



**HAL**  
open science

# Cellules immunitaires dans les maladies cardiométaboliques : altérations phénotypiques et fonctionnelles

Sothea Touch

► **To cite this version:**

Sothea Touch. Cellules immunitaires dans les maladies cardiométaboliques : altérations phénotypiques et fonctionnelles. Médecine humaine et pathologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066084 . tel-02076185

**HAL Id: tel-02076185**

**<https://theses.hal.science/tel-02076185>**

Submitted on 22 Mar 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE  
Ecole doctorale : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par  
**Sothea TOUCH**

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Sujet de la thèse :

**Cellules immunitaires dans les maladies cardiométaboliques :  
Altérations phénotypiques et fonctionnelles**

Soutenue publiquement le 20 mars 2017

Devant le jury composé de :

Pr Guy GOROCHOV

Pr Anne MEYER-DUTOUR

Dr Marion LECLERC

Pr Antonino NICOLETTI

Pr Karine CLEMENT

Dr Sébastien ANDRE

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Co-encadrant de thèse



## REMERCIEMENTS

J'adresse toute ma gratitude au Professeur Guy Gorochov pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, au Docteur Marion Leclerc et au Professeur Anne Dutour pour la lecture et l'analyse du manuscrit en qualité de rapporteurs et au Professeur Antonino Nicoletti pour avoir eu la gentillesse de participer à ce jury en tant qu'examineur.

Je remercie très sincèrement le Professeur Karine Clément qui m'a accueillie au sein de son équipe et qui m'a accordé sa confiance en me permettant, grâce au projet Européen MetaCardis et à l'Institut de Cardiométabolisme et de Nutrition, de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles et de mener à bien des projets passionnants. Merci pour l'ensemble des opportunités que vous m'avez offert durant ces quatre années.

Mes remerciements vont ensuite bien entendu au Dr Sébastien André qui a encadré ce travail qui a commencé en 2013 et qui m'a accompagnée tout au long de cette aventure qu'est la thèse. Merci de m'avoir introduite au domaine fascinant qu'est l'immunométabolisme, pour toutes ces discussions scientifiques enrichissantes et pour la relecture de ce manuscrit.

Je tiens bien sûr à remercier le Docteur Michèle Guerre-Millo, « ma troisième directrice de thèse », qui m'a co-encadrée en stage et au début de la thèse, pour ses précieux conseils, son implication dans le projet, sa rigueur scientifique et son attention aux détails (les données brutes !).

Je tiens à remercier le Docteur Edith Brot-Laroche, qui m'a fait découvrir les mystères de l'intestin grêle alors que je venais d'un labo où le gras est roi. Merci de m'avoir offert la chance de participer au beau projet qu'était la caractérisation des cellules T intestinales humaines et leur impact sur la sensibilité à l'insuline des entérocytes. Merci de m'avoir fait confiance pour présenter cette belle histoire à de nombreux congrès.

Je remercie le Docteur Christine Rouault pour sa bienveillance, ses bons conseils, son écoute et son aide tout au long de mon séjour à Nutriomique.

Bien sûr, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ces travaux de thèse, notamment :

Karen, qui a analysé avec soin nos données MAIT, pour sa patience, sa gentillesse, son investissement dans le projet et son amour du travail bien fait. Merci d'avoir été notre cowboy et pour ton soutien dans les moments de doute.

Judith, pour le travail énorme que tu as fourni pour MetaCardis, pour les discussions scientifiques de qualité que nous avons eues en réunion et pour tes remarques toujours pertinentes. Merci également pour ton soutien lors de cette fin de thèse.

Magali, merci pour toutes les heures passées devant FlowJo à s'arracher les cheveux sur les gatings, d'avoir été présente à chaque fois que j'essayais de faire les compensations toute seule et que ça ne marchait jamais du premier coup, d'avoir patiemment trié des cellules ~~moches~~ avec moi et sans que ce travail n'aurait pas été possible.

Florian, parce qu'entre immunologistes on se comprend, un grand merci pour avoir pris en charge avec succès les manips de finalisation du papier MAIT pendant que j'étais en rédaction/fin de thèse/~~au fond du trou~~. Tu es magique (une fois sur trois).

Céline, avec qui j'ai partagé des millions (des milliards) de cellules épithéliales intestinales en trois ans. Un grand merci également à Marianne, Aurélie et Hélène pour leur contribution au projet.

Je remercie bien sûr l'ensemble des membres de l'équipe Nutriomique, d'Integromics, du personnel du CRNH et du CRB ainsi que les membres de la communauté ICAN dont je ne pourrais citer tous les noms.

Je remercie en particulier mes anciens compagnons de thèse et de bureau : Maria, Sophie, Charles et Hedi à qui je succède (enfin !), mes autres compagnons de bureau et collègues passés et présents : Geneviève pour sa gentillesse et son accueil en 624, Jean et Marc pour la (trop) bonne ambiance qui régnait en 635, Sonia ma copine de goûter, Carla pour ses fameux cookies aux ~~ménémés~~, ~~mènémés~~ M&M's, Chloé, à qui je souhaite bon courage pour la thèse de sciences mais également Rohia, Valentine, Véro, Laurent et bien sûr Arnaud pour sa bonne humeur, pour avoir apporté de la verdure au labo, pris soin de nos nombreuses plantes, nous avoir instruits sur la vie des avocatiers, pour sa bonne humeur et pour avoir partagé chocolat, noix et pistaches avec nous. Merci aux nombreux petits stagiaires de passage avec qui j'ai travaillé et que je n'oublie pas, notamment Assma, mais aussi tous ceux avec qui je n'ai pas travaillé.

Merci à tous d'avoir partagé ces moments de vie avec moi (quatre longues années), pour les discussions scientifiques, ou pas, pour les concours de gâteaux et tous ces petits moments qui permettent aussi d'échapper au quotidien de la recherche : le  $p = 0.06$  comme dirait Sophie, les manip qu'on n'arrive pas à reproduire, les facteurs que l'on ne maîtrise pas, les aléas de la recherche quoi.

Mes remerciements vont bien sûr aux nombreux patients des différents protocoles et à leurs familles, qui ont consenti à donner une petite partie d'eux pour faire avancer ce projet, mais également aux chirurgiens et cliniciens qui ont permis l'obtention des prélèvements et le recrutement des patients, ainsi que les techniciens et les infirmiers.

Je n'oublie pas de remercier le Docteur Lubka Roumenina, qui m'a introduite au monde de la recherche en 2012 avec beaucoup de pédagogie et qui m'a donné envie de continuer un peu sur ce chemin.

Sur une note plus personnelle, je tiens tout particulièrement à remercier ma « table d'honneur », Am, Arvind (we miss you), Cé, Davy, Elo, Emilie, Gaga, Mat, Rob, Pam, Vanh et Yankel pour leur soutien au cours des quatre dernières années, vous avez été ma bouffée d'oxygène. Merci pour votre présence, votre amitié, les escape games, les soirées filles, les soirées d'anniversaire tous les mois, les escapades EVJF/vin/champagne/Normandie, les soirées JDS, et autres soirées loin des débats visant à savoir quelle est la meilleure cellule immunitaire (le lymphocyte T). Désolée pour les groupes et les doodles.

Je tiens à remercier l'ensemble de ma famille, en particulier mes parents et mon petit-frère pour qui le concept de « thèse » reste sans doute un grand mystère mais qui m'a apporté un soutien sans faille depuis le début ainsi qu'à ma Belle-Maman, Patricia. C'est bon, c'est fini !

Enfin, je dois terminer par adresser un grand merci à Nicolas pour m'avoir toujours soutenue, poussée, encouragée, motivée, re-motivée alors que nous étions pourtant dans la même galère. Tu es mon roc et je te remercie infiniment pour tout. Merci de m'avoir transmis cette part infime de ton amour pour la recherche.

# SOMMAIRE

Liste des figures et des tableaux.....	8
Liste des abréviations .....	10
Introduction .....	12
1. L'obésité .....	12
1.1 Définition.....	12
1.2 Epidémiologie.....	13
1.3 Des origines multifactorielles .....	14
1.3.1 Composante génétique .....	15
1.3.2 Société et environnement .....	15
1.4 Les conséquences liées à l'obésité.....	16
1.4.1 Les complications métaboliques .....	16
1.4.2 Les complications cardio-vasculaires.....	17
1.4.3 Complications non cardio-métaboliques .....	18
1.5 La chirurgie bariatrique .....	19
2. Système immunitaire dans l'obésité humaine et les maladies cardiométaboliques.....	20
2.1 Relations entre système immunitaire et métabolisme .....	20
2.1.1 Inflammation de bas grade dans l'obésité humaine .....	20
2.1.2 Conséquences de l'inflammation sur le métabolisme .....	22
2.1.3 Impact du métabolisme sur l'activation des cellules du système immunitaire ..	24
2.2 Introduction générale au système immunitaire.....	25
2.3 Immunité innée .....	26
2.3.1 Les monocytes.....	27
2.3.2 Les cellules dendritiques .....	28
2.3.3 Les cellules lymphoïdes innées .....	29
2.4 Immunité adaptative .....	30
2.4.1 Les lymphocytes B .....	31

2.4.2	Les lymphocytes T .....	32
2.5	A l'interface entre l'immunité innée et adaptative .....	34
2.5.1	Les cellules NKT.....	35
2.5.2	Les lymphocytes MAIT .....	36
3.	Inflammation tissulaire dans l'obésité et résistance à l'insuline.....	38
3.1	Tissu adipeux.....	39
3.1.1	Les macrophages .....	39
3.1.2	Les lymphocytes T .....	40
3.2	Macrophages et inflammation dans le foie et le muscle.....	41
4.	L'intestin grêle, nouvel acteur dans l'obésité .....	43
4.1	Structure de l'intestin grêle.....	43
4.2	La barrière intestinale .....	44
4.3	Particularités du système immunitaire intestinal .....	46
4.3.1	Compartiment inducteur.....	47
4.3.2	Initiation de la réponse immunitaire.....	47
4.3.3	Compartiment effecteur.....	50
4.3.4	Rôle protecteur de l'IL-17 et de l'IL-22 dans l'intestin ? .....	51
4.3.5	Rôle du microbiote intestinal dans la maturation du système immunitaire intestinal et dans la différenciation des LT .....	52
4.3.6	Altérations de l'immunité intestinale dans l'obésité et le diabète de type 2 .....	55
5.	Relations entre microbiote intestinal et obésité .....	57
	Projet de recherche et résultats .....	60
1.	Hypothèse de travail et objectifs.....	60
2.	Etude n°1 – Rôle de la production d'IL-17 et d'IL-22 par les lymphocytes T intestinaux dans l'obésité humaine : potentielle implication dans l'altération de la sensibilité à l'insuline des entérocytes .....	62
3.	Etude n°2 – Relations entre immunité systémique et immunité intestinale dans l'obésité humaine .....	88

