

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE SAAD DAHLAB, BLIDA -1-**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE**



**Mémoire de fin d'études**  
En vue de l'obtention du diplôme de Master  
EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
**Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES**  
**Option : BIOCHIMIE**

**THÈME**

**Mise au point de l'évaluation de l'activité de la vitamine D in vitro sur les cellules mononuclées circulantes du sang périphérique (PBMCs) du diabétique de type 1**

*Soutenu le : 24/09/2020*

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup> AISSAOUI Amira

M<sup>elle</sup> HADDI Rahil

M<sup>elle</sup> RAHHAL Hadjer

***Devant le jury:***

Mme GUESSAIBIA N.	MCA	USDB-1	Présidente.
Mme AMOKRANE A.	MAA	USDB-1	Examinatrice.
Mme EDDAIKRA A.	MCB	USDB-1	Promotrice.
Mme AZZOUZ M.	Pr	CHUM	Co-promotrice.

Promotion : 2019/2020

## Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier, le **Dieu** tout puissant, qui m'a donné la force, la volonté et le courage d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous tenons à exprimer tout notre profond respect à notre promotrice **Mme EDDAIKRA** , pour son soutien, sa confiance et ses précieux conseils qui nous ont permis à bien mener ce travail.

Nous remercions vivement notre Co-promoteur **Mme le professeur AZZOUZ**, professeur aux CHUM Alger d'avoir accepté de nous accueillir dans son service de diabétologie.

Un grand merci au **Mme GUESSAIBIA**, d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance. Et **Mme AMOKRANE** D'avoir accepté d'examiner notre travail.

À tous ceux qui ont contribué dans de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie tous les enseignants ainsi que tout le personnel du Département de biologie.

# Dédicaces

Merci Allah le tout puissant de nous avoir donné et honoré de plusieurs dons inestimables.

Nous dédions ce modeste travail à :

Nos parents

Nos sœurs et frères

Nos familles

Nos amis

Nos proches et toutes

Nos connaissances ...



# Dédicaces

Merci Allah le tout puissant

Je dédie ce modeste travail

À mes très chères parents, mon père **Mohamed**

et ma mère **Achour Faiza,**

Pour leurs encouragements, leur sacrifice, leur soutien et leur  
patience.

À mes chers frères **El arbi** et **Ahmed**

À ma chère sœur **Rihab**

Ainsi qu'à tous ceux qui sont proches de mon cœur.

## **Dédicaces**

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail,

À ma très chère mère FATIMA Benchamma qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessés de prière pour moi.

À mon père Mohamed qui nous a quitté récemment,  
et qui m'a toujours poussée et motivée dans mes études j'essaye  
d'être forte pour lui

je prie dieu qu'il est pitié de lui et de nous.

À mes chères sœur SIHAM, SOUMIA, AMINA.

À mes chers cousins NABIL, ADEL

Ainsi qu'à tous ceux qui sont proches de mon cœur.

## LISTE DES FIGURES

N° de figure	Titre de figure	N° Page
<b>Figure 1</b>	Phases successives du déroulement du diabète de type 1	3
<b>Figure 2</b>	Étiologie du diabète de type 1	6
<b>Figure 3</b>	Schéma de la molécule d'insuline	7
<b>Figure 4</b>	Représentation schématique de la synthèse d'insuline	8
<b>Figure 5</b>	Structure des vitamines D2 et D3	9
<b>Figure 6</b>	Synthèse et métabolisme de la vitamine D	11
<b>Figure 7</b>	Vitamine D et homéostasie phosphocalcique	12

## LISTE DES TABLEAUX

N° de tableau	Titre de tableau	N° Page
<b>Tableau I</b>	: Apports en vitamine D par les aliments	9

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>1,25(OH)2D3</b> :	1,25-dihydroxy-vitamine D3 ou calcitriol
<b>25(OH)D3</b> :	25OH vitamine D3 ou calcidiol
<b>1 <math>\alpha</math>-OHase</b> :	1 alpha-hydroxylase
<b>25-OHase</b> :	25-hydroxylase
<b>ADO</b> :	Antidiabétiques oraux
<b>CMH</b> :	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CT</b> :	Cholestérol total
<b>CTL</b> :	Cellule T cytotoxique
<b>DT1</b> :	Diabète de type 1
<b>DT2</b> :	Diabète de type 2
<b>EBV</b> :	Virus d'Epstein-Barr ou l'herpès 4
<b>EDTA</b> :	Ethylène diamine tétraacétique
<b>ELISA</b> :	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>FGF23</b> :	Facteur de croissance du fibroblaste 23
<b>FID</b> :	Fédération Internationale du Diabète
<b>GAD</b> :	Glutamate acide décarboxylase
<b>HbA1c</b> :	Hémoglobine glyquée
<b>HDL</b> :	Lipoprotéine de haute densité
<b>HLA</b> :	Antigène de leucocyte humain
<b>IAA</b> :	Auto-anticorps Anti-Insuline
<b>ICA</b> :	Auto-anticorps anti-cellulaires des îlots
<b>IFN</b> :	Interféron
<b>IL</b> :	Interleukine
<b>iNOS</b> :	NO synthase inductible
<b>KW</b> :	Kruskal Wallis
<b>LDL</b> :	Lipoprotéine de basse densité
<b>LPS</b> :	Lipopolysaccharides



**M1** : Macrophage classiquement activé/proinflammatoire  
**M2** : Macrophage alternativement activé/réparateur  
**NO** : Monoxyde d'azote  
**NOD** : Diabétique non obèse)  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**PBMCs** : Cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*)  
**PBS** : Tampon phosphate salin  
**PHA** : Phytohémagglutinine  
**PLN** : Noeud lymphatique du pancréas  
**PTH** : Parathormone  
**SVF** : Sérum de veau foetal  
**TG** : Triglycérides  
**TGFβ** : Facteur de croissance transformant  
**Th1** : Lymphocyte T helper de type 1  
**Th2** : Lymphocyte T helper de type 2  
**TNF** : Facteur de nécrose tumorale  
**Treg** : Cellule T régulatrice  
**UVB** : Ultra-Violet B  
**VDBP** : Protéine liant la vitamine D  
**VDR** : Récepteur vitamine D

## RESUME

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisé par la destruction des cellules  $\beta$  pancréatique et dont la conséquence est une hyperglycémie chronique.

Le but de cette présente étude était l'évaluation de l'activité de la vitamine D in vitro sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) chez les patients atteints de diabète type1(DT1).

Sachant que nous n'avons pas pu effectuer notre partie expérimentale pour des raisons de pandémie COVID19, notre étude a été réorientée vers une analyse d'articles des méthodes d'études in vivo de l'effet de la vitamine D. Nous avons par la suite simulé les résultats des dosages biochimiques que nous pourrions obtenir si l'expérimentation a été réalisée.

Généralement, la stimulation in vitro de la vitamine D est accompagnée de la mesure des niveaux des cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4 et IL-10, ainsi que les niveaux d'oxyde nitrique (NO) des surnageants des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs).

Les résultats de cette stimulation montrent des niveaux de la cytokine IFN- $\gamma$  et d'oxyde nitrique (NO) élevés, par contre des faibles niveaux des cytokines IL-4 et IL-10, dans les PBMC des patients diabétiques de type 1 par rapport aux témoins. En effet, les niveaux de la cytokine IFN- $\gamma$  et d'oxyde nitrique (NO) diminuent significativement, tandis que les niveaux des cytokines IL-4 et IL-10 augmentent significativement dans les PBMCs des diabétiques de type 1 suite au traitement avec la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ .

Ces études montrent que l'effet inhibiteur de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$  sur la production de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines du type Th1 et le marqueur des macrophages M1, d'une part, et sa capacité immunomodulatrice, ayant pour effet de favoriser la synthèse des cytokines anti-inflammatoires de type Th2/Treg et l'amélioration des macrophages alternatives M2, d'autre part.

**Mots-clés:** Vitamine D $_3$ , cytokines inflammatoires, oxyde nitrique ,PBMCs, diabète de type1.

## ABSTRACT

Type 1 diabetes is an autoimmune disease characterized by the destruction of pancreatic  $\beta$  cells resulting in chronic hyperglycemia.

The purpose of this study was to assess the activity of vitamin D in vitro in peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) in patients with type 1 (TD1) diabetes.

Knowing that we could not carry out our experimental part for reasons of the COVID19 pandemic, our study was redirected towards an analysis of articles of the methods of in vivo studies of the effect of vitamin D. We have by the following simulated the results of biochemical assays that we could obtain if the experiment was carried out.

Usually, in vitro stimulation of vitamin D is accompanied by measurement of the levels of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10, as well as the levels of nitric oxide (NO) of the supernatants of the peripheral blood mononuclear cells. (PBMCs).

The results of this stimulation show elevated levels of cytokine IFN- $\gamma$  and nitric oxide (NO), in contrast to low levels of cytokines IL-4 and IL-10, in PBMCs of patients with type 1 diabetes compared to witnesses. Indeed, the levels of the cytokine IFN- $\gamma$  and nitric oxide (NO) decrease significantly, while the levels of cytokines IL-4 and IL-10 increase significantly in the PBMCs of type 1 diabetics following treatment with 1.25 (OH) 2D3.

These studies show that the inhibitory effect of 1,25 (OH) 2D3 on the production of inflammatory mediators such as Th1 type cytokines and the M1 macrophage marker, on the one hand, and its immunomodulatory capacity, having the effect of to promote the synthesis of anti-inflammatory cytokines of the Th2 / Treg type and the improvement of alternative M2 macrophages, on the other hand.

**Keywords:** Vitamin D3, inflammatory cytokines, nitric oxide ,PBMCs, type 1 diabetes.

## ملخص

داء السكري من النوع الأول هو مرض من أمراض المناعة الذاتية يتميز بتدمير خلايا البنكرياس ونتيجة لذلك ارتفاع السكر المزمن في الدم.

كان الهدف من هذه الدراسة الحالية هو تقييم نشاط فيتامين (د) في المختبر على الخلايا أحادية النواة في الدم المحيطي لمرضى السكري من النوع الأول.

مع العلم أننا لم نتمكن من إجراء الجزء التجريبي لنا بسبب أسباب وبائية نتيجة انتشار وباء كوفيد-19، تم إعادة توجيه دراستنا نحو تحليل مقالات طرق الدراسات لتأثير فيتامين د في الجسم الحي. ثم قمنا بمحاكاة نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية التي يمكننا الحصول عليها إذا تم إجراء التجربة.

عادة، تحفيز فيتامين د في المختبر يكون مصحوبًا بقياس مستويات السيتوكينات الأنترفيرون غاما، الأنترلوكين 4 والأنترلوكين 10 وكذلك مستويات أكسيد النيتريك من السائل الطافي للخلايا أحادية النواة في الدم المحيطي.

تظهر نتائج هذا التحفيز مستويات مرتفعة من السيتوكين أنترفيرون غاما وأكسيد النيتريك، على عكس المستويات المنخفضة من السيتوكينات الأنترلوكين 4 والأنترلوكين 10، في الخلايا أحادية النواة للدم المحيطي لمرضى السكري من النوع الأول مقارنة مع الشهود. في الواقع، تنخفض مستويات السيتوكين الأنترفيرون غاما وأكسيد النيتريك بشكل ملحوظ، بينما تزداد مستويات السيتوكينات الأنترلوكين 4 والأنترلوكين 10 بشكل ملحوظ في الخلايا أحادية النواة للدم المحيطي لمرضى السكري من النوع الأول بعد العلاج باستخدام الشكل النشط للفيتامين د.

تظهر هذه الدراسات، التأثير المثبط للشكل النشط للفيتامين د على إنتاج الوسائط الالتهابية مثل السيتوكينات من النوع Th1 وافرازات البلعميات M1 ، من ناحية ، وقدرتها على تعديل المناعة ، والتي لها تأثير لتعزيز تخليق السيتوكينات المضادة للالتهابات من نوع Th2 / Treg وتحسين البلعميات الضامة البديلة M2 ، من ناحية أخرى.

