulating M1DM2 polarization in tissue engineering applications, *J. Control Release Off. J. Control Release Soc.* 240 (2016) 349D363, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.026>.
- [60] Ł. Buldak, G. Machnik, R.J. Buldak, K. Łabuzek, A. Boldys, D. Belowski, et al., Exenatide (a GLP-1 agonist) expresses anti-inflammatory properties in cultured human monocytes/macrophages in a protein kinase A and B/Akt manner, *Pharmacol. Rep. PR* 68 (2016) 329D337, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2015.10.008>.
- [61] R. Carpintero, L. Gruaz, K.J. Brandt, A. Scanu, D. Faille, V. Combes, et al., HDL interfere with the binding of T cell microparticles to human monocytes to inhibit pro-inflammatory cytokine production, *PLoS ONE* 5 (2010) e11869, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011869>.
- [62] N. Hyka, J.M. Dayer, C. Modoux, T. Kohno, C.K. Edwards, P. Roux-Lombard, et al., Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes, *Blood* 97 (2001) 2381D2389.
- [63] E.S. Hwang, J.-H. Hong, L.H. Glimcher, IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1289D1300, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051044>.
- [64] S.A. Long, J.H. Buckner, C.J. Greenbaum, IL-2 therapy in type 1 diabetes: ÔÖTrialsÔ and tribulations, *Clin. Immunol. Orlando. Fla* 149 (2013) 324D331, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2013.02.005>.
- [65] L.M. Francisco, P.T. Sage, A.H. Sharpe, The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity, *Immunol. Rev.* 236 (2010) 219D242, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>.
- [66] R. Sharma, S.M. Fu, S.-T. Ju, IL-2: a two-faced master regulator of autoimmunity, *J. Autoimmun.* 36 (2011) 91D97, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2011.01.001>.
- [67] K. Asadullah, W. Sterry, H.D. Volk, Interleukin-10 therapy: Review of a new approach, *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 241D269, <http://dx.doi.org/10.1124/pr.55.2.4>.
- [68] Y. Yao, J. Vent-Schmidt, M.D. McGeough, M. Wong, H.M. Hoffman, T.S. Steiner, et al., Tr1 Cells, but Not Foxp3+ regulatory T cells, suppress NLRP3 inflammasome activation via an IL-10-dependent mechanism, *J. Immunol. Baltim. Md.* 2015 (195) (1950) 488D497, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1403225>.
- [69] S. Oishi, R. Takano, S. Tamura, S. Tani, M. Iwaizumi, Y. Hamaya, et al., M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation, *Immunology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12647>.
- [70] K. Nakamura, I. Ito, M. Kobayashi, D.N. Herndon, F. Suzuki, Orosomucoid 1 drives opportunistic infections through the polarization of monocytes to the M2b phenotype, *Cytokine* 73 (2015) 8D15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.017>.
- [71] C.M.W. van Stijn, J. Kim, A.J. Lusic, G.D. Barish, R.K. Tangirala, Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29 (2015) 636D649, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.14-253831>.
- [72] M. Saraiva, A. OÖGarra, The regulation of IL-10 production by immune cells, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 170D181, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2711>.
- [73] S.K. Mittal, K.-J. Cho, S. Ishido, P.A. Roche, Interleukin 10 (IL-10)-mediated immunosuppression: MARCH-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 27158D27167, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.682708>.
- [74] M.-C. Li, S.-H. He, IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 620D625.
- [75] J.C. Cyktor, J. Turner, Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens, *Infect. Immun.* 79 (2011) 2964D2973, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00047-11>.
- [76] S. Wang, X. Gao, G. Shen, W. Wang, J. Li, J. Zhao, et al., Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24249, <http://dx.doi.org/10.1038/srep24249>.
- [77] C.A. Akdis, K. Blaser, IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 13 (1999) 603D609.