3.1	Contexte et objectifs .....	88
3.2	Matériels et méthodes .....	90
3.3	Résultats.....	93
3.3.1	Description de la cohorte.....	93
3.3.2	L'obésité induit une augmentation du nombre de cellules immunitaires dans le sang circulant et un profil plus pro-inflammatoire des LT .....	94
3.3.3	L'immunité intestinale est altérée dans l'obésité humaine .....	100
3.4	Discussion générale et conclusions .....	103
4.	Etude n°3 – Implication des cellules MAIT dans le développement des maladies cardiométaboliques.....	105
	Discussion générale et perspectives .....	143
1.	Altérations de l'immunité intestinale dans l'obésité humaine .....	143
2.	Rôle des cellules Th17 produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 dans l'inflammation intestinale	144
3.	Impact du microenvironnement pro-inflammatoire et des cytokines IL-17 et IL-22 sur la sensibilité à l'insuline des entérocytes .....	147
4.	Liens entre immunité systémique et intestinale .....	148
5.	La diminution des cellules MAIT sanguines, un point commun dans les maladies métaboliques et cardiovasculaires ? .....	149
6.	Quelles hypothèses pour la perte des cellules MAIT en circulation ? .....	150
6.1	Vers un recrutement tissulaire .....	150
6.2	L'hypothèse du glucose .....	151
7.	Cellules MAIT et microbiote intestinal .....	152
8.	Limites et forces de l'étude.....	152
	Conclusion générale .....	154
	Bibliographie.....	159

# LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

## Figures

Figure 1. Evolution de la prévalence de l'obésité en France.....	14
Figure 2. Origines multifactorielles de l'obésité.....	14
Figure 3. Prévalence de sujets avec 1, 2 ou 3 facteurs de risques cardio-vasculaires.....	18
Figure 4. Les 3 principaux types de chirurgies bariatriques .....	20
Figure 5. L'inflammation de bas grade dans l'obésité contribue à l'état d'insulino-résistance.	23
Figure 6. La résistance à l'insuline induite après une infection est un processus adaptatif.....	24
Figure 7. Les acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. ....	25
Figure 8. Classification des cellules lymphoïdes innées .....	30
Figure 9. Influence de l'environnement cytokinique sur la différenciation des principales sous-populations de LT CD4 <sup>+</sup> auxiliaires et principales fonctions.....	33
Figure 10. Comparaison des récepteurs T (TCR) et des différentes molécules présentatrices d'antigène parmi les LT conventionnels et non conventionnels .....	36
Figure 11. Phénotype des cellules MAIT et mécanismes d'activation .....	37
Figure 12. Altérations des différents types de cellules immunitaires présentes dans le TA au cours de l'obésité.....	41
Figure 13. L'obésité induit des altérations dans les tissus cibles de l'insuline .....	42
Figure 14. Structure de l'intestin grêle et système d'amplification de la surface d'absorption.....	44
Figure 15. Anatomie et composants de la barrière épithéliale intestinale.....	46
Figure 16. Représentation schématique du système immunitaire intestinal .....	47
Figure 17. Mécanismes de capture antigénique dans l'intestin.....	48
Figure 18. Système immunitaire de l'intestin grêle. ....	50
Figure 19. Comparaison quantitative du microbiote fécal dans 2 populations de sujets sains.	53
Figure 20. Description du système de co-culture .....	64
Figure 21. Etudes des relations entre immunité systémique et immunité intestinale en relation avec les paramètres biocliniques des sujets, la composition du microbiote intestinal et l'alimentation. ....	89
Figure 22. Stratégie d'analyse par cytométrie en flux des leucocytes circulants et des grandes sous-populations immunitaires.....	94
Figure 23. Augmentation du nombre de cellules immunitaires circulantes dans l'obésité et corrélation avec l'IMC .....	95

Figure 24. Pourcentage de cellules immunitaires innées dans le sang .....	96
Figure 25. Pourcentage de cellules immunitaires adaptatives dans le sang .....	97
Figure 26. Caractérisation des sous-populations de cellules dendritiques (DCs) dans le sang.....	98
Figure 27. Caractérisation des Tregs dans le sang .....	99
Figure 28. L'obésité induit une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires dans le sang .....	100
Figure 29. L'obésité altère le nombre de leucocytes dans la lamina propria de l'intestin grêle .....	101
Figure 30. Caractérisation des grandes sous-populations immunitaires intestinales .....	102
Figure 31. Production de cytokines intracellulaires par les cellules MAIT circulantes.....	140
Figure 32. Analyse des cellules MAIT circulantes après bypass gastrique Roux-en-Y .....	141
Figure 33. Analyse par cytométrie en flux de la fréquence des MAIT tissulaires .....	142

## **Tableaux**

Tableau 1. Classification de l'obésité en fonction de l'indice de masse corporelle.....	12
Tableau 2. Définition du syndrome métabolique selon les critères de l'IDF.....	16
Tableau 3. Liste des anticorps de cytométrie en flux de surface utilisés pour la caractérisation des cellules immunitaires circulantes et intestinales de l'étude n°2.....	92
Tableau 4. Paramètres cliniques de la cohorte de l'étude n°2.....	93
Tableau 5. Résumé des altérations immunitaires observées dans l'intestin grêle au cours de l'obésité par rapport au statut mince chez l'homme et la souris .....	146

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADA</b>	<i>American Diabetes Association</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucleique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BCR</b>	Récepteur à l'antigène des lymphocytes B ( <i>B cell receptor</i> )
<b>CD-</b>	Cluster de différenciation
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CCL</b>	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
<b>CCR</b>	<i>C-C chemokine receptor</i>
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>CRP</b>	Protéine C réactive ( <i>C-reactive protein</i> )
<b>DC</b>	Cellule dendritique ( <i>Dendritic cell</i> )
<b>DT2</b>	Diabète de type 2
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>GALT</b>	Tissu lymphoïde associé au tube digestif ( <i>Gut-associated lymphoid tissue</i> )
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>HbA1c</b>	Hémoglobine glyquée
<b>HDL</b>	Lipoprotéine de haute densité ( <i>High density lipoprotein</i> )
<b>HFD</b>	Régime riche en gras ( <i>High fat diet</i> )
<b>HOMA-IR</b>	Index de résistance à l'insuline
<b>IBD</b>	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin ( <i>Inflammatory bowel disease</i> )
<b>IDF</b>	Fédération Internationale du Diabète ( <i>International diabetes federation</i> )
<b>IEL</b>	Lymphocyte intra-épithéliaux ( <i>Intra-epithelial lymphocytes</i> )
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B kinase
<b>IL-</b>	Interleukine-
<b>ILC</b>	Cellules lymphoïdes innées ( <i>Innate lymphoid cells</i> )
<b>Ig-</b>	Immunoglobuline
<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle en kg/m <sup>2</sup>
<b>IRS</b>	<i>Insulin receptor substrate</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>

<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LGC</b>	Faible richesse bactérienne ( <i>Low gene count</i> )
<b>LP</b>	Lamina propria
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>MAIT</b>	<i>Mucosal-associated invariant T cells</i>
<b>MC</b>	Monocyte classique
<b>MC4R</b>	Récepteur de type 4 aux mélanocortines ( <i>Melanocortin 4 receptor</i> )
<b>mDC</b>	Cellule dendritique myéloïde
<b>MI</b>	Monocyte intermédiaire
<b>MNC</b>	Monocyte non classique
<b>MR1</b>	<i>MHC-related protein 1</i>
<b>NAFLD</b>	Stéatose hépatique non alcoolique ( <i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> )
<b>NASH</b>	Stéato-hépatite non alcoolique ( <i>Non-alcoholic steato hepatitis</i> )
<b>NK</b>	Lymphocyte natural killer
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PBMC</b>	Cellules mononuclées du sang périphérique ( <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )
<b>pDC</b>	Cellule dendritique plasmacytoïde
<b>PMA</b>	Phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>PPs</b>	Plaques de Peyer
<b>PLZF</b>	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger</i>
<b>RI</b>	Résistance à l'insuline
<b>SAA</b>	<i>Serum amyloid A</i>
<b>SCFA</b>	Acides gras à chaîne carbonée courte ( <i>Short-chain fatty acids</i> )
<b>SFB</b>	Bactérie filamenteuse segmentée ( <i>Segmented filamentous bacteria</i> )
<b>TA</b>	Tissu adipeux
<b>TCR</b>	Récepteur à l'antigène des lymphocytes T
<b>Th</b>	Lymphocyte T auxiliaire ( <i>T helper</i> )
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>TLR</b>	Récepteur de type Toll ( <i>Toll-like receptor</i> )
<b>TNF</b>	<i>Tumor-necrosis factor</i>
<b>Treg</b>	Lymphocyte T régulateur
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine

# INTRODUCTION

## 1. L'obésité

### 1.1 Définition

Le surpoids et l'obésité sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé ». L'obésité a été reconnue comme une maladie chronique par l'OMS en 1997. En pratique, l'indice de masse corporelle (IMC), qui correspond au poids en kg divisé par le carré de la taille en m<sup>2</sup>, est une mesure anthropométrique communément utilisée pour estimer la corpulence d'un individu adulte. L'éventail dit « normal » se situe entre 18,5 et 24,9 kg/m<sup>2</sup>, l'individu est en surpoids à partir de 25 kg/m<sup>2</sup>. Enfin, l'obésité se définit par un IMC supérieur ou égal à 30 kg/m<sup>2</sup> et se divise en 3 classes associées à un degré de risque de comorbidité : au-delà de 40 kg/m<sup>2</sup>, on parle d'obésité morbide (**Tableau 1**).