الكلمات المفتاحية: فيتامين د، السيتوكينات الالتهابية، أكسيد النيتريك، خلايا الدم المحيطي وحيدة النواة، السكري من النوع الأول.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>1<sup>ère</sup> partie : Études bibliographiques</b>	
1. Études bibliographiques	
<b>1.1. Diabète</b>	2
1.1.1. Épidémiologie de diabète type 1	2
1.1.2. Diabète de type 1	2
1.1.3. Histoire naturelle du diabète de type 1	2
1.1.4. Ethio-pathologie du diabète de type 1	3
1.1.5. Structure, biosynthèse et sécrétion de l'insuline	7
<b>1.2. La vitamine D</b>	8
1.2.1 Définition de vitamine D	8
1.2.2 La double origine de la vitamine D	9
1.2.3 Métabolisme de la vitamine D	10
1.2.4 Mécanismes d'actions et régulation de la vitamine D	11
1.2.5 Vitamine D et diabète de type 1	12
<b>2<sup>ème</sup> partie : Matériel et Méthodes</b>	
2. Matériel et méthodes	
<b>2.1. Matériel</b>	14
2.1.1 Matériel biologique	14
2.1.2 Matériel non biologique	14
<b>2.2. Méthodes de l'étude</b>	14
2.2.1 Séparation des cellules mononuclées circulantes du sang périphérique par Ficoll-Hypaque	15
2.2.2 Test de viabilité cellulaire par bleu de trypan	17
2.2.3 Préparation des cultures cellulaires	18
2.2.4 Dosage immuno-enzymatique des cytokines	18
2.2.5 Dosage de l'oxyde nitrique (NO)	19

## **3<sup>ème</sup> partie : Résultats et discussions**

3. Résultats et discussion	
<b>3.1. Résultats</b>	20
3.1.1 Dosage des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires	20
3.1.2 Dosage de l'oxyde nitrique (NO)	23
<b>3.2. Discussion</b>	24
3.2.1 Vitamine D et épidémiologie du diabète de type 1	24
3.2.2 Activité de la 1,25(OH)2D3 sur la production des cytokine	25
3.2.3 Activité de la 1,25(OH)2D3 sur la production d'oxyde nitrique (NO)	26
3.2.4 Mise au point du protocole	27
Conclusion	29
Références bibliographiques	
Annexe	

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune spécifique d'organe caractérisé par une carence absolue en insuline. Il est la conséquence d'une destruction progressive et sélective des cellules  $\beta$  pancréatiques (**Frère, 2011**).

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

La carence en vitamine D pourrait être un facteur environnemental important impliqué à la fois dans le développement et dans la pérennisation des maladies auto-immunes. L'une des stratégies préventives les plus efficaces des maladies auto-immunes, impliquant le DT1, est la modulation immunitaire. Dans ce contexte, une attention particulière a été récemment donnée à la vitamine D3 (**Schoindre et al., 2013**).

À côté de son rôle classique dans la régulation du métabolisme phosphocalcique, plusieurs études ont rapporté les effets de la vitamine D3 sur la croissance et la différenciation de plusieurs types cellulaires, avec des effets immunomodulateurs remarquables (**Nouari et al., 2016**), non seulement expriment le VDR, mais aussi la 1  $\alpha$ -hydroxylase (**Aranow, 2011**).

Dans ce cadre, notre travail visait essentiellement à évaluer l'effet de la vitamine D in vitro par l'estimation des taux des cytokines et d'oxide nitrique dans les surnageants des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) suite à un traitement avec la 1,25(OH)2D3 des patients diabétiques de type 1 comparés à des sujets non diabétiques (témoins).

Malheureusement, en raison de la situation pandémique COVID19, et sachant que nous pouvais pas faire de pratique. Nous nous sommes intéressés à une analyse d'articles des mises au point de l'effet de la vitamine D et des paramètres qui sont évalués suite à cet effet.

Pour pouvoir couvrir tous les aspects de notre thématique, ce travail a été structuré en trois parties :

- ✓ Après l'introduction, la 1<sup>ère</sup> partie présente les généralités sur notre thématique
- ✓ La 2<sup>ème</sup> partie présente la méthodologie de notre travail
- ✓ La 3<sup>ème</sup> partie porte sur l'analyse des résultats
- ✓ Et enfin les résultats sont récapitulés sous forme de conclusion



# Études bibliographiques

## 1.1. Diabète

Différentes formes de diabète sont distinguées : diabète de type 1, de type 2, gestationnel, essentiellement (**DAGORNE et RANGE, 2014**).

### 1.1.1. Épidémiologie de diabète type 1

La Fédération Internationale du Diabète **FID, (2019)** a estimé, à l'échelle mondiale, qu'en 2019, 463 millions d'individus, vivaient avec le diabète, et qu'en 2045 ce nombre passera à 700 millions selon la même source.

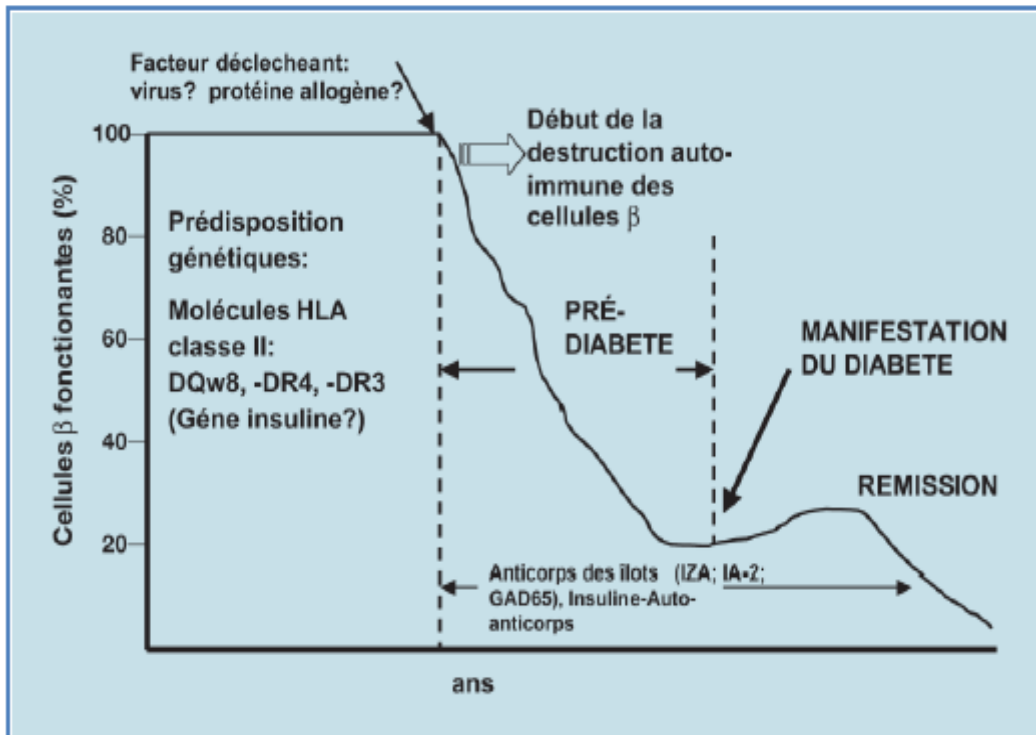
L'Algérie est à ce point impactée qu'elle figurait en 2016 dans le « Top 10 » des pays à très forte incidence de diabète de type 1, avec de 26 pour 100 000 enfants et adolescents âgés de moins de 20 ans et de 2900 nouveaux cas âgés de moins de 15 ans, selon l'Atlas 2017 du Diabète de la Fédération internationale du diabète (FID) (**Cho et al., 2018**).

### 1.1.2. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune se caractérisant par l'apparition d'autoanticorps qui prennent pour cible le pancréas endocrine, entraînant une destruction massive des cellules bêta ( $\beta$ ) des îlots de Langerhans, productrices d'insuline. La carence profonde en insuline ne peut alors être traitée que par insuline. Ce diabète apparaît brutalement et bruyamment, plus souvent chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte jeune. Environ 6 % des diabétiques sont de type 1 (**Frère, 2011**).

### 1.1.3. Histoire naturelle du diabète de type 1

Début avec la présence d'un terrain génétique favorisant (ATCD familiaux, groupage HLA). À ce stade, le processus conduisant à la maladie n'a pas encore débuté mais le risque de survenue du diabète est déjà présent. La seconde étape est caractérisée par le démarrage de la réaction auto-immune et la dégradation progressive de la capacité d'insulino-sécrétion. Cette phase est infra-clinique car la masse insulaire restante est capable de maintenir une glycémie normale. La troisième étape est marquée par l'hyperglycémie chronique et ses conséquences cliniques (Figure 1) (**Eisenbarth, 2002 ; Bouhours- Nouet et Coutant, 2005**).



**Figure 1 :** Phases successives du déroulement du diabète de type 1  
(SPINAS et LEHMANN, 2001)

#### 1.1.4. Ethio-pathologie du diabète de type 1

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

##### 1.1.4.1. Susceptibilité génétique

Une grande partie du risque génétique est associée au système MHC sur le bras court du chromosome 6 (région 6p21) (Concannon *et al.*, 2009). Les gènes HLA, y compris HLA-DQA1, HLA-DQB1, et HLA-DRB1, ont de nombreuses variations, et les individus ont une certaine combinaison de ces variations, appelé un haplotype. Certains haplotypes de HLA sont associés à un risque plus élevé de développer le diabète de type 1, avec des combinaisons particulières de variations génétiques HLA-DQA1, HLA-DQB1 et HLA-DRB1 entraînant le risque le plus élevé. Ces haplotypes semblent augmenter le risque d'une réponse immunitaire inappropriée aux cellules bêta (Pociot *et al.*, 2010).

### 1.1.4.2. Facteurs environnementaux

Comme possibles déclencheurs du processus auto-immune dirigé contre les cellules  $\beta$ , on postule avant tous des virus, en particulier les rétrovirus, le virus des oreillons, de la rubéole, de la cytomégalie, le virus EBV et surtout la Coxsachie B4 (**Spinass et Lehmann, 2001**).

D'autres facteurs ont été aussi envisagés et demeurent discutés comme l'introduction précoce du lait de vache, ou de gluten du blé, la consommation de produits riches en dérivés nitrés, une insuffisance d'apport en vitamine D, etc. Le rôle des stress semble enfin plus précipitant que causal (**Monnier, 2019**).

### 1.1.4.3. Facteurs immunologiques

En effet, l'insulite, considérée comme la caractéristique anatomique de la maladie, correspond à un infiltrat des îlots de Langerhans par des cellules mononucléées au sein du pancréas (**Dubois-Laforgue, 2007**).

Cet infiltrat cellulaire est principalement composé de cellules T CD8+, de macrophages, de lymphocytes T CD4+, de lymphocytes B, de cellules dendritiques et des plasmocytes (**Willcox et al., 2009**).

#### 1.1.4.3.1. Immunité innée

Des cellules de l'immunité innée participent essentiellement à l'initiation du processus auto-immun (**Aribi, 2011**). En effet, différents travaux ont mis l'accent sur l'implication des cellules de l'immunité innée dans le diabète de type 1, telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (**Lehuen et al., 2010**).

Les macrophages, sont essentiellement impliqués dans les mécanismes de l'inflammation (**Lawrence et al., 2005**). Mais aussi comme des cellules immun-régulatrices, qui induisent, suppriment et modulent les réponses immunitaires adaptatives (**Lehuen et al., 2010**).

Les macrophages M1, dont leur activation est définie comme une activation classique, sont induits principalement par les cytokines de type Th1, essentiellement l'IFN- $\gamma$ . Ils expriment l'enzyme oxyde nitrique synthase (iNOS), qui métabolise l'arginine en oxyde nitrique (NO) et en citrulline (**Lehuen et al., 2010**).

Les macrophages M2, dont l'activation est définie comme une activation alternative, sont induits par les cytokines de type Th2 et sont caractérisés par l'expression de l'enzyme arginase, qui

## Études bibliographiques

---

hydrolyse l'arginine en ornithine et urée. La voie de l'arginase limite la disponibilité de l'arginine pour la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) (**Rath *et al.*, 2014**).

Les macrophages M2 sont considérés comme des macrophages de réparation nécessaires au retour de l'homéostasie tissulaire, mais aussi comme des cellules anti-inflammatoires, des « extincteurs » de l'activation des macrophages M1 (**Mosser et Edwards, 2008**).

### 1.1.4.3.2. Immunité adaptative

L'absence d'une mise en place d'une tolérance centrale adéquate suite à un dysfonctionnement thymique vis à vis d'une population cellulaire  $\beta$  pancréatique, une rupture de tolérance périphérique, ainsi que des anomalies immunologiques sont les principales causes du déclenchement de diabétique de type 1 (**GEENEN *et al.*, 2000 ; Liston *et al.*, 2003**).

Ce sont essentiellement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui sont les agents effecteurs de la destruction des cellules  $\beta$  (**Di Lorenzo *et al.*, 2007**).

D'une part, les lymphocytes T helper autoréactifs de type 1 (Th1) produisent de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$ , ce qui induit l'activation des cellules immunitaires infiltrées, principalement les CTLs autoréactifs (CTL, *Cytotoxic T cell*), provoquant la destruction des cellules  $\beta$  suite à la sécrétion des cytokines proinflammatoires, des molécules cytotoxiques telles que les perforines et les granzymes (**Aribi, 2011**).

D'autre part, les cellules T CD8<sup>+</sup> jouent un rôle néfaste lors de l'initiation de la destruction des cellules  $\beta$  par leur action cytotoxique apoptotique via les perforines et les granzymes. En effet le développement du diabète de type 1 peut s'initier en présence des cellules T CD8<sup>+</sup> et en absence totale des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les souris NOD (**Graser *et al.*, 2000**).