- [78] R. Sabat, G. Grȳtz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, et al., Biology of interleukin-10, *Cytokine Growth Factor Rev.* 21 (2010) 331D344, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>.
- [79] L. Ysmail-Dahlouk, W. Nouari, M. Aribi, 1,25-dihydroxyvitamin D3 down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes, *Immunol. Lett.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.10.002>.
- [80] M. Cetkovic-Cvrilje, M. Olson, B. Schindler, H.K. Gong, Exposure to DDT metabolite p, p'-DDE increases autoimmune type 1 diabetes incidence in NOD mouse model, *J. Immunotoxicol.* 13 (2016) 108D118, <http://dx.doi.org/10.3109/1547691X.2015.1017060>.
- [81] N. Kikodze, I. Pantsulaia, K. Rekhviashvili, M. Iobadze, N. Dzhakhutashvili, N. Pantsulaia, et al., Cytokines and T regulatory cells in the pathogenesis of type 1 diabetes, *Georgian Med. News* (2013) 29D35.
- [82] L.E. Smythies, C.R. White, A. Maheshwari, M.N. Palgunachari, G.M. Anantharamaiah, M. Chaddha, et al., Apolipoprotein A-I mimetic 4F alters the function of human monocyte-derived macrophages, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 (2010) C1538D1548, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00467.2009>.
- [83] A. Clow, F. Hucklebridge (Eds.), *Neurobiology of the Immune System*, Acad. Press, Amsterdam, 2002.
- [84] C. Sia, Imbalance in Th cell polarization and its relevance in type 1 diabetes mellitus, *Rev. Diabet. Stud.* RDS 2 (2005) 182D186, <http://dx.doi.org/10.1900/RDS.2005.2.182>.
- [85] M. Bao, Y. Yang, H.-S. Jun, J.-W. Yoon, Molecular mechanisms for gender differences in susceptibility to T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice, *J. Immunol.* Baltim. Md. 2002 (168) (1950) 5369D 5375.
- [86] K. Singh, E. Kadesjȳ, J. Lindroos, M. Hjort, M. Lundberg, D. Espes, et al., Interleukin-35 administration counteracts established murine type 1 diabetesDpossible involvement of regulatory T cells, *Sci. Rep.* 5 (2015) 12633, <http://dx.doi.org/10.1038/srep12633>.
- [87] M.H. Mahmoud, G. Badr, B.M. Badr, A.U. Kassem, M.S. Mohamed, Elevated IFN-alpha/beta levels in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model promote oxidative stress and mediate depletion of spleen-homing CD8 + T cells by apoptosis through impaired CCL21/CCR7 axis and IL-7/CD127 signaling, *Cell. Signal.* 27 (2015) 2110D2119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.07.005>.
- [88] J.A. Bluestone, K. Herold, G. Eisenbarth, Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes, *Nature* 464 (2010) 1293D1300.
- [89] C. Mineo, P.W. Shaul, Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol, *Circ. Res.* 111 (2012) 1079D1090, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258673>.
A. Al-Jarallah, X. Chen, L. Gonzaĺez, B.L. Trigatti, High density lipoprotein stimulated migration of macrophages depends on the scavenger receptor class B, type I, PDZK1 and Akt1 and is blocked by sphingosine 1 phosphate receptor antagonists, *PLoS ONE* 9 (2014) e106487, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106487>.
- [91] P. Gardner, Calcium and T lymphocyte activation, *Cell* 59 (1989) 15D20.
- [92] B.B. Au-Yeung, J. Zikherman, J.L. Mueller, J.F. Ashouri, M. Matloubian, D.A. Cheng, et al., A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014) E3679D3688, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1413726111>.
- [93] S. Beceiro, J.N. Radin, R. Chatuvedi, M.B. Piazuelo, D.J. Horvarth, H. Cortado, et al., TRPM2 ion channels regulate macrophage polarization and gastric inflammation during helicobacter pylori infection, *Mucosal Immunol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2016.60>.
- [94] C.R. Hoyal, A.P. Thomas, H.J. Forman, Hydroperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 29205D29210.
- [95] K.M. Fracchia, C.Y. Pai, C.M. Walsh, Modulation of T cell metabolism and function through calcium signaling, *Front. Immunol.* 4 (2013) 324, <http://dx.doi.org/10.3389/fmmu.2013.00324>.
- [96] K. Haskins, B. Bradley, K. Powers, V. Fadok, S. Flores, X. Ling, et al., Oxidative stress in type 1 diabetes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1005 (2003) 43D54.
- [97] H.J. Forman, M. Torres, Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) S4D8, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.2206007>.
- [98] T. Seres, R.G. Knickelbein, J.B. Warshaw, R.B. Johnston, The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione, *J. Immunol.* Baltim. Md. 2000 (165) (1950) 3333D3340.
- [99] N. Tanaka, S. Abe-Dohmae, N. Iwamoto, M.L. Fitzgerald, S. Yokoyama, Helical apolipoproteins of high-density lipoprotein enhance phagocytosis by stabilizing ATP-binding cassette transporter A7, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 2591D2599, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M006049>.
- [100] S. Kopprasch, J. Pietzsch, J. Graessler, The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL, *Mol. Cell. Biochem.* 258 (2004) 121D127.
- [101] C. Najac, M.M. Chaumeil, G. Kohanbash, C. Guglielmetti, J.W. Gordon, H. Okada, et al., Detection of inflammatory cell function using (13)C magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized [6-(13)C]-arginine, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31397, <http://dx.doi.org/10.1038/srep31397>.
- [102] M. Rath, I. Mȳller, P. Kropf, E.I. Closs, M. Munder, Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages, *Front. Immunol.* 5 (2014) 532, <http://dx.doi.org/10.3389/fmmu.2014.00532>.
- [103] M.A. Russell, N.G. Morgan, The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic b-cell, *Islets* 6 (2014) e950547, <http://dx.doi.org/10.4161/19382014.2014.950547>