Classification	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Risque de comorbidité associé
Insuffisance pondérale	< 18,5	Faible (mais risque accru d'autres problèmes cliniques)
Valeurs de référence	18,5 – 24,9	Moyen
Surpoids	25,0 – 29,9	Accru
Obésité	≥ 30,0	
Classe I ( <i>modérée</i> )	30,0 – 34,9	Modéré
Classe II ( <i>sévère</i> )	35,0 – 39,9	Important
Classe III ( <i>morbide</i> )	≥ 40	Très important

**Tableau 1.** Classification de l'obésité en fonction de l'indice de masse corporelle (d'après l'OMS)

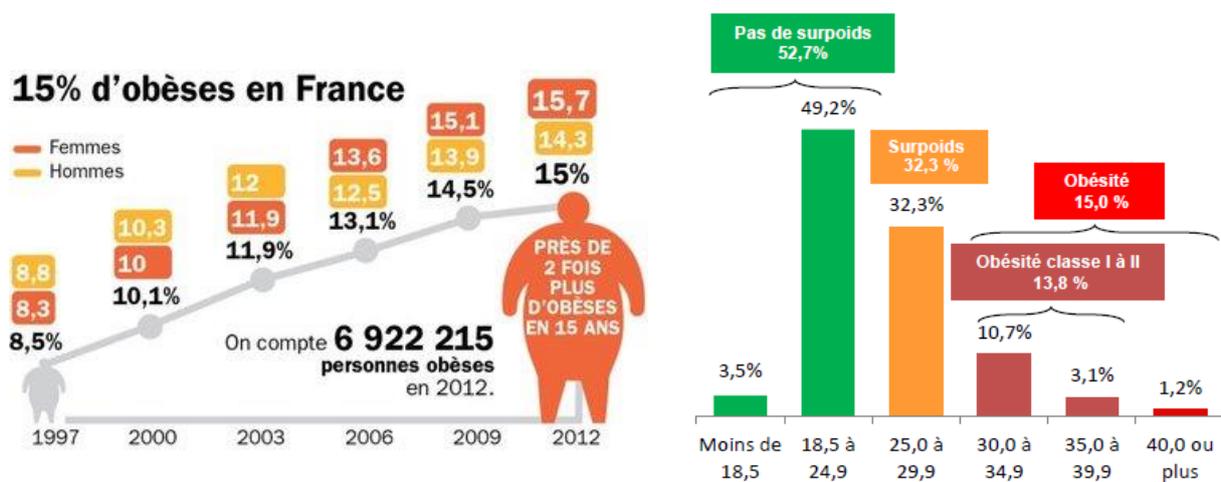
Si plusieurs études ont effectivement établi une relation entre IMC et mortalité/morbidité, cet indice ne permet toutefois pas de distinguer le poids associé à la masse musculaire ou calcique de celui associé à la masse grasse, ou encore d'évaluer la répartition des graisses qui influence considérablement le risque de comorbidités associées à l'obésité. Des sujets de même IMC peuvent avoir des niveaux et/ou une répartition de masses grasses très différents.

On distingue deux types d'obésité : d'une part, l'obésité androïde (centrale et viscérale) qui se distingue par une accumulation de graisse au niveau abdominal qui est associée au développement de pathologies métaboliques et cardiovasculaires et à un risque de comorbidité élevé (O'Neill and O'Driscoll, 2015), et d'autre part, l'obésité gynoïde (périphérique et sous cutanée) où la graisse est répartie au niveau des hanches et des cuisses et qui est rarement associée à des complications cardiométaboliques (Després, 2012; Vague, 1947). Pour rendre compte de cette répartition, des outils tels que la mesure du tour de taille ou du rapport tour de taille/tour de hanche peuvent être utilisés. Un rapport  $> 1,0$  chez l'homme et  $> 0,85$  chez la femme indique une accumulation de graisse au niveau abdominal.

## 1.2 Epidémiologie

Véritable pandémie, le nombre de cas d'obésité a plus que doublé depuis 1980 au niveau mondial. L'OMS estime qu'en 2014, plus de 1,9 milliards d'adultes étaient en surpoids parmi lesquels plus de 600 millions étaient obèses, ce qui représente environ 13% de la population mondiale (11% des hommes et 15% des femmes). Cette incidence croissante n'épargne aucune tranche d'âge et en 2014, l'OMS dénombrait en effet environ 41 millions d'enfants de moins de 5 ans en surpoids ou obèses. Cette maladie ne concerne pas que les pays à haut revenu, elle est également en augmentation dans les pays à revenu faible ou intermédiaire qui doivent en parallèle faire face aux problèmes des maladies infectieuses et de la dénutrition, on parle même de « double charge » de morbidité.

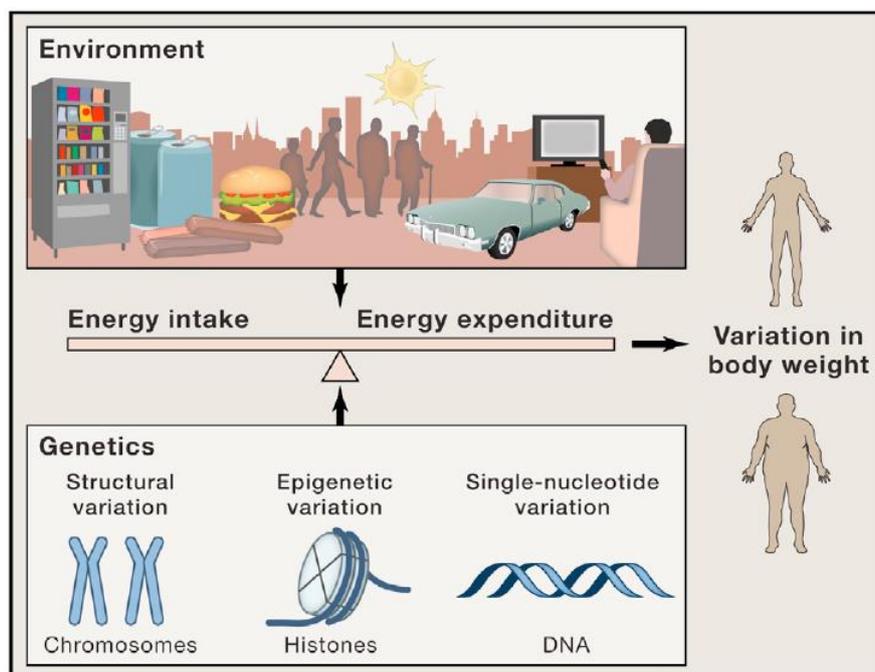
A l'échelle nationale, la prévalence de l'obésité est également en hausse : en 2012, le rapport ObEpi (Roche) indiquait que 32,3% des Français adultes présentaient un IMC entre 25,0 à 29,9 kg/m<sup>2</sup> et 15% étaient obèses (contre 8,5% en 1997). Il est inquiétant de noter que la prévalence de l'obésité de classe III, dite morbide, est en constante hausse et est passée de 0,3% à 1,2% en 15 ans (**Figure 1**).



**Figure 1.** Evolution de la prévalence de l'obésité en France entre 1997 et 2012 et répartition de la population en fonction de l'IMC (kg/m<sup>2</sup>) en 2012 (Etude ObEpi Roche)

### 1.3 Des origines multifactorielles

L'obésité résulte classiquement de la perturbation de l'homéostasie énergétique (un apport calorique supérieur à la dépense). Cependant, tous les individus ne répondent pas de la même façon aux changements environnementaux, témoignant ainsi de l'importance des prédispositions biologiques individuelles (génétiques) et également de phénomènes épigénétiques (**Figure 2**) (Dubern and Clément, 2007; Mutch and Clément, 2006).



**Figure 2.** Origines multifactorielles de l'obésité (d'après (van der Klaauw and Farooqi, 2015))

### **1.3.1 Composante génétique**

Le rôle de la génétique dans le développement de l'obésité est aujourd'hui bien établi. Un exemple illustrant cet aspect est l'existence de formes d'obésité dites monogéniques qui résultent d'une mutation unique au niveau d'un gène clé dans la régulation de la prise alimentaire, comme le gène de la leptine ou le gène du récepteur aux mélanocortines (MC4R) (Farooqi et al., 2003). Ces cas sont rares, souvent très sévères et à l'origine d'une obésité précoce avec des anomalies endocrines associées. L'impact des facteurs génétiques sur l'obésité a également été illustré par plusieurs études chez des jumeaux et des familles : des expériences de suralimentation montrent une corrélation entre la prise de poids chez 12 paires de jumeaux homozygotes (Bouchard et al., 1990), deux autres études rapportent que 20 à 70% de la variance de l'IMC pourrait être expliquée par la génétique (Allison et al., 1996; Stunkard et al., 1986a, 1986b, 1990).

### **1.3.2 Société et environnement**

L'obésité est cependant une maladie multifactorielle qui résulte d'une interaction entre plusieurs facteurs génétiques et environnementaux (Basdevant, 2006). Lors de la phase de prise de poids, où se constitue l'obésité, on observe un déséquilibre de la balance énergétique qui résulte de facteurs comportementaux mais également environnementaux. L'environnement nutritionnel, familial (habitudes alimentaires) et social ainsi que les modes de vie peuvent favoriser le développement de l'obésité chez des individus prédisposés. Les modes de vie malsains, caractérisés par la surconsommation alimentaire, l'augmentation de la consommation d'aliments caloriques et riches en lipides, l'absence d'activité physique et la sédentarité qui résultent de l'évolution des modes de transport et de l'urbanisation croissante représentent sans surprise des facteurs de risque pour l'obésité.

La prévalence de l'obésité est également très influencée par des facteurs sociaux et économiques, certains sous-groupes de populations paraissent en effet plus vulnérables que d'autres. Il existe par exemple une corrélation inverse entre le niveau de revenus du foyer et la prévalence de l'obésité, il en est de même pour le niveau d'instruction (Etudes ObEpi 1997 à 2012).

## 1.4 Les conséquences liées à l'obésité

L'obésité et les complications qui lui sont associées constituent aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Sans compter les conséquences psychosociales, l'obésité accroît fortement le risque de mortalité et est associée à une prévalence accrue de troubles métaboliques (diabète de type 2, dyslipidémies, maladies hépatiques non alcooliques), de maladies cardio-vasculaires (coronaropathies, hypertension artérielle, thromboses veineuses), de troubles musculo-squelettiques (arthrose) et de certains cancers (endomètre, sein, ovaires, prostate, foie, vésicule biliaire, rein et colon).

### 1.4.1 Les complications métaboliques

L'obésité, et plus particulièrement l'obésité androïde, est associée à des complications telles que le syndrome métabolique. Selon la définition de la Fédération Internationale du Diabète (IDF), le syndrome métabolique est un regroupement de facteurs de risque prédisposant à des complications métaboliques et/ou cardio-vasculaires. Il est défini par une obésité centrale associée à deux autres facteurs de risques comme un taux élevé de triglycérides, un faible taux de cholestérol HDL, une tension artérielle anormale ou un taux élevé de glucose plasmatique. Les valeurs seuil sont décrites dans le **Tableau 2**.