Par ailleurs, les lymphocytes T helper de type 2 (Th2) inhibent le développement de la lignée Th1 suite à l'inhibition de la production de l'IL-12, essentiellement par l'IL-4 produit par les clones Th2 (**Mosser et Edwards, 2008**). Ainsi que les cellules régulatrices (Treg) immunosuppressives exercent des effets importants sur le maintien de l'homéostasie immunitaire et la tolérance immunitaire en produisant des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 (**Zhang *et al.*, 2014**).

Le diabète de type 1 se manifeste généralement quelques mois, voire quelques années, après le début de la destruction des îlots pancréatiques. Au cours de la période préclinique, des anticorps,

## Études bibliographiques

marqueurs de la réponse immunitaire humorale synthétisés par des plasmocytes, dirigés contre les antigènes des cellules  $\beta$  pancréatiques sont détectés, et sont considérés comme les meilleurs marqueurs prédictifs de la pathologie diabétique de type 1 (Côte-Real *et al.*, 2009).

Ces anticorps sont :

- ✓ Les anticorps anti-îlots (islet cell antibody: ICA)
- ✓ Les anticorps anti-GAD (glutamate acide décarboxylase). Ces anticorps sont dirigés contre une enzyme ubiquitaire mais qui est exprimée uniquement au niveau pancréatique.
- ✓ Les auto-anticorps anti-insuline (IAA), retrouvés surtout chez l'enfant
- ✓ L'anticorps anti-IA2 : c'est un anticorps dirigé contre une phosphatase membranaire des cellules (Knip et Siljander, 2008).

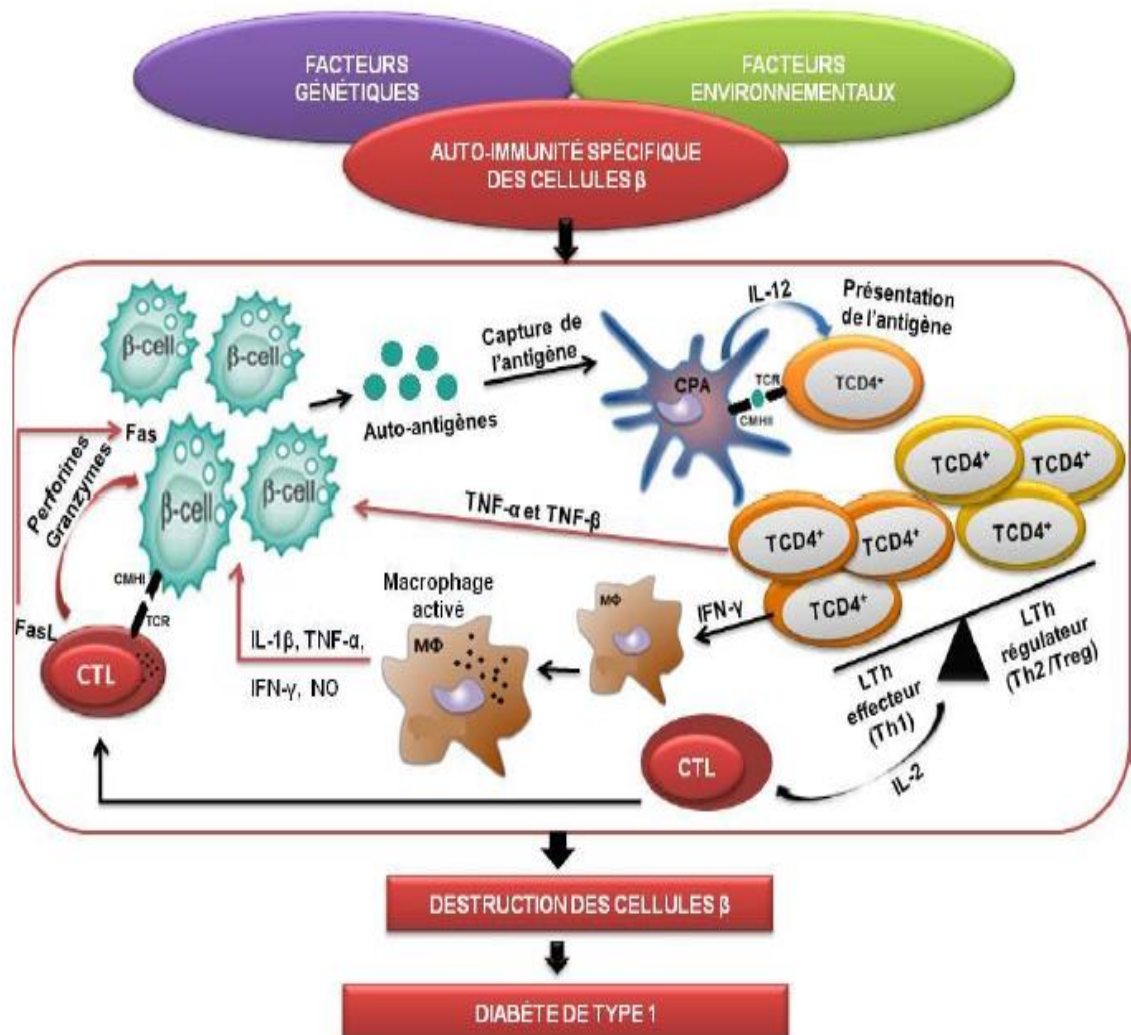
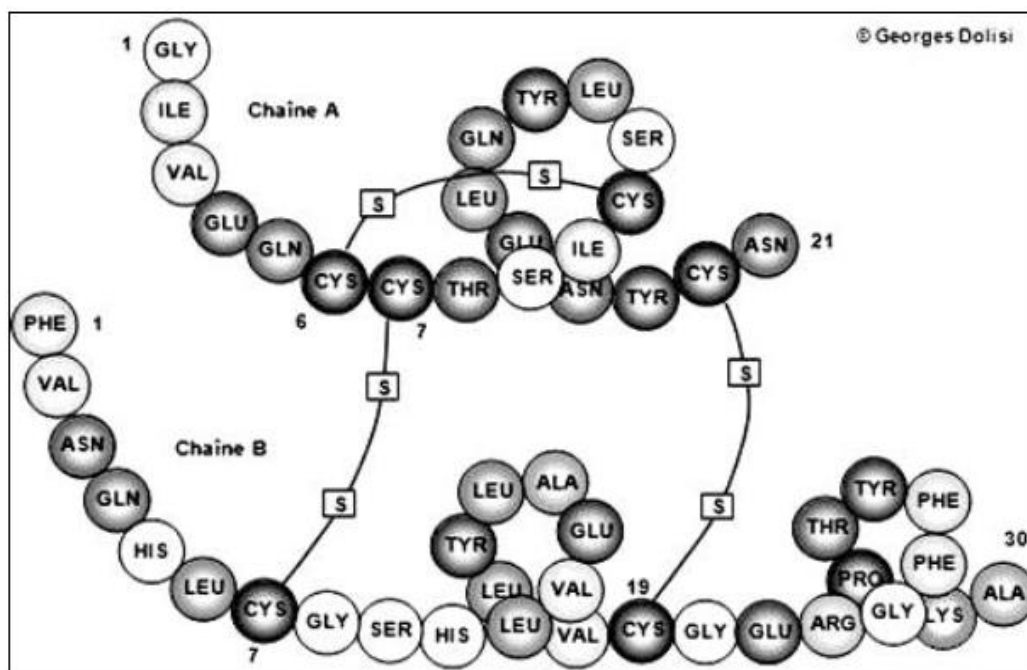


Figure 2 : Étiologie du diabète de type 1 (Yoon et Jun, 2005)

## 1.1.5. Structure, biosynthèse et sécrétion de l'insuline

### 1.1.5.1. Structure de l'insuline

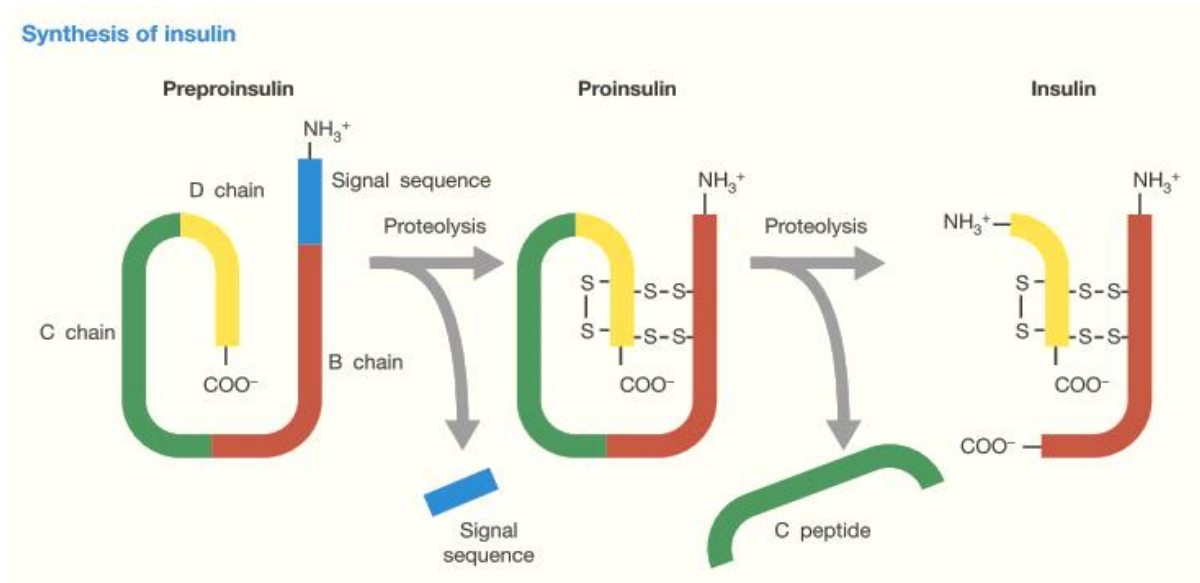
La molécule d'insuline est un polypeptide de taille modeste, d'un poids moléculaire de 6 kDa. C'est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne A et la chaîne B, reliées entre elles par deux ponts disulfures. Dans la plupart des espèces, espèce humaine comprise, la chaîne A comporte 21 acides aminés et la chaîne B en comporte 30. Un pont disulfure intracaténaire relie les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A (**Portha, 2007**).



**Figure 3 :** Schéma de la molécule d'insuline (**MALARDE, 2012**)

### 1.1.5.2. Biosynthèse de l'insuline

L'insuline est codée par un seul gène sur le bras court du chromosome 11, et est synthétisée et sécrétée en réponse à l'exposition des cellules  $\beta$  au glucose. Elle est d'abord synthétisée sous la forme d'une protéine pré-hormonale appelée pré-proinsuline dans le réticulum endoplasmique rugueux des cellules pancréatiques  $\beta$ . Des processus de clivage successifs se produisent alors pour produire d'abord de la proinsuline, avant d'être transporté à l'appareil Golgi où il est de nouveau clivé par protéases pour former l'insuline et le peptide C (**Cade et Hanison, 2017**).



**Figure 4 :** Représentation schématique de la synthèse d'insuline (Cade et Hanison, 2017)

### 1.1.5.3. Sécrétion de l'insuline

Le glucose est également le déterminant majeur de la sécrétion d'insuline. Son métabolisme permet la génération d'ATP, ce qui augmente le rapport ATP/ADP. En conséquence, un canal potassique se ferme, entraînant une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation déclenche l'ouverture des canaux calciques, ce qui permet l'entrée de calcium dans les cellules  $\beta$ , et finalement l'exocytose des granules de sécrétion (Duvillié, 2012).

## 1.2. La vitamine D

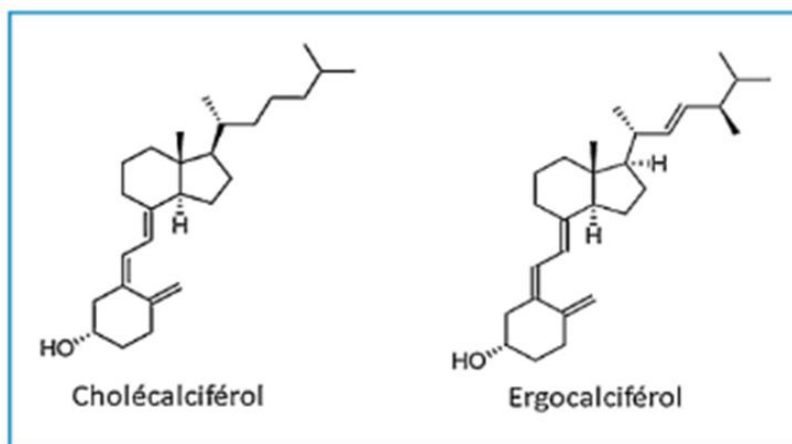
### 1.2.1. Définition de vitamine D

La vitamine D est une hormone liposoluble dont la biosynthèse commence au niveau cutané sous l'effet du rayonnement ultraviolet, et se termine au niveau rénal par l'hydroxylation en position 1, après plusieurs étapes successives (Bacchetta *et al.*, 2010).