Résumé

Introduction : Le diabète de type 1 est une maladie inflammatoire des îlots pancréatiques. Les lymphocytes T CD4+ et les macrophages sont principalement impliqués dans la destruction auto-immune des cellules β dans le Diabète de type 1 (DT1). Bien que certains travaux aient postulé l'existence d'un effet inhibiteur du HDL sur la capacité des cellules présentatrices d'antigènes à stimuler l'activation des lymphocytes T, aucune investigation démontrant l'impact du HDL sur le DT1 n'a été menée à ce jour.

Objectif : Le but cette étude consiste, d'une part à examiner l'effet ex vivo des lipoprotéines de haute densité (HDL) sur les activités fonctionnelles des macrophages et d'autre part à étudier leurs capacités à réguler la production des cytokines dans les co-cultures de macrophages-cellules T dans le diabète précoce de type 1.

Matériels et méthodes : L'effet du HDL a été examiné aussi bien sur des macrophages que sur des co-cultures de macrophages /lymphocytes T CD4 + isolés, chez des donneurs volontaires sains et chez des diabétiques de types 1 nouvellement diagnostiqués. Certains des dosages ont été effectués sur les surnageants, d'autres sur les lysats cellulaires traités ou non avec le HDL. Les niveaux de production des cytokines, d'arginase, de l'activité fonctionnelle du macrophage et des quantités relatives des transducteurs de signal STAT4/STAT6 ont été réalisés sur des co-cultures.

Résultats: les résultats des essais ont montré que les niveaux de production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , d'IL-2, d'IFN- γ) ; ceux des paramètres du burst oxydatif (NO et H₂O₂), ceux de la phagocytose et de la destruction bactérienne ainsi que ceux de la phosphorylation de STAT4 (p-STAT4, Tyr693), ont été réduit de manière significative dans les co-cultures de macrophages/lymphocyte T CD4+ traité avec HDL par rapport aux contrôles sains ($p < 0.01$). Les résultats ont montré en outre, que le traitement par HDL a induit une légère augmentation des taux de ifCa²⁺ dans les co-cultures de DT1 par rapport aux témoins sains malgré une différence peu significative ($p > 0,05$). Ils ont montré d'autre part que le traitement par HDL a induit une augmentation significative sur la production des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, et IL-10), sur l'activité d'arginase et sur la phosphorylation des p-STAT6 (Tyr641) dans la co-culture de cellules de DT1 et de témoins sains par rapport à celle des cellules non traitées par HDL (pour toutes les Comparaisons, ($p < 0,001$)).