<b>Tour de taille</b>	Selon le groupe ethnique. En Europe : ≥ 94 cm chez les hommes ≥ 80 cm chez les femmes
Plus deux des quatre facteurs suivants :	
<b>Taux de triglycérides</b>	≥ 1,7 mmol/L ou un traitement spécifique de ce trouble lipidique
<b>Taux de cholestérol HDL</b>	< 1,03 mmol/L chez les hommes < 1,29 mmol/L chez les femmes ou un traitement spécifique de ce trouble lipidique
<b>Hypertension artérielle</b>	Systolique ≥ 130 mmHg ou diastolique ≥ 85 mmHg ou un traitement d'une hypertension diagnostiquée précédemment
<b>Glycémie à jeun</b>	≥ 5,6 mmol/L ou un diabète de type 2 diagnostiqué précédemment.

*Tableau 2. Définition du syndrome métabolique selon les critères de l'IDF*

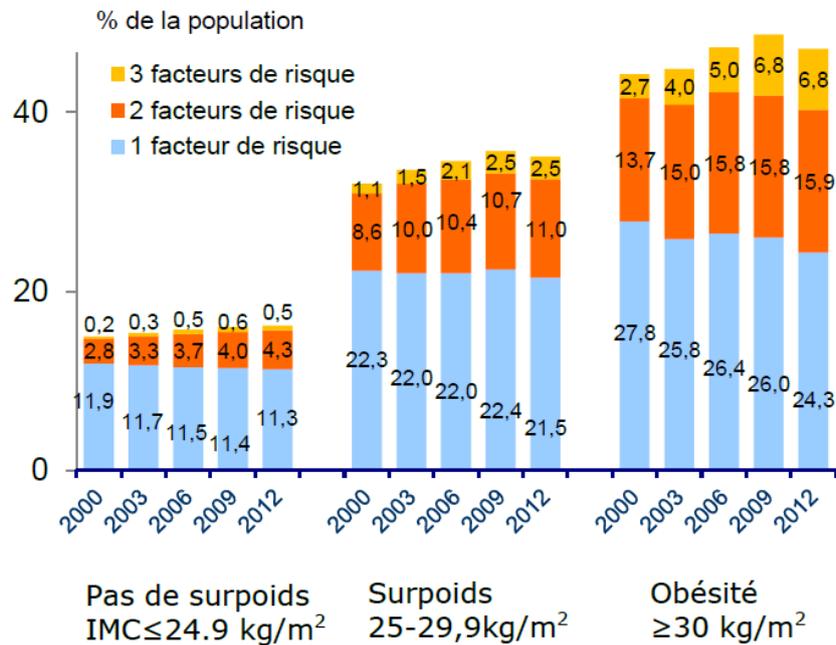
L'obésité favorise également la résistance à l'insuline (RI), c'est-à-dire une diminution de la capacité des organes périphériques (comme le muscle, le foie et le tissu adipeux) à répondre de façon adaptée aux effets de l'insuline. Cette résistance à l'insuline prédispose au développement du diabète de type 2 (DT2). Le DT2, qui touche environ 30% des sujets obèses, est une maladie complexe qui représente bien plus qu'une comorbidité de l'obésité. Cette maladie chronique nécessite un suivi médical constant qui va au-delà de la simple réduction de la glycémie, le diabète multiplie par 2 ou 3 le risque d'accidents cardiaques ou vasculaires cérébraux. Les critères diagnostiques du DT2 définis par l'American Diabetes Association (ADA) (Association, 2014) sont basés sur la mesure d'une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/L (ou 7,0 mmol/L), ou bien d'une glycémie supérieure ou égale à 2,00 g/L (11,10 mmol/L) 2h après une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) par l'ingestion de 75 g de glucose. En 2010, l'ADA a approuvé l'utilisation de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) comme outil de diagnostic pour le diabète de type 2 (Association, 2014). Ce paramètre rend compte de l'équilibre glycémique au cours des 3 mois qui précèdent le dosage. La valeur seuil pour le diabète a été établie à  $\geq 6,5\%$  de l'hémoglobine totale.

Le foie est un organe métabolique clé dans le métabolisme glucidique et dans sa régulation, de ce fait, il est également sensible à un déséquilibre de la balance énergétique. Caractérisé par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD ou non alcoholic fatty liver diseases) est l'une des formes les plus courantes de maladie chroniques du foie. La NAFLD commence donc par une accumulation de triglycérides hépatique (stéatose hépatique) et peut progresser vers la stéatohépatite non alcoolique (NASH ou non-alcoholic steatohepatitis) qui se définit par une stéatose, une inflammation lobulaire, une ballonnisation des hépatocytes et une fibrose dans les cas les plus sévères. La NASH a une prévalence plus élevée chez les sujets obèses et DT2 et peut évoluer vers une cirrhose et un cancer hépatique.

#### **1.4.2 Les complications cardio-vasculaires**

Chaque élément du syndrome métabolique (hypertension artérielle, dyslipidémie, hyperglycémie...) augmente le risque de développer des maladies cardio-vasculaires qui, en 2012, représentaient la première cause de décès dans le monde. Ces maladies regroupent notamment l'hypertension artérielle, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque, les accidents vasculaires cérébraux et les thromboses veineuses. La probabilité d'avoir l'association de 3 facteurs de risque cardio-vasculaires augmente avec l'IMC : elle est 14 fois

plus importante chez les sujets obèses et 5 fois plus importante chez les sujets en surpoids par rapport à des individus de corpulence normale (**Figure 3**).



**Figure 3.** Prévalence de sujets avec 1, 2 ou 3 facteurs de risques cardio-vasculaires (hors tabagisme) par niveau d'IMC dans la population française entre 2000 et 2012 (ObEpi, Roche)

### 1.4.3 Complications non cardio-métaboliques

L'obésité peut également entraîner des complications respiratoires et être à l'origine du syndrome d'apnée obstructive du sommeil et du syndrome obésité hypoventilation. Cette difficulté respiratoire au cours du sommeil s'explique par des obstructions pharyngées répétées dont la principale cause est anatomique.

L'obésité peut également favoriser des complications ostéo-articulaires très invalidantes telles que l'arthrose (Anandacoomarasamy et al., 2009).

Des études ont également montré un lien entre l'IMC et le risque de développer certains cancers : prostate, colorectal, voies biliaires (hommes), endomètre, voies biliaires, col utérin, ovaires, sein, colorectal (femmes).

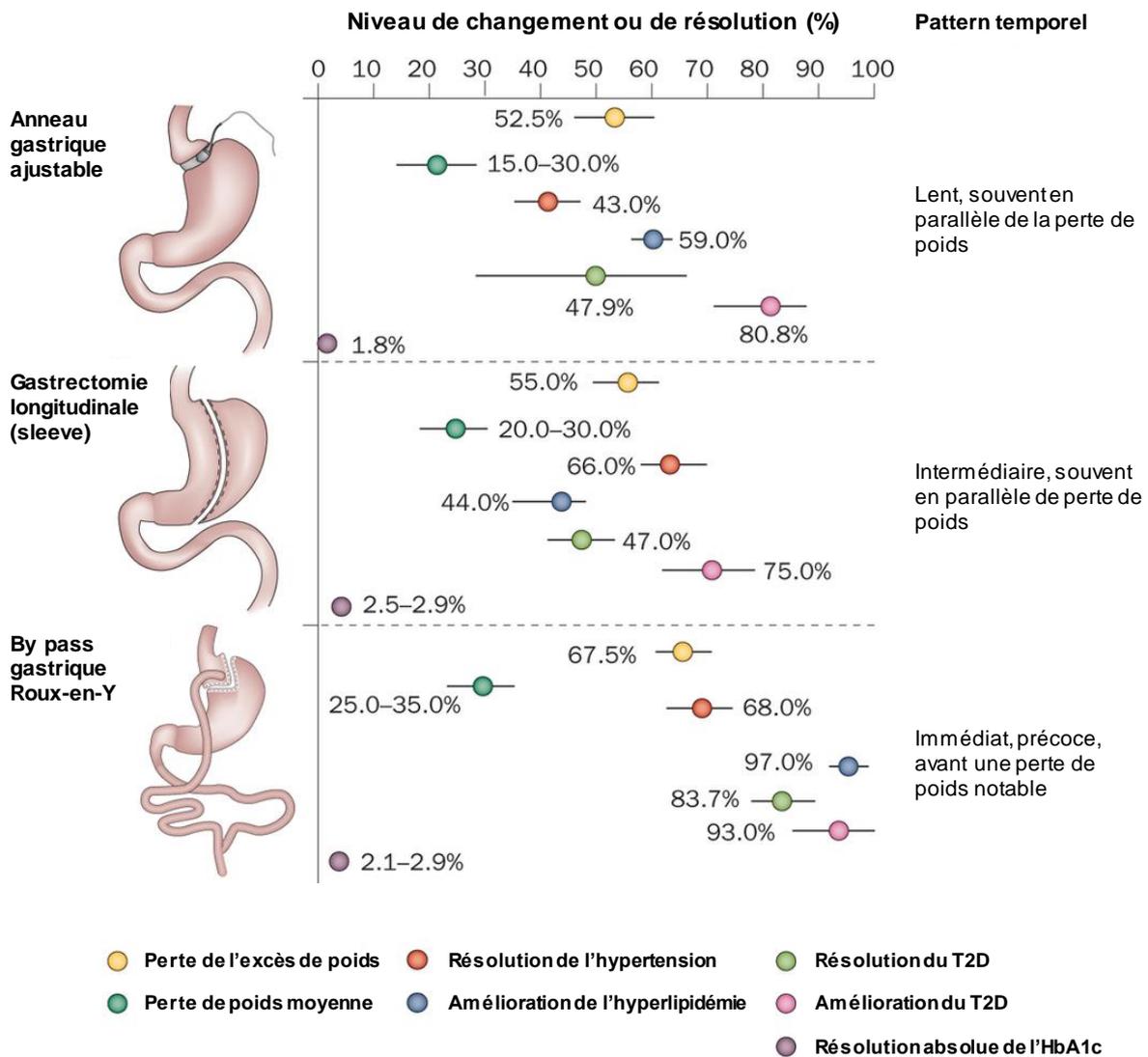
L'obésité peut également avoir de lourdes conséquences psychosociales : une altération de la qualité de vie, une discrimination, une altération de l'image et de l'estime de soi.