La vitamine D ou calciférol existe sous deux formes :

La première est la vitamine D<sub>2</sub>, dérivant d'un stérol végétal nommé ergostérol d'où son nom d'ergocalciférol. Elle peut être apportée par les médicaments lors d'une supplémentation en vitamine D ; la deuxième forme est la vitamine D<sub>3</sub> ou cholécalciférol, synthétisée au niveau de la peau après irradiation solaire du 7-déhydrocholestérol ou apportée par voie orale (alimentation ou médicaments) (Delhoménie, 2011).





**Figure 5** : Structure des vitamines D2 et D3 (**Landrier, 2014**)

### 1.2.2. La double origine de la vitamine D

Contrairement aux autres vitamines qui sont exclusivement apportées par l'alimentation, la vitamine D présente une double origine : exogène, qui correspond à l'apport alimentaire mais aussi endogène, résultant d'une néosynthèse intervenant au niveau de l'épiderme (**Landrier, 2014**).

Seulement 10% de nos besoins quotidiens en vitamine D proviennent de l'alimentation. Celle-ci apporte de la vitamine D2 et de la vitamine D3 (**De Jaeger et Cherin, 2010**). Les aliments contenant de la vitamine D sont peu nombreux. La vitamine D est présente dans les huiles de foie de poissons, dans certains poissons gras (sardines, harengs, maquereaux), dans le jaune d'œuf et dans le foie de veau (tableau I)(**Briot et al., 2009**).

Produits	Ration quotidienne nécessaire pour couvrir les besoins
Huile de foie de morue	1,5 cuillère à café
Girolles	12 portions de 60 g
Hareng au vinaigre	2 portions de 60 g
Sardine à l'huile	20 sardines
Œuf dur	22 œufs moyens
Foie de veau	50 tranches de 100 g
Beurre	5 plaquettes de 250 g

**Tableau I** : Apports en vitamine D par les aliments (**Briot et al., 2009**)

### 1.2.3. Métabolisme de la vitamine D

Durant l'exposition solaire, et plus particulièrement aux ultraviolets B de longueur d'onde 290 à 315 nm, le 7 déhydrocholestérol dans la peau est transformé en prévitamine D3 immédiatement convertie en vitamine D3 (cholécalférol) par processus thermique.

Les vitamines D2 (ergocalciférol) et D3 (cholécalférol) amenées par l'alimentation sont absorbées par l'intestin, incorporées aux chylomicrons et transportées par le système lymphatique à la circulation. La vitamine D produite par la peau (D3) ou apportée par l'alimentation (D2 ou D3) est stockée et relarguée par le tissu adipeux.

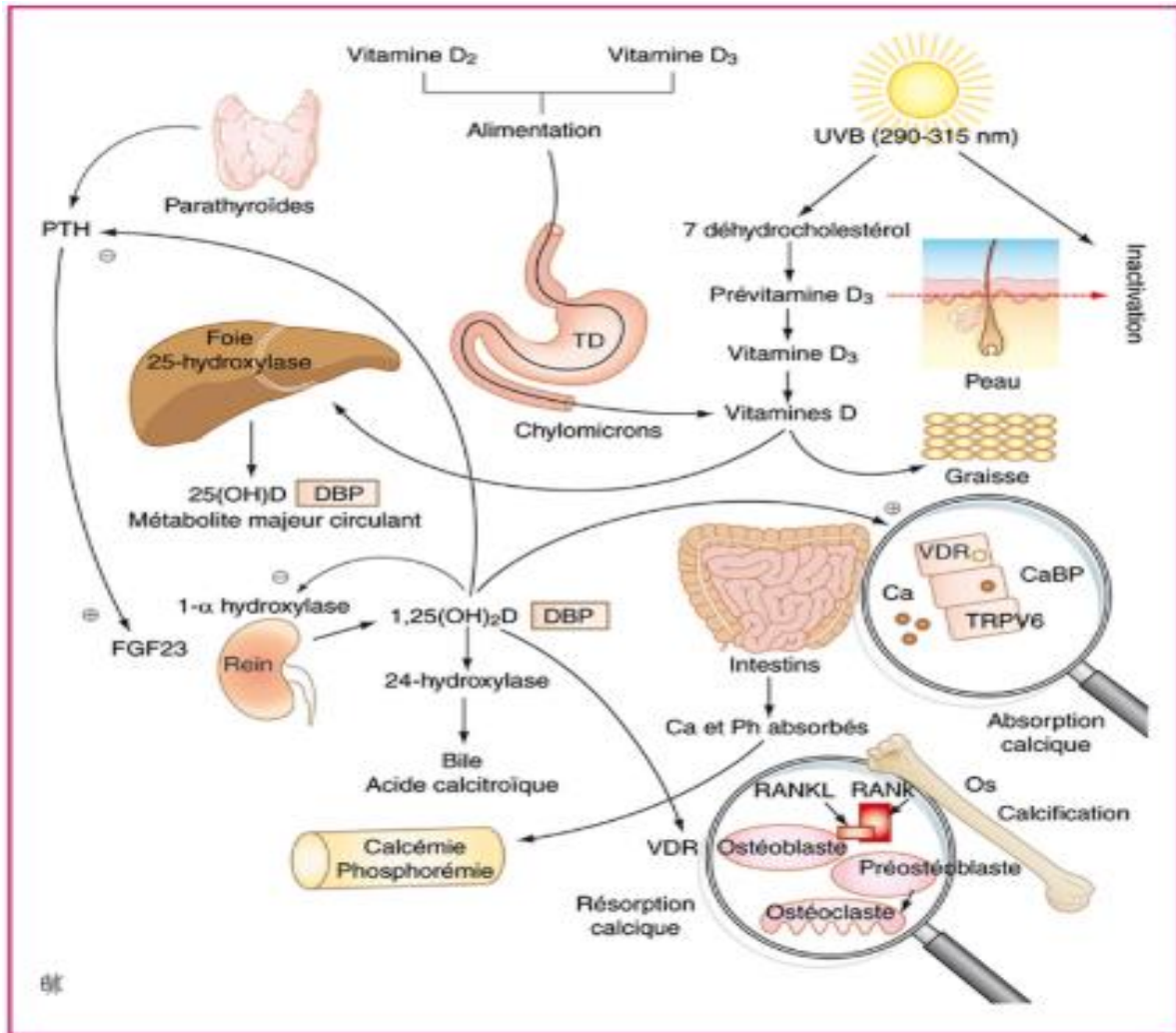
Cette vitamine D dans la circulation est liée à une protéine liant la vitamine D (VDBP), transportée au foie où elle est convertie en 25-hydroxyvitamine D3 [25(OH)D3] par une 25-hydroxylase (25-OHase) ; le métabolite correspond à la forme prépondérante de vitamine D3 circulante dosée.

Cependant, ce métabolite n'est pas actif et doit être converti par le rein en 1,25(OH)2D3, forme biologiquement active de la vitamine D3 par une 1  $\alpha$  hydroxylase (1  $\alpha$ -OHase) (**Mallet, 2014**).

Les 25 (OH)D3 et 1,25(OH)2D3 circulantes sont en grande partie liées à une protéine de transport, la protéine liant la vitamine D (VDBP). Après passage de la membrane cellulaire, la 1,25 (OH)2D3 sous sa forme libre, active, se lie dans le cytoplasme des cellules cibles à un récepteur spécifique, le récepteur de la 1,25(OH)2D3 (VDR). Après translocation dans le noyau, le VDR activé se lie à des sites de reconnaissance sur l'ADN et active la transcription de gènes cibles (**Edouard et al., 2018**).

Le métabolite actif de la vitamine D3, le 1,25(OH)2D3 présente à la fois des effets génomiques et non génomiques. Les effets génomiques sont bien connus et font intervenir un récepteur spécifique, le VDR appartenant à la super famille des récepteurs nucléaires qui active ou réprime l'expression des gènes cibles. Les effets non génomiques du calcitriol dépendent d'un récepteur membranaire, la protéine Pdia3 (disulfide isomerase family A member 3). Le rôle de ce récepteur a été bien décrit dans l'entérocyte, où il participe au captage rapide du calcium (**Landrier, 2014**).

Une fois le rôle du 1,25(OH)2D3 réalisé, il y a une induction de l'expression d'une 24 hydroxylase (24-OHase) qui le catabolise en un métabolite inactif, l'acide calcitroïque (**Mallet, 2014**).



**Figure 6 : Synthèse et métabolisme de la vitamine D (Mallet, 2014)**

### 1.2.4. Mécanismes d'actions et régulation de la vitamine D

Les principaux rôles de la vitamine D dans la régulation de la calcémie, de la phosphatémie et de l'homéostasie osseuse sont bien connus, comme cela est illustré dans la figure 7.

Au niveau intestinal, la vitamine D stimule l'absorption de calcium et de phosphore, permettant ainsi de maintenir un état de normocalcémie nécessaire pour une minéralisation osseuse adéquate.

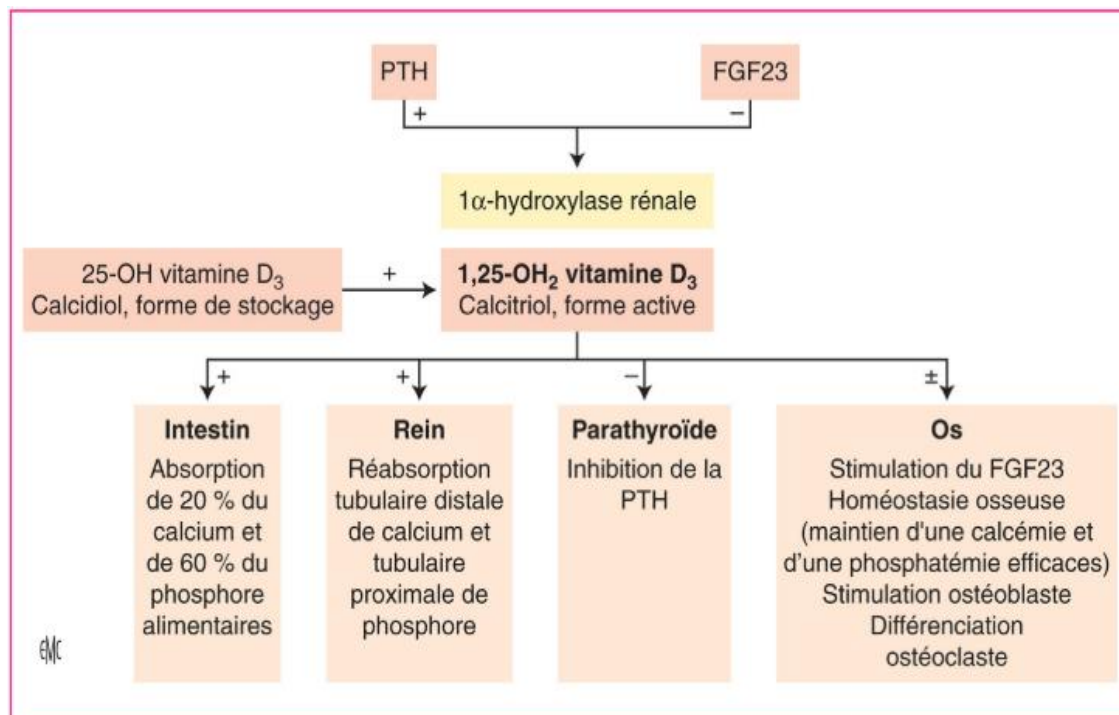
Au niveau rénal, la vitamine D stimule la réabsorption tubulaire de calcium. Elle inhibe également la synthèse de parathormone (PTH), hormone hypercalcémiant et phosphaturiant. À l'inverse, la parathormone (PTH) stimule l'expression de la 1 $\alpha$ -hydroxylase (1  $\alpha$ -OHase), pour stimuler la conversion de 25(OH)D3 en 1,25(OH)2D3.

C'est l'inverse avec le FGF23 (fibroblast growth factor 23), une hormone phosphaturiant, qui inhibe la synthèse de la 1 $\alpha$ -hydroxylase et stimule la synthèse de la 24-hydroxylase (les deux

## Études bibliographiques

mécanismes associés induisant donc une diminution de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> avec un rétrocontrôle positif de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sur la synthèse de FGF23 par l'ostéocyte.