Conclusions : Les résultats obtenus sont prometteurs car ils permettent de démontrer pour la première fois que le HDL peut inverser à la fois les activités fonctionnelles des macrophages et la réponse immuno-inflammatoire au début du DT1. Ces résultats précurseurs devraient ouvrir la voie à des essais thérapeutiques à court et à moyen terme.

Mots clé : HDL, diabète de type 1 humain, macrophages / lymphocytes T CD4 +, activités fonctionnelles des macrophages, cytokines pro-inflammatoire et anti-inflammatoire, p-STAT4 et p-STAT6

Abstract

Background. Both CD4+ T cells and macrophages are mainly involved in the autoimmune-mediated β -cells destruction in type 1 diabetes (T1D). The aim of this study was to examine the effect of HDL on functional activities of macrophage and its ability to regulate the production of cytokines in autologous mixed macrophage/CD4+ T cells at the recent-onset human type 1 diabetes.

Methods. Cell samples were isolated from volunteers with recent-onset T1D or healthy controls.

Results. The levels of the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , nitric oxide (NO), and hydrogen peroxide (H₂O₂) were significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls. Similarly, those of intracellular free calcium ions (ifCa²⁺) were slightly, but not significantly increased ($p > 0.05$). Conversely, macrophage exhibited significantly decreased levels of the relative tyrosine phosphorylation of STAT6 (p-STAT6, Tyr641) in culture of T1D cells than in that of cells from healthy controls; while those of p-STAT4 (Tyr693) were significantly increased. Likewise, the levels of IL-4 and IL-10 were significantly decreased in the co-culture of T1D cells compared to co-culture of cells from healthy controls. Additionally, HDL treatment significantly down-regulated the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , NO, H₂O₂, phagocytosis, bacterial killing, the relative tyrosine phosphorylation of macrophage-expressed STAT4 (p-STAT4, Tyr693), as well as the ratio of IL-1 β /IL-10, NO production/arginase activity, p-STAT4/p-STAT6, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, and the combined proinflammatory (PICs)/anti-inflammatory (AICs) cytokines. Moreover, HDL treatment significantly up-regulated the production of IL-4, IL-10, arginase activity, and p-STAT6 (Tyr641) (for all comparisons, $p < 0.001$).

Conclusions. We show for the first time that HDL may reverse both the functional activities of macrophages and immunoinflammatory response during reciprocal macrophage-CD4+ T cell crosstalk at the beginning of T1D. These findings should open the way for therapeutic trials in the short- and medium-term.

Keywords. Autologous mixed macrophage/CD4+ T cells, HDL, Human type 1 diabetes, Macrophage functional activities, Proinflammatory and anti-inflammatory, cytokines, p-STAT4 and p-STAT6.

النتائج:

أظهرت نتائج الاختبارات زيادة مستويات إنتاج (IL-1 β ، IL-2، IFN- γ) وأكسيد النيتريك وهيدروكسيد بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) بشكل ملحوظ في الثقافة المشتركة للخلايا T1D بالمقارنة مع خلايا الخلايا من الضوابط الصحية. وبالمثل، كانت تلك من أيونات الكالسيوم الحرة داخل الخلايا (ifCa²⁺) قليلاً، ولكن ليس زيادة كبيرة ($p < 0.05$) وعلى العكس من ذلك، أظهرت البلاعم انخفاضاً كبيراً في مستويات الفسفورة الثيروزينية النسبية ل-STAT6 (p-STAT6، Tyr641) في زراعة خلايا T1D. في حين أن تلك (P-STAT4 (Tyr693) زادت بشكل ملحوظ وبالمثل، فإن مستويات إيل-4 و إيل-10 قد انخفضت بشكل ملحوظ في الثقافة المشتركة للخلايا T1D مقارنة مع ثقافة مشتركة من الخلايا من الضوابط الصحية.

الاستنتاجات:

إن نتائجنا واعدة لأنها أثبتت للمرة الأولى أن HDL يمكن عكس كل من الأنشطة الوظيفية للاضامة والاستجابة المناعية للالتهابات في مرض السكري المبكر من النمط 1. وينبغي لهذه النتائج السلانف تمهيد الطريق لتجارب سريرية في المدى القصير والمتوسط