## 1.5 La chirurgie bariatrique

De nombreux patients obèses et obèses diabétiques ne parviennent pas à perdre leur excès de masse grasse ni à contrôler leurs paramètres glycémiques. Pour ces patients, la chirurgie bariatrique est une intervention permettant une perte de poids drastique ainsi qu'une amélioration et une réduction des comorbidités associées à l'obésité. Ce traitement est indiqué pour les patients pour lesquels les autres mesures de perte de poids ont échoué et qui présentent les formes les plus sévères d'obésité, c'est-à-dire avec un IMC  $> 40 \text{ kg/m}^2$ , ou bien un IMC  $> 35 \text{ kg/m}^2$  accompagné de comorbidités.

Parmi les interventions chirurgicales les plus pratiquées, l'anneau gastrique et la gastrectomie ou « sleeve » sont des méthodes restrictives permettant la réduction du volume de l'estomac et par conséquent de la quantité d'aliments pouvant être ingérées, ce qui déclenche la satiété avec des quantités d'aliments plus faibles. La « sleeve » en particulier induit une perte de poids significative ; les résultats pondéraux des patients opérés d'anneau sont moindres.

Le « bypass » gastrique Roux-en-Y est une méthode qui combine la restriction (gastrectomie) et la malabsorption, c'est-à-dire le détournement du duodénum et d'une partie de l'intestin grêle absorptif (jéjunum). Cela permet aux aliments ingérés de se déverser directement dans une partie distale du jéjunum où ils sont absorbés. Plusieurs études cliniques ont montré l'efficacité de cette opération sur l'évolution du diabète de type 2 et les autres comorbidités associées à l'obésité (Bradley et al., 2012). Une étude a montré que les traitements médicamenteux conventionnels et le changement de mode de vie étaient moins efficaces que la chirurgie bariatrique pour résoudre l'hyperglycémie des patients obèses diabétiques (Mingrone et al., 2012). D'autres études ont montré que la chirurgie bariatrique permettait d'améliorer le statut métabolique des patients, leur hypertension, leur profil lipidique et ainsi de réduire le risque cardiovasculaire (Sjöström et al., 2012) (**Figure 4**).



**Figure 4.** Les 3 principaux types de chirurgies bariatriques et leurs effets sur la perte de poids et les principales co-morbidités dans les 3 à 5 années suivants l'opération. (Adapté de (Frühbeck, 2015)).

## 2. Système immunitaire dans l'obésité humaine et les maladies cardiométaboliques

### 2.1 Relations entre système immunitaire et métabolisme

#### 2.1.1 Inflammation de bas grade dans l'obésité humaine

L'obésité est aujourd'hui reconnue comme une maladie inflammatoire de bas-grade (Cancello and Clément, 2006). Classiquement, l'inflammation est décrite comme une réponse adaptative de l'organisme déclenchée par un signal de danger tel qu'une infection ou une lésion tissulaire.

Elle se caractérise par des symptômes comme le gonflement (*tumor*), la rougeur (*rubor*), la douleur (*dolor*) et la chaleur (*calor*) (Medzhitov, 2008). Cette réponse adaptative est transitoire et de courte durée et son prolongement peut être néfaste pour la santé. Dans l'obésité, les caractéristiques classiques de l'inflammation ne sont pas, ou peu retrouvées, l'inflammation est dite de bas grade, c'est-à-dire chronique et persistante dans le temps (Hotamisligil, 2006).

En 1993, l'équipe de Bruce Spiegelman décrit dans plusieurs modèles murins d'obésité une augmentation de l'expression et de la production de TNF- $\alpha$  (tumor-necrosis factor  $\alpha$ ) dans le sang et le tissu adipeux (TA) (Hotamisligil et al., 1993). Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire qui peut activer une cascade de signaux de transduction dont certains peuvent inhiber l'action de l'insuline (décrit dans le chapitre suivant). Dans l'étude de Spiegelman, la neutralisation du TNF- $\alpha$  chez les souris obèses induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie du glucose. Cette étude établit pour la première fois un lien entre inflammation chronique et résistance à l'insuline dans l'obésité. Cette relation sera également confirmée chez l'homme par la même équipe dans une cohorte de 19 sujets obèses par rapport à 18 sujets minces. L'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et sa concentration sont augmentées dans le TA dans l'obésité et son expression est positivement corrélée avec l'hyperinsulinémie avant et après perte de poids dans la cohorte étudiée (Hotamisligil et al., 1995). Cependant, si plusieurs études murines ont permis de confirmer l'existence d'un lien causal entre inflammation et résistance à l'insuline, les études menées chez l'homme ne permettent pas clairement d'expliquer le rôle du TNF- $\alpha$  dans l'induction de la résistance à l'insuline et reposent sur des associations.

Par la suite, plusieurs études réalisées dans des modèles murins d'obésité et chez l'homme ont montré qu'en plus du TNF- $\alpha$ , l'inflammation de bas grade accompagnant l'obésité est également caractérisée par une augmentation modérée dans la circulation de protéines de la phrase aigüe de l'inflammation incluant la protéine C réactive (CRP) et le sérum amyloïde A (SAA), de cytokines incluant l'interleukine-6 (IL-6) et l'IL-8 ainsi que certaines chimiokines (CCL2, chemokine ligand 2 et CCL5) (Dalmas et al., 2011; Hotamisligil, 2006; Poitou et al., 2005). Suite à une perte de poids induite par une restriction calorique ou une chirurgie bariatrique, les taux circulants de ces médiateurs inflammatoires se retrouvent diminués (Dalmas et al., 2011).

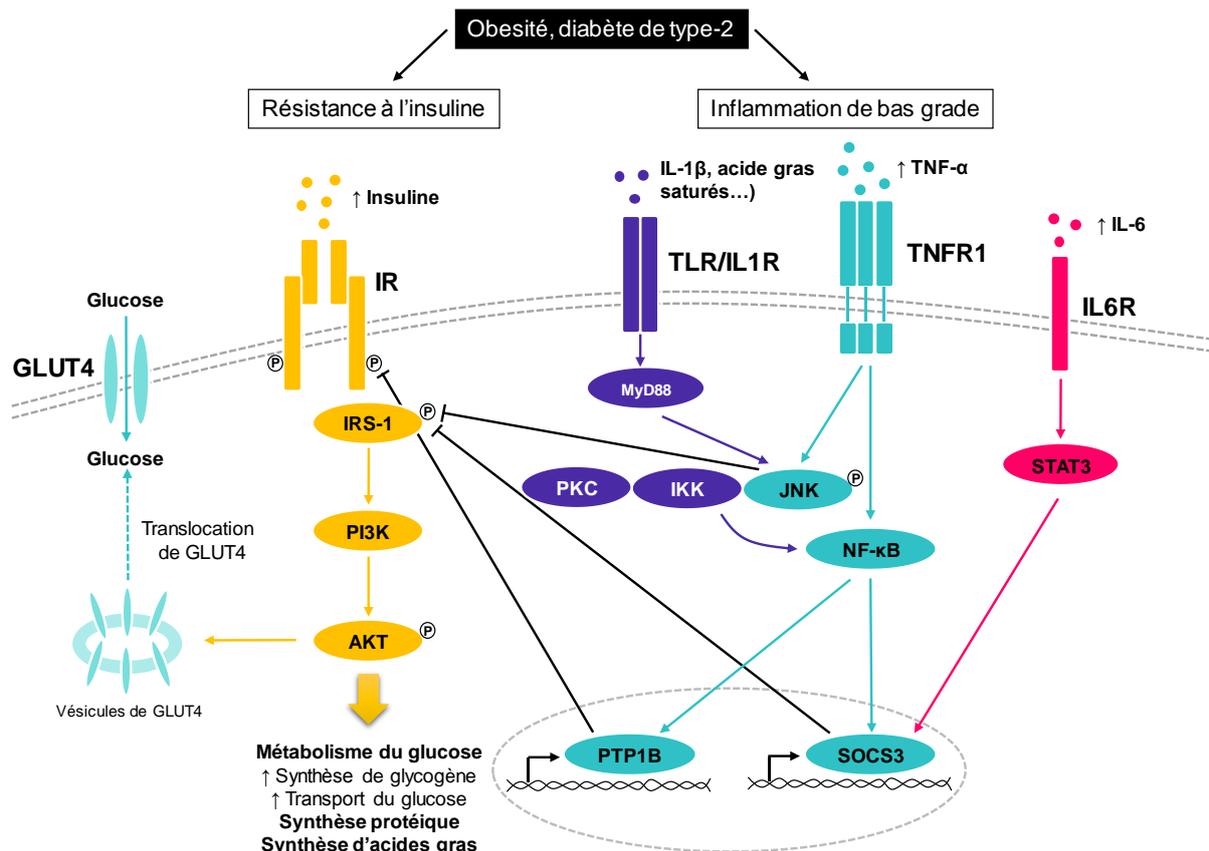
L'obésité est également caractérisée par un recrutement de cellules immunitaires activées dans les tissus enflammés, notamment dans le tissu adipeux, le foie, les muscles, le pancréas et

l'intestin (décrit dans le chapitre 3). Au cours de l'obésité, il existe donc une inflammation systémique et une inflammation tissulaire. Cette inflammation joue un rôle non seulement dans la chronicisation de l'obésité mais également dans le développement de nombreuses complications métaboliques comme le DT2 et la résistance à l'insuline ainsi que les complications cardiovasculaires et le développement de certains cancers (Hotamisligil, 2006).

L'épidémie mondiale d'obésité et l'implication de médiateurs de l'inflammation dans l'insulino-résistance a ouvert un nouveau champ d'investigation : l'immunométabolisme, à la frontière entre deux disciplines historiquement distinctes, l'immunité et le métabolisme. Des changements dans les métabolites impliqués dans plusieurs voies métaboliques peuvent impacter le devenir de la réponse immunitaire et à l'inverse, le système immunitaire peut jouer un rôle physiologique mais également pathologique dans la régulation du métabolisme (Mathis and Shoelson, 2011; O'Neill et al., 2016).

### **2.1.2 Conséquences de l'inflammation sur le métabolisme**

Ainsi, dans l'obésité et le diabète de type 2, des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  peuvent induire des dysfonctionnements métaboliques, et notamment promouvoir la résistance à l'insuline tissulaire. Ces cytokines activent des voies de signalisation inflammatoires entraînant l'activation de protéines kinases comme JNK (cJun N-terminal kinase) et IKK (I $\kappa$ B-kinase) qui peuvent interférer avec la voie de signalisation de l'insuline. Ces protéines peuvent notamment inhiber la phosphorylation de la tyrosine sur le substrat du récepteur de l'insuline IRS1 en augmentant la phosphorylation de la sérine (**Figure 5**). Cela va induire une résistance à l'insuline et entre autres une diminution de l'absorption du glucose par les cellules sensibles à l'insuline.