Au niveau osseux, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> n'a pas d'effet direct sur la minéralisation, mais elle agit via le maintien d'une calcémie et d'une phosphatémie efficaces. Au niveau ostéoblastique, elle stimule la sécrétion de nombreuses protéines spécifiques (par exemple l'ostéocalcine, l'ostéoprotégérine et RANK-ligand (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), alors qu'au niveau ostéoclastique elle stimule la différenciation des précurseurs myélomonocytaires en lignées ostéoclastiques (**Bacchetta, 2019**).



**Figure 7** : Vitamine D et homéostasie phosphocalcique (**Bacchetta, 2019**)

### 1.2.5. Vitamine D et diabète de type 1

Le déficit en vitamine D<sub>3</sub> est un facteur de risque dans l'apparition des maladies auto-immunes ; une hypothèse qui semble être soutenue par la relation entre la vitamine D<sub>3</sub> et les lymphocytes, essentiellement par l'effet inhibiteur de la vitamine D<sub>3</sub> sur la production des cytokines de type Th1, et plutôt inducteur de celles des Th2/Treg (**Cantorna et Waddell, 2014 ; Peelen et al., 2011**).

Le récepteur nucléaire à la vitamine D (VDR) est exprimé par les cellules dendritiques et les monocytes-macrophages à l'état basal, et par les lymphocytes T et B essentiellement à l'état activé. Les macrophages et certaines cellules dendritiques possèdent l'équipement enzymatique nécessaire

## Études bibliographiques

---

aux deux étapes d'hydroxylation de la vitamine D native, alors que les lymphocytes T activés et les lymphocytes B n'expriment que la 1  $\alpha$ -hydroxylase. À la différence de l'enzyme rénale, la 1  $\alpha$ -hydroxylase exprimée par les cellules du système immunitaire n'est pas régulée par les paramètres du métabolisme phosphocalcique, mais par des stimuli immunologiques comme l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Le calcitriol ainsi produit agirait sur le système immunitaire de façon intracrine, autocrine ou paracrine (**Schoindre *et al.*, 2013**).

En effet, la 1,25 dihydroxyvitamine D3 agit directement sur les lymphocytes Th, essentiellement en diminuant leur activation et leur prolifération. Elle induit à la fois une inhibition de la production des cytokines proinflammatoires comme l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$ , cytokines effectrices des réponses Th1 (**Bouvard *et al.*, 2010**).

Elle induit également une augmentation des taux des cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, cytokines effectrices des réponses Th2, ainsi que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  qui sont considérées principalement comme des cytokines effectrices des réponses Treg (**Mathieu, 2011**).

Dans les macrophages, l'enzyme iNOS est inhibée par la 1,25 dihydroxyvitamine D3 entraînant une diminution du NO et un passage des macrophages M1 vers des macrophages M2 (**Bouvard *et al.*, 2010**).

# Matériel et méthodes

## 2. Matériel et Méthodes

Afin d'évaluer l'activité de la vitamine D in vitro sur les cellules du système immunitaire, et d'étudier sa relation avec le diabète de type 1. Nous nous sommes intéressées au dosage des cytokines et d'oxyde nitrique dans les surnageants des cellules mononuclées circulantes du sang périphérique (PBMCs).

Pour ce faire nous avons sollicité deux lieux de stage :

- Le service de diabétologie du CHU Mustapha Basha d'Alger pour recruter les diabétiques de type 1 et les témoins.
- Le laboratoire PFE de notre faculté pour le dosage des cytokines et d'oxyde nitrique (NO).

En raison de la pandémie COVID19, nous n'avons pas pu réaliser cette étude mais nous avons discuté les résultats des articles scientifiques similaires à notre problématique.

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué par le sang prélevé, par ponction veineuse à partir de la veine du pli du coude, des patients après 12 heures de jeûne. Ce sang est recueilli dans des tubes EDTA puis acheminés immédiatement au laboratoire à +4 pour l'isolement des PBMCs et le teste des surnageants de culture pour la production des cytokines et de NO.

#### 2.1.2. Matériel non biologique

- ❖ L'appareillage utilisé
- ❖ Les réactifs

### 2.2. Méthodes

#### ✓ Population de l'étude

Les sujets diabétiques de type 1 et témoins ont été recrutés au service diabétologie à l'hôpital de MUSTAPHA PACHA. Ainsi, nous avons inclus 10 patients diabétiques de type 1 (sous insuline ou ADO ou les deux) dont 5 patients sont sous traitements de la vitamine D et 5 patients ne sont pas sous traitement de la vitamine D, comparés avec 5 patients témoins non malades et qui ne sont pas sous traitement de la vitamine D.

## Matériel et méthodes

---

Un questionnaire a été proposé aux patients portant sur les informations personnelles, cliniques et les antécédents familiaux de ces derniers. (Annexe )

### ✓ Questionnaire (Annexe)

Une fiche de renseignement a été utilisée pour répertorier les renseignements concernant :

- L'âge et le sexe.
- Les paramètres cliniques et anthropométriques (antécédents familiaux, le tour de taille, tour de hanches, le poids corporel, taille) ;
- Paramètres hémodynamiques (pression artérielle systolique et diastolique) ;
- Les paramètres biologiques (glycémie, hémoglobine glyquée (HbA1c), cholestérolémie totale (CT), cholestérolémie HDL, triglycéridémie (TG), cholestérolémie LDL

### ✓ Prélèvement

Tous les prélèvements sanguins ont été réalisés après 12 heures de jeûne dans les mêmes conditions, au niveau du service de diabétologie à l'hôpital MUSTAPHA PACHA.

- 5 ml du sang a été prélevé sur des patients par une ponction veineuse au pli du coude avec une aiguille après avoir placé le garrot et désinfecté la surface cutanée avec une aiguille.
- Ensuite, ils ont recueilli dans des tubes EDTA, étiquetés et conservés à +4 °C.
- Puis, ils sont acheminés au laboratoire le même jour pour la séparation des cellules mononuclées circulantes du sang périphérique.

### 2.2.1. Préparation des cellules mononuclées circulantes du sang périphérique par Ficoll-Hypaque

#### Principe :

Selon Bøyum, (1984) les cellules mononucléaires (monocytes et lymphocytes) ont une densité inférieure à celle des érythrocytes et des granulocytes. Ainsi, après centrifugation des cellules sanguines chargées sur un fluide de séparation de densité appropriée (1,077 g/ml), les cellules mononucléaires qui restent au sommet sont facilement collectées.



## Matériel et méthodes

### Mode opératoire

Les protocoles de différentes étapes de la démarche expérimentale de l'isolement des PBMCs sont représentées dans le tableau suivant :

- ✓ Le protocole N°1 a été réalisé par **(Benkhelifa *et al.*, 2019)**
- ✓ Le protocole N°2 a été réalisé par **(Zamani *et al.*, 2017)**
- ✓ Le protocole N°3 a été réalisé par **(Ragab *et al.*, 2016)**
- ✓ Notre protocole est basé sur le protocole N°3

<b>Les étapes</b>	<b>Protocole N°1</b>	<b>Protocole N°2</b>	<b>Protocole N°3</b>	<b>Notre protocole</b>
<b>Prélèvement du sang veineux</b>	Tube Hépariné	Tube EDTA	Tube EDTA	Tube EDTA
<b>Dilution du sang total</b>	Avec (1 :1 V/V) d'une solution saline tamponnée phosphate (PBS) pH 7,4	Avec (1 :1 V/V) d'une solution saline tamponnée phosphate (PBS) pH 7,4	Avec (1 :1 V/V) d'une solution saline tamponnée phosphate (PBS) pH 7,4	5 ml du sang veineux est dilué avec 5 ml de solution tamponnée phosphate (PBS) pH 7,4
<b>Isolement par Ficoll-Hypaque (d = 1077 )</b>	Sang dilué est ajouté au Ficoll-Hypaque (d = 1077 )	Sang dilué est ajouté au Ficoll-Hypaque (d = 1077 )	Sang dilué est ajouté au Ficoll-Hypaque (d = 1077 )	10 ml du sang dilué est ajouté aux 5 ml de Ficoll-Hypaque (d = 1077 )
<b>Centrifugation</b>	Absence des données	Centrifugé à 1000 × g pendant 30 min	Centrifugé à 2400 tr/min pendant 20 min	Le mélange est centrifugé à 2400 tr/min pendant 20 min

## Matériel et méthodes

<b>Lavage</b>	Absence des données	2 fois avec solution saline tamponnée phosphate (PBS) pH 7,4	2 fois avec un milieu RPMI 1640	Les PBMCs sont lavées 2 fois avec un milieu RPMI 1640
<b>Suspension cellulaire</b>	Dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% de pénicilline	Absence des données	Dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS), 100 U/mL de pénicilline avec et 0.1 mg/ml de streptomycine	Les PBMCs sont suspendus dans un milieu RPMI- 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS), 100 U/mL de pénicilline avec et 0.1 mg/ml de streptomycine

### 2.2.2. Test de viabilité cellulaire par bleu de trypan

#### Principe :

Il est basé sur le principe que les cellules vivantes possèdent des membranes cellulaires intactes qui excluent certains colorants, tels que le bleu trypan, l'éosine ou le propidium, contrairement aux cellules mortes. Dans ce test, une suspension cellulaire est mélangée avec un colorant, puis examinée visuellement pour déterminer si les cellules absorbent ou excluent le colorant. (Strober, 2015)

#### Mode opératoire :

- ✓ Le pourcentage de la viabilité est calculé par la loi suivante :

$$\text{cellules viables (\%)} = \frac{\text{nombre total de cellules viables par ml d'aliquote}}{\text{nombre total de cellules par ml d'aliquote}} \times 100$$

- ✓ La viabilité a été >98 %.

### 2.2.3. Préparation des cultures cellulaires

- ✓ Les cellules mononuclées circulantes du sang périphérique obtenues sont cultivées à une concentration finale de  $10^6$  cellules / puit dans 200  $\mu$ L de milieu de culture dans une microplaque de culture à 96 puits en avec 10  $\mu$ g/ml de phytohémagglutinine (PHA) en présence ou en absence de 10 000 pmol/L de la 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ .
- ✓ Ensuite, les cellules sont incubées pendant 24 h en atmosphère humidifiée à 37°C et 5% CO $_2$ .
- ✓ La microplaque de culture est centrifugée après incubation à 2000 tr/min pendant 4 min afin de récolter les surnageants pour les dosages (**Ragab *et al.*, 2016**).

### 2.2.4. Dosage immuno-enzymatique des cytokines :

#### Principe :

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

#### Mode opératoire :

- ✓ Les standards et les surnageants de cultures ont été incubés sous agitation pendant 2 heures et demie avec des premiers anticorps (anti-cytokines) qui tapissent les puits d'une microplaque de microtitration à raison de 100  $\mu$ L pour chaque cytokine.
- ✓ Après plusieurs lavages, 100  $\mu$ L d'anticorps biotinylé ont été ajoutés à tous les puits.
- ✓ Suite à une heure d'incubation, 100  $\mu$ L de streptavidine couplée à la peroxydase ont été ajoutés aux différents puits.
- ✓ Une révélation de l'activité enzymatique a été réalisée après 45 minutes. Le tétraméthylbenzidine (TMB) a été utilisé comme le substrat de la réaction enzymatique à raison de 50  $\mu$ L par puits.
- ✓ Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, la réaction a été arrêtée avec une solution d'acide sulfurique (50  $\mu$ L).
- ✓ Enfin, l'intensité de la coloration apparue, proportionnelle à la quantité de cytokines présentes, a été immédiatement lue à 450 nm par un lecteur de microplaques ELISA.

### 2.2.5. Dosage de l'oxyde nitrique (NO)

#### Principe :

La production du NO au niveau des surnageants de culture des PBMCs, incubées pendant 24 heures, a été estimée en quantifiant l'accumulation son métabolite stable : nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), par une réaction colorimétrique en utilisant la technique de Griess modifiée (**Touil-Boukoffa *et al.*, 1998**)

#### Mode opératoire

- ✓ 50 µl d'échantillon ont été mélangés avec 25 µL de chaque réactif Griess (0,5% N-1-naphtyléthylène diamine et 5% sulfanilamide, préparés à la fois en 20% HCl) et 400 µL d'eau distillée.
- ✓ Le mélange était incubé à température ambiante pendant 20 min.
- ✓ L'absorbance a ensuite été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 543 nm.
- ✓ La concentration de nitrite, exprimée en µmoles / L (µM), était déterminé par extrapolation à partir de la courbe standard du sodium solution de nitrite (NaNO<sub>2</sub>, 0–128 µM).

# Résultats et discussion

### 3. Résultats et discussion

Rappelons que dans ce travail, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité de la vitamine D sur les PBMCs des patients diabétiques de type 1. Notre étude est portée sur 15 sujets dont 10 sujets diabétiques de type 1 (sous insuline ou ADO ou les deux), qui sont sous traitement de vitamine D et 5 sujets ne sont pas sous traitement de la vitamine D, comparés avec 5 sujets témoins non malades et qui ne sont pas sous traitement de la vitamine D .