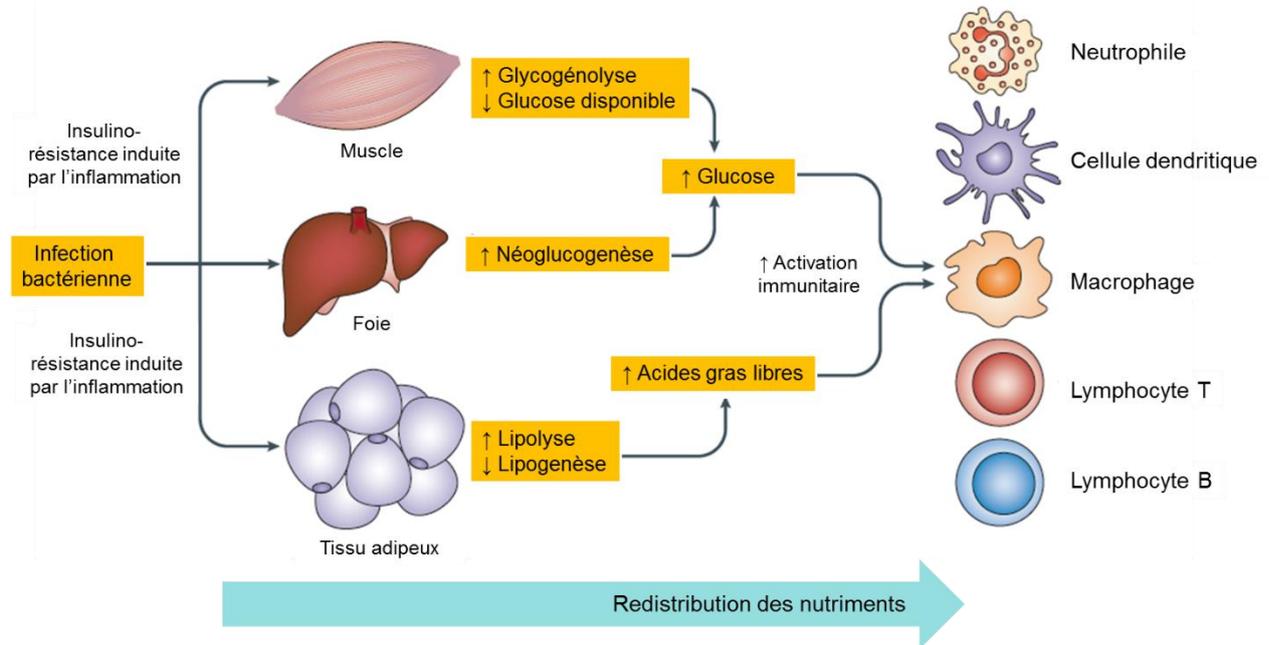
**Figure 5.** L'inflammation de bas grade dans l'obésité contribue à l'état d'insulino-résistance.

L'obésité et le diabète de type-2 sont accompagnés d'une élévation de la concentration en insuline, d'acides gras saturés et de cytokines pro-inflammatoires en circulation. L'augmentation de la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  vont activer d'une part la kinase JNK qui va inhiber la phosphorylation de la tyrosine sur IRS-1 dans la voie de signalisation de l'insuline. TNF- $\alpha$  active également la voie NF- $\kappa$ B qui entraîne l'expression de PTP1B et SOCS3 qui vont inhiber la phosphorylation du récepteur à l'insuline (IR) et inhiber la phosphorylation d'IRS-1 respectivement. L'IL-6 induit une activation de la voie STAT3/SOCS3 qui joue également sur l'inhibition d'IRS-1. Adapté de (Gray and Kim, 2011; Kim, 2012; Vogt and Brüning, 2013).

(Abréviations : AKT, protein kinase B ; GLUT4, glucose transporter type 4 ; IKK, I $\kappa$ B-kinase ; IL, interleukin ; IL1R, IL-1 receptor ; IL6R, IL-6 receptor ; IR, insulin receptor ; IRS-1, insulin receptor substrate 1 ; JNK, cJun N-terminal kinase ; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$  light-chain, P, phosphorylation ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; PKC, protein kinase ; PTP1B, protein tyrosine phosphatase 1B ; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3 ; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3 ; TLR, toll-like-receptor ; TNF- $\alpha$ , tumor-necrosis factor alpha.)

### 2.1.3 Impact du métabolisme sur l'activation des cellules du système immunitaire

Les besoins métaboliques du système immunitaire pour faire face à une infection illustrent également bien la relation entre immunité et métabolisme (Chawla et al., 2011) (**Figure 6**).



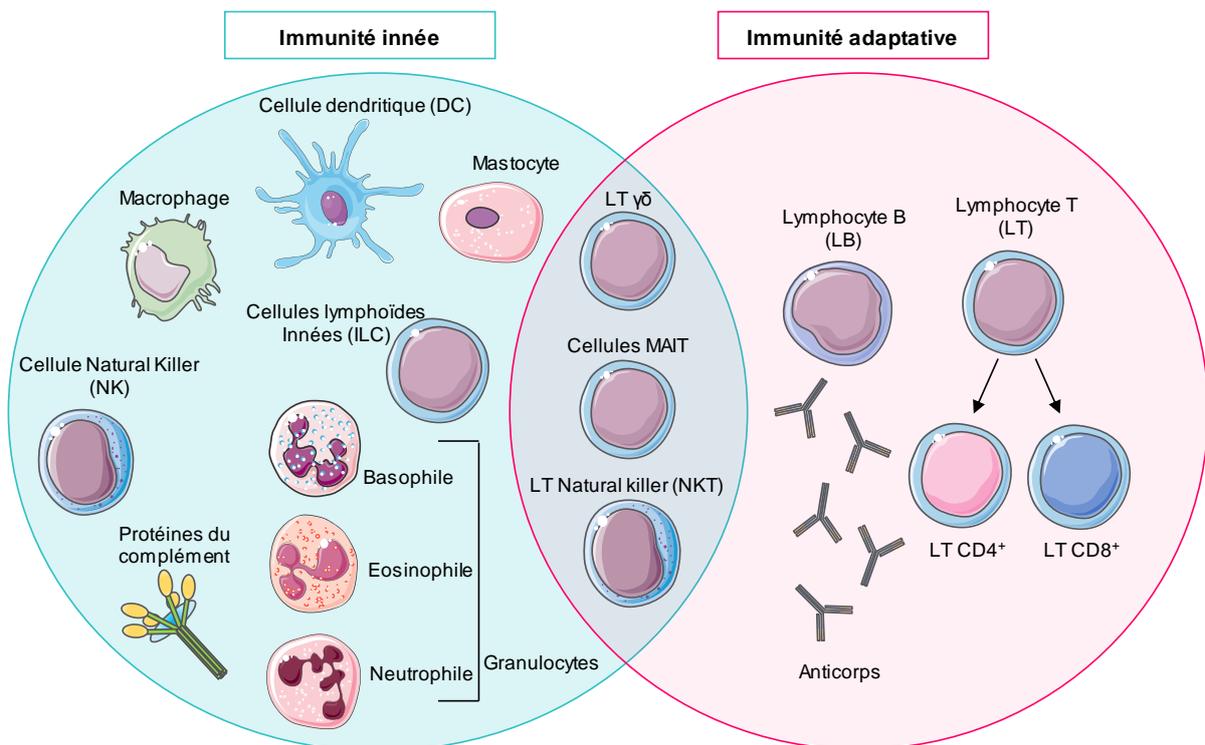
**Figure 6.** La résistance à l'insuline induite après une infection est un processus adaptatif (Chawla et al., 2011).

Chez les mammifères, les cellules de l'immunité innée (comme les neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques) et de l'immunité adaptative (lymphocytes B et lymphocytes T) utilisent de grandes quantités de glucose et de lipides suite à leur activation. Pour les lymphocytes B et les lymphocytes T par exemple, la glycolyse est indispensable à la prolifération clonale. La glycolyse fournit également les éléments nécessaires à l'activation et à la prolifération des macrophages. Les besoins énergétiques du système immunitaire activé sont donc principalement basés sur l'utilisation du glucose (Palmer et al., 2015). Suite à une infection bactérienne, l'activation de l'immunité innée et le relargage de cytokines pro-inflammatoires vont induire un état de résistance à l'insuline dans les tissus métaboliques tels que le foie, le muscle et le tissu adipeux afin de mobiliser les ressources nécessaires aux cellules immunitaires pour combattre l'infection. L'insulino-résistance qui en résulte augmente la néoglucogenèse dans le foie et diminue le stock de glucose disponible dans le muscle. Ces changements vont avoir pour conséquence une augmentation du taux de glucose circulant qui va pouvoir être utilisé par les cellules de l'immunité innée et adaptative pour leur propre métabolisme. En

parallèle, l'insulino-résistance au niveau du tissu adipeux (TA) augmente la lipolyse et diminue la lipogenèse, ce qui entraîne le relargage d'acides gras libres par les adipocytes pour alimenter les besoins métaboliques des cellules immunitaires. Dans ce contexte, la résistance à l'insuline périphérique est un mécanisme adaptatif permettant au système immunitaire de mobiliser l'énergie nécessaire pour combattre l'infection.

## 2.2 Introduction générale au système immunitaire

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont montré qu'au cours de l'obésité et des désordres cardiométaboliques associés, la composition du système immunitaire était fortement altérée. Le système immunitaire constitue l'ensemble des cellules et des molécules qui concourent afin de prévenir ou d'éradiquer les infections mais également de protéger l'organisme contre le développement de cellules tumorales. Il est capable de reconnaître et d'éliminer les pathogènes d'origine bactérienne, virale, parasitaire et fongique. Pour cela, l'organisme dispose de deux systèmes complémentaires : l'immunité innée et l'immunité adaptative dont les principaux acteurs sont présentés dans la **Figure 7**.