Pour ce faire, nous allons explorer nos résultats par :

- Une étude descriptive des caractéristiques cliniques et épidémiologiques chez une population des diabétiques de type 1.
- Un dosage des cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4 et IL-10) et de l'oxyde nitrique (NO) dans les surnageants de culture des PBMCs en présence et en absence de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ .

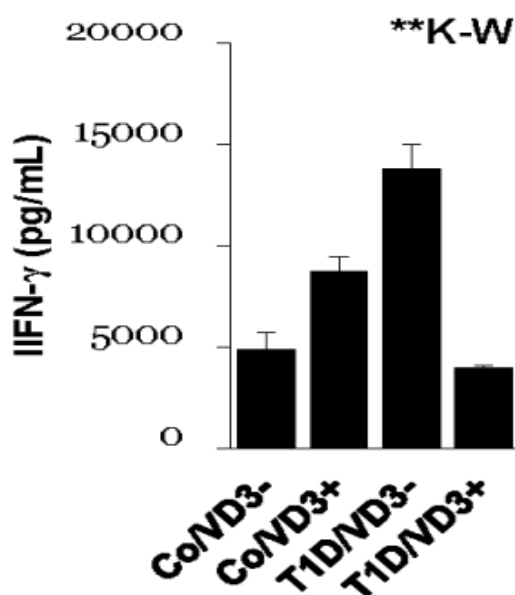
Suite au COVID19, on n'a pas pu réaliser notre étude. Donc on est basé sur les résultats des articles scientifiques similaires à notre thème pour discuter notre problématique.

**Ysmail-Dahlouk et ses collaborateurs., (2016)** ont examiné l'effet de la vitamine D sur la production des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ ) et anti-inflammatoires (IL-10 et IL-4) dans les cellules mononuclées du sang périphérique des patients diabétiques de type 1, ainsi que la production d'oxyde nitrique. Les cellules mononuclées du sang périphérique de 4 sujets diabétiques de type 1 et 4 sujets sains, ont été cultivées en présence ou en absence de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ . Ensuite un dosage des cytokines et d'oxyde nitrique ont été réalisé par des kits ELISA et méthode de Griess, respectivement. Les données ont été présentées sous forme de moyennes et erreur standard de la moyenne. (Annexe)

#### 3.1. Résultats

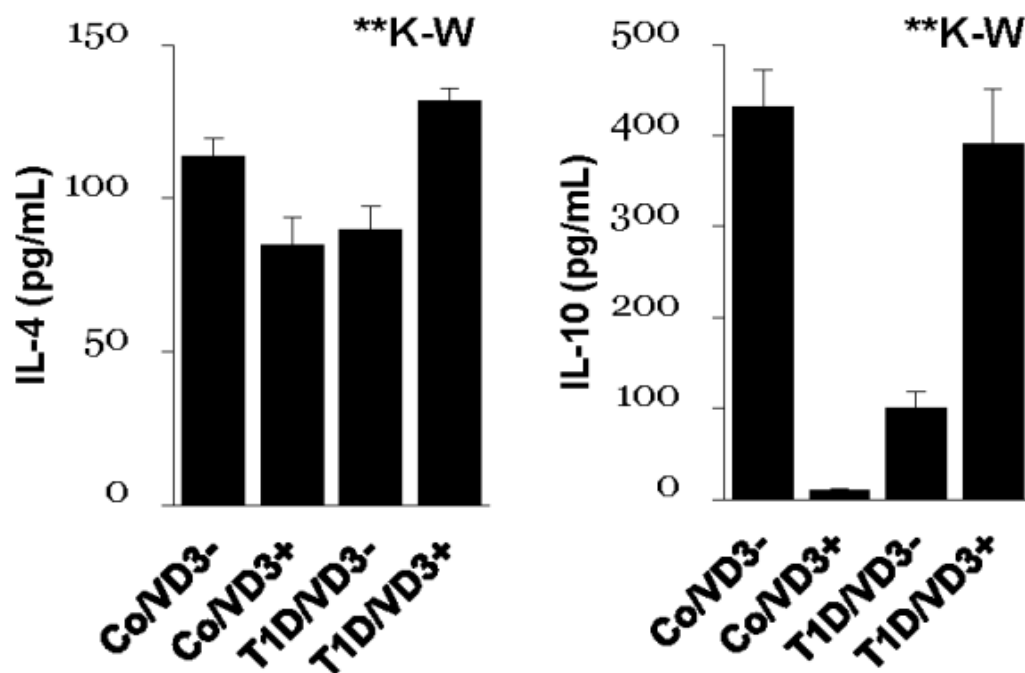
##### 3.1.1. Dosage des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires

La réponse des cellules mononuclées du sang périphérique in vitro a été estimée par le dosage de cytokine pro-inflammatoire (IFN- $\gamma$ ) et anti-inflammatoires (IL-10 et IL-4) chez les diabétiques type 1 et les témoins en présence et en absence de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , afin d'évaluer l'effet de cette vitamine D sur le système immunitaire des diabétiques de type 1. Les résultats obtenus par (**Ysmail-Dahlouk et al., 2016**) sont représentés par les figures 8 et 9.



**Figure 8 : Évaluation de cytokines pro inflammatoire (IFN  $\gamma$ ) chez les diabétiques type 1 et les témoins (Ysmail-Dahlouk *et al.*, 2016) . IL: interleukine, IFN: interféron, K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabètes de type 1, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)2D3, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)2D3, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)2D3; T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)2D3. \*\* $p < 0.01$  par le test de Kruskal-Wallis.**

La figure 8 représente les niveaux de cytokine pro-inflammatoire IFN- $\gamma$  chez les diabétiques de type 1 et les témoins. Ainsi nous remarquons que les taux d'IFN  $\gamma$  sont élevés significativement dans les PBMCs des patients diabétiques de type 1 par rapport aux témoins. 1,25(OH)2D3 induit une diminution très significative des taux d'IFN  $\gamma$  dans les PBMCs des diabétiques de type 1. Nous constatons que la comparaison de niveau de cytokine chez les diabétiques de type 1 en présence et en absence de 1,25(OH)2D3 par le test de Kruskal-Wallis, montre qu'il existe une différence significative ( $p < 0.008$  pour IFN  $\gamma$ ).



**Figure 9 : Évaluation des cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 chez les diabétiques type 1 et les témoins (Ysmail-Dahlouk *et al.*, 2016).** IL: interleukine, K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononucléées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, Co/VD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)2D3, Co/VD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)2D3, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)2D3; T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)2D3. \*\* $p < 0.01$  par le test de Kruskal-Wallis.

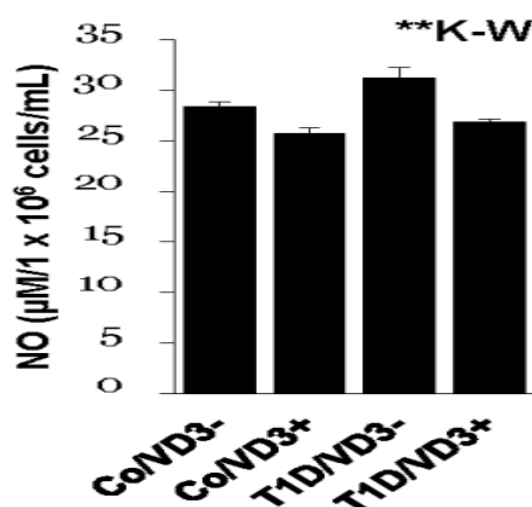
La figure 9 représente les niveaux des cytokines anti inflammatoires IL-10 et IL-4 chez les diabétiques type 1 et les témoins .Ainsi nous remarquons que les taux d'IL-10 et d'IL-4 sont diminués significativement dans les PBMCs des patients diabétiques de type 1 par rapport aux témoins .La 1,25(OH)2D3 induit une augmentation très significative des taux d'IL-10 et d'IL-4 dans les PBMCs des diabétiques de type 1 .Nous constatons que la comparaison des niveaux des cytokines chez les diabétiques de type 1 en présence et en absence de 1,25(OH)2D3 par le test de Kruskal-Wallis , montre qu'il existe une différence significative (  $p < 0.01$  pour IL-10 et  $p < 0.009$  pour IL-4 ).



## Résultats et discussion

### 3.1.2. Dosage de l'oxyde nitrique (NO)

Le dosage de l'oxyde nitrique dans les surnageants des cellules mononuclées du sang périphérique chez les diabétiques de type 1 et les témoins en absence et en présence de la 1,25(OH)2D3, a été réalisé afin d'évaluer l'activité de la vitamine D in vitro chez les diabétiques de type 1. Les résultats obtenus par (Ysmail-Dahlouk *et al.*, 2016) sont représentés par la figure 10.



**Figure 10 : Évaluation des niveaux d'oxyde nitrique NO chez les diabétiques type 1 et les témoins (Ysmail-Dahlouk *et al.*, 2016).** NO: monoxyde d'azote, K-W: test de Kruskal-Wallis, PBMCs: cellules mononuclées du sang périphérique, T1D: diabète de type 1, CoVD3-: PBMCs des sujets contrôles non traitées par la 1,25(OH)2D3, CoVD3+: PBMCs des sujets contrôles traitées par la 1,25(OH)2D3, T1D/VD3-: PBMCs des patients diabétiques de type 1 non traitées par la 1,25(OH)2D3; T1D/VD3+: PBMCs des patients diabétiques de type 1 traitées par la 1,25(OH)2D3. \*\* $p < 0.01$  par le test de Kruskal-Wallis.

la figure 10 représente les niveaux de l'oxyde nitrique chez les diabétiques de type 1 et les témoins. Ainsi nous remarquons que les niveaux de production de l'oxyde nitrique sont élevés significativement dans les PBMCs des patients diabétiques de type 1 par rapport aux témoins. La 1,25(OH)2D3 induit une diminution significative des niveaux de production d'oxyde nitrique dans les PBMCs des diabétiques de type 1. Nous constatons que la comparaison des niveaux de production d'oxyde nitrique chez les diabétiques de type 1 en présence et en absence de 1,25(OH)2D3 par le test de Kruskal-Wallis, montre qu'il existe une différence significative ( $p < 0.01$ )

### 3.2. Discussion

#### 3.2.1. Vitamine D et épidémiologie du diabète de type 1

La carence en vitamine D est un facteur de risque environnemental plausible pour les maladies auto-immunes. Des études épidémiologiques soit en fonction de la variété latitudinale ou saisonnière pourraient être impliquées dans la pathogenèse de diabète de type 1 avec un plus faible nombre de sujets atteints enregistrés dans les pays plus proches de l'équateur (**Peechakara et Pittas, 2008**).

Mais dernièrement ils ont montré que même les pays ensoleillés de l'Afrique ou l'Amérique de centre (les pays tropicaux ou subtropicaux), ils peuvent aussi développer ces carences en 25OHD, ce qui incrimine l'hyperpigmentation de ses peuples ou la mal nutrition ou les habilles couvrant souvent des vêtements couvrants. Une étude épidémiologique chez 60 Saoudiens diabétiques de type 1 et chez 60 sujets en bonne santé. L'âge moyen des patients était de  $25,9 \pm 16,1$ , ans et  $36,7 \pm 3,6$  ans chez les témoins. Une mesure de la 25OHD sérique a montré que les concentrations moyennes de 25OHD étaient significativement plus faibles chez les patients DT1 que chez les témoins  $28,1 \pm 1,4$  nmol / L versus  $33,4 \pm 1,6$  nmol / L (**Al-Daghri et al., 2014**).

Les études expérimentales de supplémentation en vitamine D randomisées n'ont pas encore précisé l'intérêt des apports en vitamine D optimaux pour la prévention du diabète de type 1, mais donnant quelque espoir. Une supplémentation importante, de 2 000 UI/j durant la première année de vie chez l'enfant, diminue la fréquence d'apparition du DT1 avant l'âge de 30 ans alors que les enfants ayant présenté hypovitaminose le risque de la survenue du DT1 est multiplié par trois (**Schlienger et al., 2010**).

Selon une étude de cohorte, ayant inclus 10 366 nouveau-nés finlandais nés en 1966, l'administration régulière de 2000 UI/j de vitamine D par jour au cours de la première année de vie était associée à une réduction du risque relatif d'apparition d'un diabète de type 1 avant l'âge de 33 ans de près de 90 % par rapport à l'absence de supplémentation (**Hyppönen et al., 2001**).

## Résultats et discussion

---

### 3.2.2. Activité de la 1,25(OH)2D3 sur la production des cytokine pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ ) et anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10)

D'après **Gepts, (1965)** qui a observait pour la première fois des infiltrats inflammatoires des cellules mononuclées du sang périphérique (insulite) envahissant les îlots de Langerhans dans le pancréas des patients diabétiques décédés de complications aiguës. La détection d'auto-anticorps dirigés contre les îlots de Langerhans est néanmoins assez faible et les vrais agents effecteurs de la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  sont les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (**Roep, 2003**).

Les résultats obtenus concordent avec les travaux de **Foss-Freitas *et al.*, (2007)** ont montré des taux élevés des cytokines de type Th1 (l'IFN- $\gamma$ ) dans les PBMCs des diabétiques de type 1 par rapport aux témoins.

Par ailleurs, nous avons observé des niveaux inférieurs des cytokines IL-4 et IL-10 dans les PBMCs des diabétiques de type 1 par rapport aux témoins, conformément rapportés par plusieurs auteurs montrant les faibles niveaux de production des cytokines de type Th2 (IL4), ainsi des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) chez les PBMCs des patients atteints du diabète de type 1 (**Karlsson Faresjo *et al.*, 2004**).

Le diabète type 1 résulte de la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  productrices d'insuline dans les îlots pancréatiques de Langerhans par les cellules T auxiliaires 1 (Th1) auto réactives caractérisées par leurs produits sécréteurs de cytokines, l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Les cytokines de type Th1 (IL-2 et IFN- $\gamma$ ) sont en corrélation avec le DT1, tandis que Th2 (IL-4 et IL-10), et les cytokines de type cellulaire T régulatrices (IL 10 et TGF $\beta$ ) sont en corrélation avec la protection contre le DT1 (**Rabinovitch et Suarez Pinzon, 2007**).

Suite au traitement des PBMCs par la vitamine D in vitro des patients diabétiques type 1, nous avons constaté que la 1,25(OH)2D3 inhibe la production de l'IFN- $\gamma$  et stimule celle de l'IL-4 et l'IL-10.

Les résultats corroborent avec les derniers travaux démontrant le rôle inhibiteur de la vitamine D sur la différenciation des cellules Th1(IFN- $\gamma$ ) tout en favorisant le développement de cellules Th2 (IL-4) (**Ardizzone *et al.*, 2009**), ainsi qu'elle favorise le passage d'un profil

## Résultats et discussion

---

cytokinique pro-inflammatoire (IFN- $\gamma$ ) caractérisé par Th1 vers un autre anti-inflammatoire (IL-10) caractérisé par le profil Treg (**Ragab et al., 2016**).

La littérature a souligné que l'ampleur de l'effet de la vitamine D est beaucoup plus large qu'on ne le sait déjà, comme le montre la distribution du VDR. Le rôle de la vitamine D va de la médiation uniquement de l'homéostasie du calcium au fonctionnement en tant qu'hormone pluripotente avec des effets cardiovasculaires, anticancéreux, immunomodulateurs et divers autres effets systémiques (**Norman, 2008**).

Des études in vitro ont montré que la vitamine D inhibe l'activité pro-inflammatoire des cellules CD4 + Th1 et leur production de cytokines telles que l'IL-2, l'interféron IFN  $\gamma$ . En plus de ses effets anti-inflammatoires, la vitamine D favorise également les réponses Th2 en augmentant la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10, faussant ainsi le compartiment des cellules T d'un état inflammatoire Th1 à un état Th2 anti-inflammatoire régulé (**Yang et al., 2013**).

Une étude faite sur des souris NOD traitées in vitro par 1,25 (OH) 2D3 des auto antigènes (GAD65). Cependant, les résultats sont hautement indicatifs d'un changement immunitaire d'un profil Th1 à un profil Th2, qui est limité à un sous-ensemble de lymphocytes T avec réactivité pour les auto-antigènes non seulement sur le site de l'attaque cellulaire (cellule  $\beta$  des ilots de Langerhans), mais également dans le système immunitaire périphérique (**Overbergh et al., 2000**).

### 3.2.3. Activité de la 1,25(OH)2D3 sur la production d'oxyde nitrique (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) génère par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) exprimée dans les macrophages activés depuis l'IFN- $\gamma$ , qui est la cytokine clé des cellules Th1 (**Bogdan et al., 2000**).

En tant que composant essentiel de l'immunité innée, les macrophages sont capables de se différencier. En réponse à divers signaux environnementaux (produits microbiens, cellules endommagées, lymphocytes activés) ou différentes conditions physiopathologiques en deux phénotypes fonctionnels opposés (**Biswas et Mantovani, 2010**).

## Résultats et discussion

---

Les macrophages inflammatoires M1 stimulés par des cytokines pro inflammatoires (IFN  $\gamma$ ), caractérisés par une production élevée d'oxyde nitrique (NO) (Verreck *et al.*, 2004). Ce phénotype favorise la réponse Th1 en libérant des cytokines pro-inflammatoires (IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL1, IL6), tandis qu'ils possèdent une forte activité microbicide et tumoricide (Sica et Mantovani, 2012).

Contrairement aux macrophages M2 sont de phénotype « au repos », peuvent également être amplifiées davantage par IL-4, IL-10 (Martinez *et al.*, 2009). Ce phénotype est favorisé par la réponse Th2 en libérant des cytokines anti inflammatoires (IL-10) (Raes *et al.*, 2005), ainsi qu'il est impliqué dans le remodelage tissulaire, la tolérance immunitaire et des fonctions immunorégulatrices (Mantovani *et al.*, 2011).

Bien qu'il n'y ait pas d'études sur la production de NO réalisées sur des PBMCs des patients atteints de diabète de type 1, les résultats obtenus soutiennent et complètent d'autres résultats suggérant des taux élevés de NO circulant chez les patients atteints de DT1.

Suite au traitement des cultures par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, connue pour avoir des effets anti-inflammatoires, nous avons montré que la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibe la production de NO au niveau des PBMCs des patients atteints de DT1 et des contrôles.

Les résultats obtenus corroborent avec une étude faite *in vitro* sur des macrophages des patients atteints de néphropathie diabétique. Ils ont observé une diminution d'activité de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) après traitement par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ainsi qu'un passage de phénotype M1 à M2 a été détecté (Zhang *et al.*, 2015).

### 3.2.4. Mise au point du protocole

L'étude des propriétés fonctionnelles des cellules immunitaires est d'une importance fondamentale pour comprendre les mécanismes physiologiques et physiopathologiques de la réponse immunitaire.

Le sang total et les cellules dérivées du sang isolé sont largement appliqués pour étudier la nature de la réponse immunitaire ou la capacité immunomodulatrice de diverses substances.

L'EDTA fonctionne comme anticoagulant en chélatant les ions métalliques; c'est le réactif de choix, car il préserve l'intégrité cellulaire, et est particulièrement recommandé pour obtenir des

## Résultats et discussion

---

rendements élevés en monocytes .Cependant, le sang conservé dans l'EDTA pendant plus de quelques heures produit des PBMCs contaminées par des globules rouges et des granulocytes (soit supérieure à 16 h )(Kumar et Satchidanandam, 2000) .C'est pourquoi ,on a isolé immédiatement les PBMCs après collecte du sang des patients dans des tubes EDTA .

L'utilisation d'EDTA comme anticoagulant dans les cultures du sang total ne sont pas recommandées car les ions calcium se sont avérés jouer un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes (Feske *et al.*, 2001).

Par ailleurs, dans des cultures des PBMCs isolées à partir de sang anticoagulé EDTA ont montré une capacité d'expression des cytokines plus élevée que les PBMCs à partir de sang hépariné (Duvigneau *et al.*, 2007).

Le sang héparinisé, provoque néanmoins une agrégation plaquettaire et modifie la morphologie des globules blancs, il est donc hautement probable que les molécules d'héparine résiduelles restent sur les cellules pendant la procédure d'isolement (Schonherr et Hausser, 2000).

Le tampon phosphate salin (PBS) est un soluté physiologique largement utilisé comme un diluant de par son isotonicité, sa non-toxicité, le maintien de la morphologie cellulaire et l'activité enzymatique mitochondriale. Ainsi, Il sert surtout à rincer les cellules pour enlever toute trace de milieu avant de les traiter sauf les usages sur les cellules maintenues de l'incubateur à CO<sub>2</sub> et à long terme (Costa *et al.*, 2001). Pour cela, on a dilué le sang total avec de PBS contrairement au lavage des PBMCs effectué avec un milieu RPMI 1640.

Le sang anticoagulé EDTA a été utilisé avec succès pendant plusieurs études portant sur les niveaux d'expression des cytokines par les lymphocytes T in vitro. De plus ils ont montré que la réponse des cytokines stimulés par la phytohémagglutinine (PHA) et significativement plus élevés que celle stimulés par le lipopolysaccharide LPS in vitro sur des PBMCs (Mayringer et Berger, 2000).

Le manque des étapes est l'une des raisons qui nous a conduit à baser sur le troisième protocole réalisé par (Ragab *et al.*, 2016).

# Conclusion

## Conclusion

Ces dernières années, la vitamine D a attiré une attention croissante dans différents domaines de recherche. L'expression omniprésente du récepteur de la vitamine D (VDR) peut sous-tendre les divers effets de la vitamine D et fournir une base mécaniste pour le lien entre une carence en vitamine D et un certain nombre de troubles des maladies auto-immunes, dont le diabète de type 1.

L'étude réalisée avait pour but d'évaluer l'effet de la forme bioactive de la vitamine D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) sur les cellules mononuclées du sang périphérique chez les diabétiques de type 1.

À partir des résultats, nous avons conclu :

✓ L'activité inhibitrice de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sur la production de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines de type Th1, d'une part, et sa capacité immunomodulatrice, ayant pour effet de favoriser la synthèse des cytokines anti-inflammatoires de type Th2/Treg, d'autre part.

✓ L'activité inhibitrice de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sur la production d'oxide nitrique (NO) par les macrophages d'où elle favorise un passage vers les macrophages anti-inflammatoires, alternatives M2.

Au regard de ces résultats, il nous serait tout-à-fait possible de suggérer que la forme bioactive de la vitamine D<sub>3</sub> peut avoir un effet protecteur sur les cellules β pancréatiques au début du processus auto-immun.



# Références bibliographiques

## Références bibliographiques :

### A

- **Al-Daghri M.S., Al-Attas S.M., Alokail S.M., Alkharfy M.K., Yakout M.S., Aljohani J.N., Al Fawaz H., Al-Ajlan S.A., Sheshah S.E., Al-Yousef M., Alharbi M., 2014.**« Lower vitamin D status is more common among Saudi adults with diabetes mellitus type 1 than in non-diabetics », *BMC Public Health*. BioMed Central, 14(1), p. 153.
- **Aranow C.,2011.**« Vitamin D and the immune system », in *Journal of Investigative Medicine*. BMJ Publishing Group, p. 881-886.
- **ARDIZZONE S., CASSINOTTI A., TRABATTONP D., MANZIONNA G., RAINONE V., BEVILACQUAI M., MASSARI A., MANES G., MACONI G., CLERICP M., BIANCHI P.,2009.**« Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on TH1/TH2 cytokines in inflammatory bowel disease: an in vitro study. », *International journal of immunopathology and pharmacology*. Biolife s.a.s., 22(1), p. 63-71.
- **Aribi M.,2011.**« Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy ». IntechOpen.

### B

- **Bacchetta J., Ranchin B., Dubourg L., Cochat P.,2010.**« Vitamine D : un acteur majeur en santé? », *Archives de Pédiatrie*. Elsevier Masson, p. 1687-1695.
- **Bacchetta J., 2019.**« Vitamine D en pédiatrie □ », *Journal de pédiatrie et de puericulture*. Elsevier Masson SAS, 32(6), p. 310-321.
- **Benkhelifa S.R., Belhadef H., Ait-kaci S., Medjeber H., Belkhelfa O., Hetit M., Ait-Younes S., De launoit S., Moralès Y, Mahfouf O., Delhem H., Touil-Boukoffa C., 2019.**« Aberrant up-regulation of iNOS/NO system is correlated with an increased abundance of Foxp3+ cells and reduced effector/memory cell markers expression during colorectal cancer: immunomodulatory effects of cetuximab combined with chemotherapy », *Inflammopharmacology*. Birkhauser Verlag AG, 27(4), p. 685-700.

- **Biswas S. K., et Mantovani A., 2010.** « Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm », *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, p. 889-896.
- **Bogdan C., Rölinghoff M., Diefenbach A., 2000.** « The role of nitric oxide in innate immunity », *Immunological Reviews*, p. 17-26.
- **BOUHOURS-NOUET N., COUTANT R., 2005.** clinique et diagnostique du diabète de l'enfant. Elsevier Masson SAS, Paris, 4-059-K-10:1-16.
- **Bouvard, B., Annveiller C., Sallé A., Beauchet O., Chappard D., Audran M., Legrand E., 2010.** « Les effets extra-osseux de la vitamine D: Faits, questions et controverses », *Revue du Rhumatisme (Edition Française)*, 77(SUPPL. 3), p. 18-25.
- **Bøyum A., 1984.** « Separation of Lymphocytes, Granulocytes, and Monocytes from Human Blood Using Iodinated Density Gradient Media », *Methods in Enzymology*, 108(C), p. 88-102.
- **Briot K., Audran M., Cortet B., Fardellone P., Marcelli C., Orcel P., Vellas B., Thomas T., Roux C., 2009.** « Vitamine D : effet osseux et extra-osseux ; recommandations de bon usage », *Presse Medicale*, p. 43-54.