**Figure 7.** Les acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

Le système immunitaire inné comporte notamment les protéines de la cascade du complément, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les macrophages et les cellules

*dendritiques (DCs), les mastocytes, les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les cellules de l'immunité adaptative sont constituées des lymphocytes B (LB) produisant des anticorps et des lymphocytes T (LT), majoritairement CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. A l'interface entre les deux systèmes se trouvent les LT non conventionnels : les lymphocytes T $\gamma\delta$ , les cellules MAIT (mucosal-associated invariant T cells) et les cellules T natural killer (NKT). Adapté de (Dranoff, 2004).*

Suivant une première rencontre avec un organisme pathogène, la réponse immunitaire innée va tout d'abord se mettre en place lors de la reconnaissance de signaux de danger. Cette première réponse est immédiate, non spécifique de l'agent pathogène et sans mémoire immunitaire. Dans un second temps, la réponse adaptative se met en place. Celle-ci est spécifique de l'antigène ; les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes, expriment à leur surface des récepteurs capables de reconnaître spécifiquement un déterminant antigénique. Suite à cette première rencontre avec l'antigène, l'immunité adaptative va générer une réponse mémoire. Une nouvelle exposition à un organisme étranger déjà rencontré aura pour conséquence de réactiver les cellules mémoires, permettant une réponse plus rapide, amplifiée et souvent plus efficace.

Dans un premier temps, je présenterai de façon générale les principaux acteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative ainsi que leurs altérations au niveau systémique dans l'obésité et les maladies cardiométaboliques en insistant spécifiquement sur les études réalisées chez l'homme. Puis, dans un deuxième temps, un intérêt particulier sera porté aux changements des cellules immunitaires et à l'inflammation au niveau tissulaire (tissu adipeux, foie et muscle) au cours de l'obésité dans des modèles murins et dans des études menées chez l'homme.

### **2.3 Immunité innée**

L'immunité innée représente la première ligne de défense contre les infections. Contrairement à l'immunité adaptative, présente uniquement chez les vertébrés, elle existe dans tous les organismes du règne végétal et animal et se distingue par la rapidité de sa mise en place. L'immunité innée repose notamment sur des mécanismes humoraux : le système du complément, les cytokines et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation et sur des mécanismes cellulaires : les granulocytes (mastocytes, éosinophiles et basophiles), les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les neutrophiles et les cellules lymphoïdes innées (ILC). Ses fonctions majeures sont la reconnaissance des agents infectieux et le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'infection, l'élimination des cellules apoptotiques ou des

complexes immuns grâce à l'activation en cascade du système du complément, l'élimination de corps étrangers (phagocytose) et enfin elle joue un rôle indispensable dans l'activation et la mise en place de l'immunité adaptative grâce à la présentation antigénique par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux lymphocytes T (LT).

### **2.3.1 Les monocytes**

Les monocytes font partie des cellules du système phagocytaire mononucléé. Ces cellules sont issues de précurseurs dans la moelle osseuse et circulent quelques jours avant de migrer vers les tissus où elles se développent en différents types de macrophages. Les monocytes sont caractérisés par leur capacité à phagocyter, à produire des cytokines et à présenter l'antigène. Elles jouent un rôle dans l'homéostasie, la défense immunitaire et la réparation des tissus. Le rôle des monocytes dans l'inflammation a été montré dans plusieurs pathologies (Gordon and Taylor, 2005). En 2010, un groupe d'experts propose une nomenclature officielle pour les sous-populations de monocytes sanguins chez l'homme. Cette nomenclature est basée sur l'expression des marqueurs de surface CD14 et CD16 (Fc $\gamma$ RIII) et distingue 3 sous-populations de monocytes : les monocytes classiques CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> (MC), les monocytes intermédiaires CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> (MI) et les monocytes non classiques CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> (MNC) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Ces cellules possèdent des profils d'expression de chimiokines distincts qui pourraient refléter des propriétés de recrutement différentes. Dans le contexte de l'obésité et des comorbidités associées, des études cliniques ont montré des corrélations entre le nombre de monocytes sanguins et des facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'IMC, le tour de taille, le taux de HDL cholestérol et le taux de triglycérides (Waterhouse et al., 2008). D'autres études ont également mis en évidence que le nombre de monocytes circulant était prédictif du risque cardiovasculaire (Berg et al., 2012; Rogacev et al., 2012; Waterhouse et al., 2008).

Notre équipe s'est intéressée plus précisément au rôle des 3 sous-populations de monocytes circulants après perte de poids dans l'obésité et le diabète (Poitou et al., 2011). Chez les sujets obèses, cette étude a montré une augmentation de la fréquence et du nombre absolu des deux sous-populations de monocytes exprimant le marqueur CD16 (MI et MNC) par rapport à des sujets minces. Ces deux sous-populations sont positivement corrélées avec des paramètres de corpulence (IMC, masse grasse), des paramètres glycémiques (glycémie à jeun, insuline et HOMA-IR) et la CRP. La perte de poids induite après un bypass gastrique Roux-en-Y entraîne une diminution de la fréquence de ces deux populations monocytaires. Plus récemment, une autre étude de l'équipe s'est intéressée aux fonctions des MC, MI et MNC dans l'inflammation

de bas-grade liée à l'obésité. Ce travail montre le phénotype pro-inflammatoire des monocytes dans l'obésité humaine (Devèvre et al., 2015).

### **2.3.2 Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) dites professionnelles et jouent un rôle clé dans la mise en place de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces cellules expriment fortement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et des molécules de co-stimulation qui vont leur permettre d'activer les LT naïfs. Les DCs sont spécialisées dans la capture, le transport, l'apprêtement et la présentation de l'antigène aux LT et jouent un rôle essentiel dans l'orientation de la réponse immunitaire des LT helper (Th1, Th2...) et dans l'induction de la tolérance T (Kapsenberg, 2003; Mildner and Jung, 2014).

En fonction de leur localisation, les DCs ont une ontogénie et des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles bien distinctes. Depuis leur première description par Ralph Steinman en 1973 (Steinman and Cohn, 1973) leur présence a été rapportée dans le sang, les organes lymphoïdes et les tissus non lymphoïdes, et au cours des années, différentes nomenclatures ont été utilisées pour tenter de les classer. Dans le sang, les DCs peuvent être divisées en deux grandes sous-populations qui sont issues de précurseurs différents : les DCs myéloïdes (mDCs, également appelées conventionnels ou classiques) et les DCs plasmacytoïdes (pDCs).

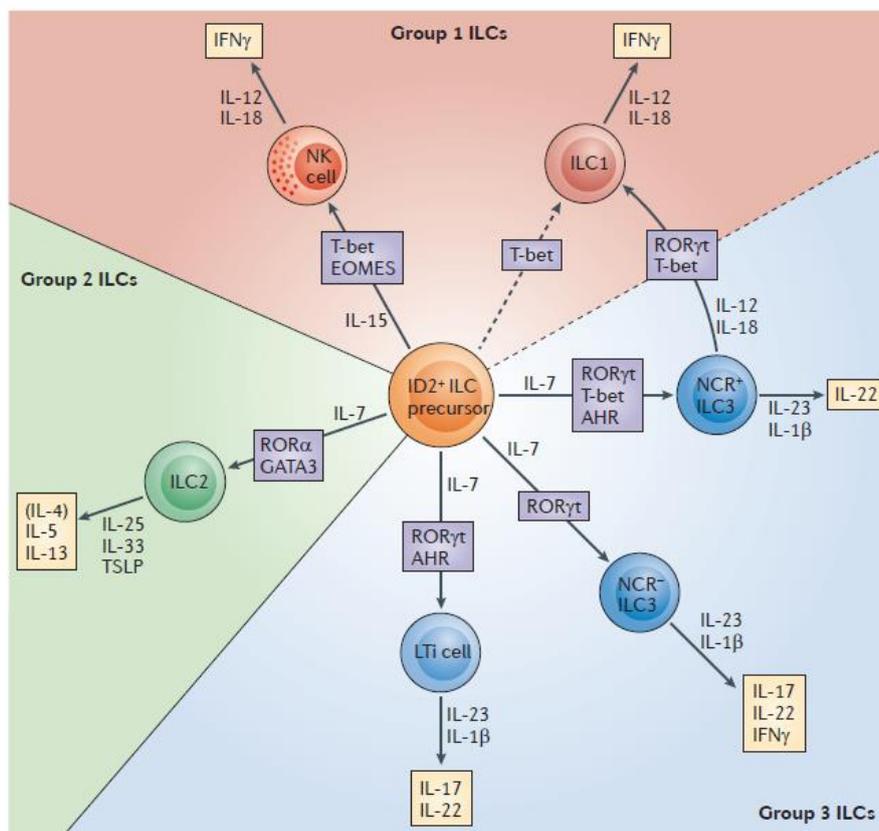
Les mDCs expriment le marqueur CD11c et constituent la population majoritaire de DCs circulants. Cette population regroupe les mDC1 et les mDC2 qui expriment les récepteurs membranaires CD1c (BDCA-1) et CD141 (BCDA-3) respectivement (Mildner and Jung, 2014).

Les pDCs se distinguent des mDC par l'expression des marqueurs de surface CD123 (IL-3R), CD303 (BDCA-2) et CD304 (neuropiline) (Colonna et al., 2004). Chez l'homme et la souris, ils représentent 0,2 à 0,8% des leucocytes circulants. Les pDC sont rares dans les tissus périphériques sains mais sont rapidement recrutés en cas d'inflammation. Les pDCs expriment de faibles taux de CMH de classe II et sont essentiellement spécialisées dans l'immunité anti-virale. En effet, ces cellules expriment les TLR-7 et TLR-9 et ont la capacité de produire de très grandes quantités d'interférons de type I en réponse à un antigène viral (Liu, 2005; Siegal et al., 1999).

Chez l'homme, notamment en raison de leur faible abondance et de leurs similarités avec les macrophages (expression du marqueur CD11c), peu d'études s'intéressent aux DCs dans l'obésité humaine. Une étude montre cependant la présence et l'accumulation de DCs CD11c<sup>+</sup> dans le TA et le sang de souris et de sujets obèses qui pourraient jouer un rôle dans la résistance à l'insuline associée à l'obésité (Wu et al., 2010). Récemment, une autre étude suggère également dans une étude chez la souris et chez l'homme que les DCs pourraient être d'importants régulateurs de l'inflammation dans le tissu adipeux en orientant une réponse de type Th17 dans le contexte de la résistance à l'insuline associée à l'obésité (Bertola et al., 2012).

### 2.3.3 Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) représentent une population de cellules nouvellement décrite et sont des effecteurs importants de l'immunité innée, notamment par leur rôle dans le remodelage tissulaire (Spits et al., 2013). Les ILC sont définies par 3 principales caractéristiques : l'absence de récepteurs à l'antigène, l'absence de marqueurs phénotypiques myéloïdes ou dendritiques et enfin une morphologie de type lymphoïde. Les ILC possèdent une classification complexe et sont classées en 3 groupes en fonction des facteurs de transcription qu'elles expriment et de leur profil cytokinique (**Figure 8**).