## C

- **Cade J., et Hanison J., 2017.** « The pancreas », *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. Elsevier Ltd, p. 527-531.
- **Cantorna M. T. et Waddell A., (2014).** « The vitamin D receptor turns off chronically activated T cells », *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., 1317(1), p. 70-75.
- **Cho N. H., Shaw J. E., Karuranga S., Huang Y., Rocha Fernandes J. D., Ohlrogge A. W., Malanda B., 2018.** « IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 », *Diabetes Research and Clinical Practice*. Elsevier Ireland Ltd, 138, p. 271-281.
- **Concannon P., Rich S.S., Nepom G. T., 2009.** « Genetics of Type 1A Diabetes », *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 360(16), p. 1646-1654.
- **Côrte-Real J., Duarte N., Tavares L., Penha-Gonçalves C., 2009.** Autoimmunity triggers in

the NOD mouse: a role for natural auto-antibody reactivities in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.*1173:442-8.)

- **Costa C.A., Edwards C.A., Hanks C.T.,2011.** Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent.*;14(1):25-30)

## D

- **DAGORNE R.,et RANGE M., 2014.**« Diabète et maladies parodontales Spécial parodontologie Dagorne C., Rangé H », *AOS*, 267, p. 27-34.
- **Delhoménié M., 2011.** « La vitamine D », *Pratique en nutrition*, 25, p. 44-47.
- **Dubois-Laforgue D., 2007.** Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1. *Endocrinologie-Nutrition.* 10-366-C-10)
- **Duvigneau J. C., Sipos W., Hartl R. T., Bayer M., Moldzio R., Stevenson L., Adair B., Gemeiner M., 2007.**« Heparin and EDTA as anticoagulant differentially affect cytokine mRNA level of cultured porcine blood cells », *Journal of Immunological Methods.* *J Immunol Methods*, 324(1-2), p. 38-47.
- **Duvillié B., 2012.**« Implications des anomalies de la sécrétion d'insuline dans le diabète de type 2 », *edimark.fr*, 16(10-1).

## E

- **Edouard T., Linglart A., Salles J. P., 2018.**« Vitamine D et rachitisme : débats, consensus et utilisation pratique », *Perfectionnement en Pédiatrie.* Elsevier BV, 1(1), p. 40-47.

## F

- **Feske S., Giltzane J., Dolmetsch R., Staudt L. M., Rao A.,2001.**« Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes », *Nature Immunology.* Nature Publishing Group, 2(4), p. 316-324.
- Fédération internationale de diabétique (FID),2019. Atlas 9th edn.Brussels,Belgium
- **Foss-Freitas M. C., Cardili R., Foss N T.,2007.** « Effect of metabolic control on interferon-gamma and interleukin-10 production by peripheral blood mononuclear cells from type 1 and type 2 diabetic patients », *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(5), p. 671-677.

- **Frère M., 2011.**« Diabète, physiopathologie et conséquences », *Kinesithérapie*. Elsevier Masson, 11(118), p. 24-28.

## G

- **Geenen V., Brilot F., Louis C., Hansenne I., Renard C., Martens H., 2005.** « Nouvelles données sur la pathogénie du diabète de type 1 », *Revue Medicale de Liege*, p. 291-296.
- **Geenen V., Kecha O., Brilot F., Martens H., Lefebvre P., Boniver J., Burny A., Vassart G., 2000.**« Le rôle du thymus dans la physiopathologie du diabète auto-immun de type 1. Discussion », *Bulletin et mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique*, 155(5-6).
- **Gepts W.,1965.** Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*, 14, 619-633
- **Graser R. T., Dilorenzo T.P., Wang F., Christianson G.J., Chapman H.D., Roopenian D.C., Nathenson S.G., Serreze D.V., 2000.**« Identification of a CD8 T Cell That Can Independently Mediate Autoimmune Diabetes Development in the Complete Absence of CD4 T Cell Helper Functions », *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 164(7), p. 3913-3918.

## H

- **Hyppönen E., Laara E., Reunanen A., Jarvelin M.R., Virtanen S.M., 2001.**« Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: A birth-cohort study », *Lancet*. Lancet Publishing Group, 358(9292), p. 1500-1503.
- **De Jaeger C., et Cherin P., 2010.**« Vitamine D: effets sur la santé Recommandations de bon usage », *Medecine et Longevite*, p. 182-199.

## K

- **Karlsson Faresjo M., Ernerudh J., Ludvigsson J., 2004.**« Cytokine Profile in Children During the First 3 Months after the Diagnosis of Type 1 Diabetes », *Scandinavian Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 59(5), p. 517-526.
- **Knip M., et Siljander H., 2008.**« Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes », *Autoimmunity Reviews*. Elsevier, p. 550-557.

- **Kumar P., et Satchidanandam V.,2000.**« Ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)tetraacetate as a blood anticoagulant: Preservation of antigen-presenting cell function and antigen- specific proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from stored blood », *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Clin Diagn Lab Immunol, 7(4), p. 578-583.

## L

- **Landrier J. F., 2014.**« Vitamine D: sources, métabolisme et mécanismes d'action », *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*. Elsevier Masson SAS, 49(6), p. 245-251.
- **Lawrence T., Bebien M., Liu G., Nizet V., Karin M.,2005.** « IKK $\alpha$  limits macrophage NF- $\kappa$ B activation and contributes to the resolution of inflammation », *Nature*. Nature Publishing Group, 434(7037), p. 1138-1143.
- **Lehuen A., Diana J., Zaccone P., Cooke A., 2010.**« Immune cell crosstalk in type 1 diabetes », *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, p. 501-513.
- **Liston A., Lesage S., Wilson J., Peltonen L.,Goodnow C.C., 2003.**« Aire regulates negative selection of organ-specific T cells », *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 4(4), p. 350-354.
- **Di Lorenzo T. P., Peakman M., Roep B. O., 2007.**« Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes », *Clinical and Experimental Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, p. 1-16.

## M

- **MALARDE L., 2012.** Activité physique et produits dérivés du soja : intérêts dans la prise en charge du stress oxydant associé au diabète de type 1, Thèse de doctorat. Ecole doctorale Sciences Humaines, Bretagne., PP 1- 211.
- **Mallet E., 2014.**« Vitamine D », *Journal de Pédiatrie et de Puericulture*. Elsevier Masson, 27(1), p. 29-38.
- **Mantovani A., Germano G., Marchesi F., Locatelli M., Biswas S.K., 2011** .« Cancer-promoting tumor-associated macrophages: New vistas and open questions », *European*

*Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, p. 2522-2525.

- **Martinez F. O., Helming L., Gordon S., 2009.** « Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective », *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews , 27(1), p. 451-483.
- **Mathieu C., 2011.** « Vitamin D and the Immune System: Getting It Right », *IBMS BoneKEy*, 8(4), p. 178-186.
- **Mayringer I., Reindl, M., Berger, T., 2000.** « A critical comparison of frequently used methods for the analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by human immune cells », *Journal of Immunological Methods*. Elsevier, 235(1-2), p. 33-40.
- **Monnier L., 2019.** « Chapitre 2 - Physiopathologie des états diabétiques », in Monnier, Louis (éd.) *Diabetologie (Troisième Édition)*. Troisième. Paris: Content Repository Only!, p. 13-35.
- **Mosser D. M., Edwards J. P., 2008.** « Exploring the full spectrum of macrophage activation », *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, p. 958-969.

## N

- **Norman A. W., 2008.** « From vitamin D to hormone D: Fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health », *American Journal of Clinical Nutrition*. American Society for Nutrition, p. 491-499.
- **Nouari W., Ysmail-Dahlouk L., Aribi M., 2016.** « Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa* », *International Immunopharmacology*. Elsevier, 30, p. 94-101.

## O

- **Overbergh L., Decallone M., Waer M., Rutgeerts O., Valckx D., Casteels K.M., Laureys J., Bouillon R., Mathieu C., 2000.** «  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543) », *Diabetes*. American Diabetes Association Inc., 49(8), p. 1301-1307.

## P

- **Peechakara S. V., et Pittas A. G., 2008.**« Vitamin D as a potential modifier of diabetes risk », *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*. Nature Publishing Group, p. 182-183.
- **Peelen E., Knippenberg S., Muris A.H., Thewissen H., Smolders J., Tervaert J.C., Hypperts R., Damoiseaux J., 2011.** « Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: A review », *Autoimmunity Reviews*. Elsevier, p. 733-743.
- **Pociot F. Akolkar P., Concannon P., Erlich H.A., Julier C., Morahan G., Nierras C.R., Todd J.A., Rich S.S., Nerup J., 2010.** « Genetics of type 1 diabetes: What's next? », *Diabetes*, p. 1561-1571.
- **Portha B., 2007.**« Insuline: de la production au mode action », in *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Paris: Springer Paris, p. 161-181.

## R

- **Rabinovitch A., et Suarez Pinzon W. L., 2007.** « Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes », *Cell Biochemistry and Biophysics*, 48(2-3), p. 159-163.
- **Raes G., Van den R., Baetselier P., Ghassabeh G., 2005.** « Arginase-1 and Ym1 Are Markers for Murine, but Not Human, Alternatively Activated Myeloid Cells », *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 174(11), p. 6561-6562.
- **Ragab D., Soliman D., Samaha D., Yassin A., 2016.**« Vitamin D status and its modulatory effect on interferon gamma and interleukin-10 production by peripheral blood mononuclear cells in culture », *Cytokine*. Elsevier Ltd, 85, p. 5-10.
- **Rath M., Muller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M., 2014.**« Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages », *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 532.
- **Roep B. O., 2003.**« The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure », *Diabetologia*. Springer Verlag, p. 305-321.

## S

- **Schlienger J. L., Luca F., Griffon C., 2010.**« Déficit en vitamine D et risque de diabète »,



*Medecine des Maladies Metaboliques*. Elsevier Masson SAS, p. 558-562.

- **Schoindre Y., Benveniste O., Costedoat-Chalumeau N., 2013.**« Vitamine D et auto-immunité », *La Presse Médicale*, 42(10), p. 1358-1363.
- **Schonherr E., et Hausser H. J., 2000.** « Extracellular matrix and cytokines: A functional unit », *Developmental Immunology*, 7(2-4), p. 89-101.
- **Sica A., et Mantovani A., 2012.**« Plasticity and Polarization », *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 122(3), p. 787-795.
- **Spinas G. A., et Lehmann R., 2001.** *Diagnostic et classification du diabète sucré Diabète sucré: Diagnostic, classification et pathogenèse, medicalforum.ch.*
- **Strober W., 2015.** « Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability », *Current Protocols in Immunology*. Blackwell Publishing Inc., 111(1), p. A3.B.1-A3.B.3.

## T

- **Touil-Boukoffa C., Bauvois B., Sancéau J., Hamrioui B., Wietzerbin J., 1998.**« Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: Relationship between nitrite production and interferon- $\gamma$  levels », *Biochimie*. Elsevier Masson SAS, 80(8-9), p. 739-744.

## V

- **Verreck F. A., Be Boer T., Langenberg D., Hoeve M.A., Kramer M., Vaisberg E., Kastelein R., Kolk A., De Waal-Malefyt R., Ottenhoff., 2004**« Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 101(13), p. 4560-4565.

## W

- **Willcox A., Richardson S., Bone A., Foulis A., Morgan N., 2009.**« Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes », *Clinical and Experimental Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 155(2), p. 173-181.

## Y

- **Yang C. Y., Leung p., Adamopoulos I., Gershwin M.,2013.**« The implication of vitamin D and autoimmunity: A comprehensive review », *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, p. 217-226.
- **Yoon J.-W., et Jun H.-S.,2005.**« Autoimmune Destruction of Pancreatic ?? Cells », *American Journal of Therapeutics*, 12(6), p. 580-591.
- **Ysmail-Dahlouk L., Nouari W.,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 », *Immunology Letters*. Elsevier B.V., 179, p. 122-130.

## **Z**

- **Zamani A., Salehi I., Alahgholi-hajibehzad M.,2017.** « Moderate Exercise Enhances the Production of Interferon- $\gamma$  and Interleukin-12 in Peripheral Blood Mononuclear Cells », p. 186-191.
- **Zhang C., Xiao C., Wan P., 2014.** « The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy », *Human Immunology*. Elsevier Inc., 75(4), p. 289-296.
- **Zhang X., Zhou M., Guo Y., Song Z., 2015.**« Dihydroxyvitamin D 3 Promotes High Glucose-Induced M1 Macrophage Switching to M2 via the VDR-PPAR $\gamma$  Signaling Pathway », *Research Article*, 1, p. 25.

# Annexes