**Figure 8.** *Classification des cellules lymphoïdes innées (ILC) en fonction de leurs caractéristiques fonctionnelles (Spits et al., 2013).*

On distingue une catégorie d'ILC cytotoxiques, les cellules Natural Killer (NK) et des ILC de type « helper » représentés par les ILC1, ILC2 et ILC3 (Eberl et al., 2015; Spits et al., 2013). Le premier groupe d'ILC comprend les cellules NK et les ILC1 qui ont la capacité de produire de l'IFN- $\gamma$  et qui expriment le facteur de transcription T-bet. Le groupe 2 comprend les ILC2 qui se distinguent par l'expression du facteur de transcription GATA-3 et la production de cytokines de type Th2 : IL-4, IL-5 et IL-13, ces cellules ont besoin d'IL-7 pour leur développement. Enfin, le groupe 3 inclue les ILC3 et les cellules inductrices du tissu lymphoïde (LTi) : ces cellules expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et sont capables de sécréter de l'IL-17A et/ou de l'IL-22, des cytokines impliquées dans l'homéostasie des muqueuses et dans la défense.

Chez l'homme, peu d'études explorent les changements dans les sous-populations d'ILC dans le sang. En revanche, plusieurs études rapportent la présence d'ILC, notamment d'IL2 et d'ILC1, dans le tissu adipeux (TA) obèse. Une étude montre notamment la diminution de la sous-population d'ILC2 chez les sujets obèses (Brestoff et al., 2015). Les ILC2 joueraient un rôle dans l'induction du TA beige et limiteraient l'adiposité chez les souris obèses (Brestoff et al., 2015). Récemment, une équipe a caractérisé les ILC1 dans le TA de souris et de sujets obèses par rapport à des contrôles minces (Boulenouar et al., 2017). Les auteurs montrent dans un premier temps que les ILC1 sont enrichies dans le TA omental par rapport aux autres tissus et au sang à la fois chez l'homme et chez la souris. Dans l'obésité, ils montrent que la fréquence des ILC1 est diminuée dans le TA humain et augmente 18 mois après perte de poids induite par la chirurgie bariatrique. En utilisant un modèle murin, ils démontrent qu'à l'état basal, les ILC1 ont une activité cytolytique vis-à-vis des macrophages du TA. En revanche, chez la souris obèse (sous régime hyperlipidique), les ILC1 perdent leur fonction cytolytique et joueraient donc un rôle dans le maintien et la régulation de l'homéostasie des macrophages du TA.

De manière générale, les ILC sembleraient jouer un rôle important dans la régulation de l'obésité (Yang et al., 2016).

## **2.4 Immunité adaptative**

L'immunité adaptative se met en place en général 5 à 6 jours après une exposition antigénique. Elle est composée d'une réponse à médiation cellulaire essentiellement médiée par lymphocytes

T (LT) ainsi qu'une réponse à médiation humorale qui repose sur la production d'anticorps par lymphocytes B (LB). L'immunité adaptative comporte 4 caractéristiques : la spécificité antigénique, la diversité, la mémoire immunologique et la distinction entre le soi et le non-soi.

En clinique, le nombre de leucocytes circulants est facilement mesurable en routine et plusieurs études ont montré que le nombre de lymphocytes était positivement corrélé avec l'IMC (Pecht et al., 2014). Leur nombre est également augmenté dans d'autres maladies cardiométaboliques comme le syndrome métabolique, le diabète de type 2 les maladies coronariennes (Dixon and O'Brien, 2006; Laurson et al., 2011).

#### **2.4.1 Les lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont des médiateurs importants de la réponse humorale. Ces cellules dérivent de précurseurs lymphoïdes et sont caractérisées par l'expression d'un récepteur B (BCR). Celui-ci est composé de deux chaînes lourdes identiques d'immunoglobulines (Ig) qui se déclinent en 5 différents isotypes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  et  $\mu$ ) et de deux chaînes légères ( $\kappa$  et  $\lambda$ ) associées à des co-récepteurs. Le complexe BCR, en association avec ses co-récepteurs, reconnaît l'antigène par sa structure tridimensionnelle et entraîne l'activation des cellules B, leur différenciation en plasmablastes et en plasmocytes producteurs d'anticorps (Dumoitier et al., 2015; Vaughan et al., 2011). Les anticorps sécrétés ont pour rôle la neutralisation et l'élimination des microbes et toxines présents dans le sang et la lumière des muqueuses telles que celle du tractus gastro-intestinal.

Dans le contexte de l'obésité, en dehors des numérations lymphocytaires totales, peu d'études s'intéressent aux lymphocytes B chez l'homme. Cependant, une étude récente a analysé le phénotype et la fonction des LB circulants chez des sujets obèses par rapport à des sujets minces en réponse à une vaccination contre le virus influenza (Frasca et al., 2016). Cette étude montre que le phénotype des LB est altéré dans l'obésité humaine avec une augmentation des LB mémoires activés, mais également que la fonction des LB est modifiée avec une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et d'IL-6 et moins d'IL-10. Cette étude montre également une altération de l'efficacité vaccinale chez les sujets obèses par rapport aux sujets minces.

### 2.4.2 Les lymphocytes T

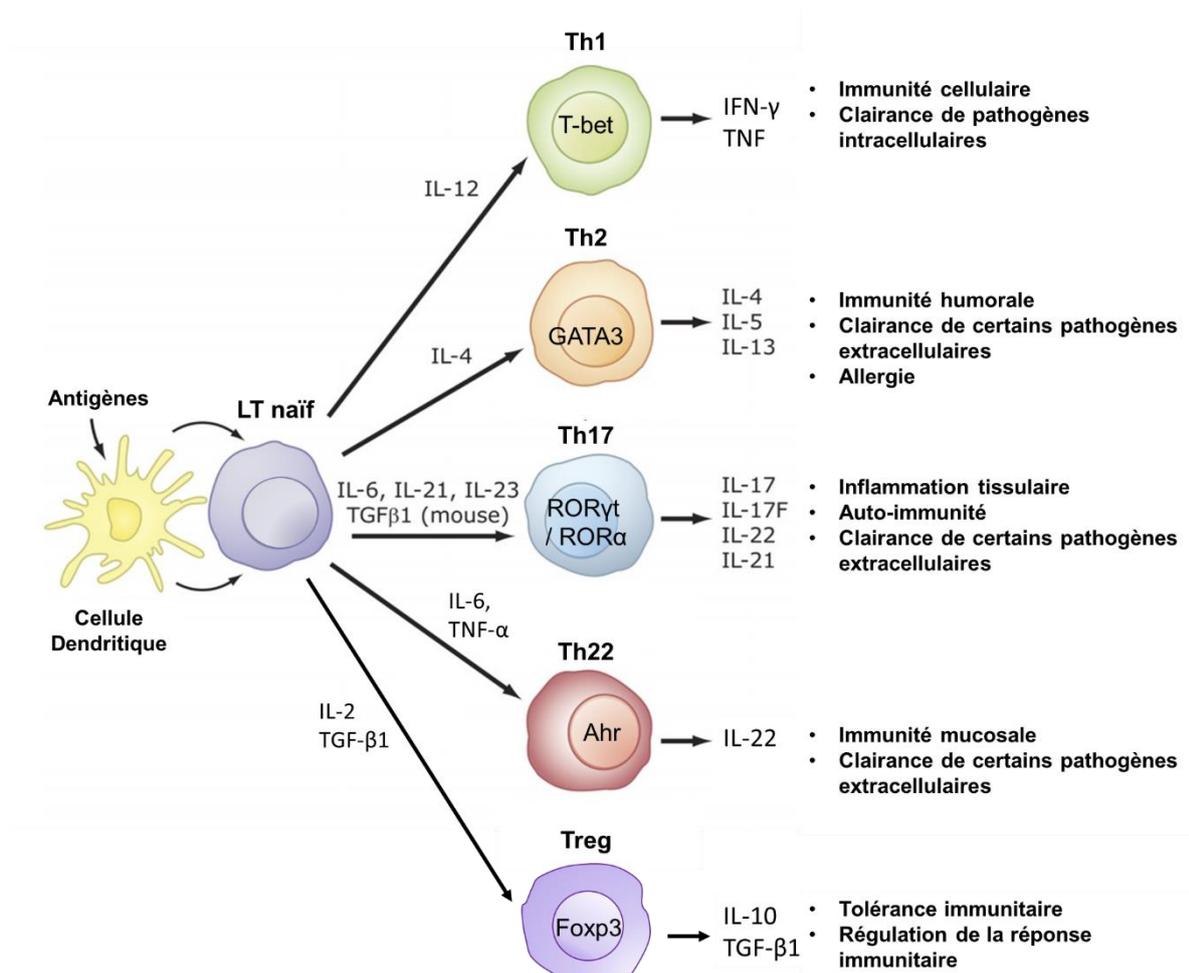
Une des caractéristiques des lymphocytes T est la restriction par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Chaque lymphocyte T exprime à sa surface un récepteur à l'antigène des cellules T unique appelé TCR associé à un complexe protéique composé de molécules CD3 permettant la transduction du signal suite à la reconnaissance d'un antigène par le TCR. Celui-ci est composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  (TCR- $\alpha\beta$ ) ou d'une chaîne  $\gamma$  associée à une chaîne  $\delta$  (TCR- $\gamma\delta$ , 1 – 10% du répertoire du TCR (Girardi, 2006)). Chaque chaîne contient une région variable (V) et une région constante (C). La diversité antigénique du TCR est obtenue lors de la maturation dans le thymus par la recombinaison somatique de segments géniques variables V, de jonction J et pour la chaîne  $\beta$ , de segment de diversité (D), codant la région variable du TCR. Cette recombinaison permet l'obtention d'un répertoire potentiel total estimé entre  $10^{15}$  et  $10^{20}$  clones de TCR- $\alpha\beta$ , générant une grande diversité et permettant la reconnaissance de millions d'antigènes (Laydon et al., 2015; Nikolich-Zugich et al., 2004). Après cette étape, seuls les LT exprimant un TCR fonctionnel capable de reconnaître une molécule de CMH (restriction au CMH) sont sélectionnés. Enfin, à l'issue de ces étapes, le répertoire du TCR disponible est restreint et sa diversité réelle évolue dans le temps et reste encore inconnue. On distingue deux principaux types de LT $\alpha\beta$  : les LT CD4<sup>+</sup> dits auxiliaires (ou helper, Th) qui reconnaissent des peptides antigéniques présentés par le CMH de classe II, et les LT CD8<sup>+</sup> dits cytotoxiques qui reconnaissent des peptides présentés par le CMH de classe I.

Les lymphocytes matures naïfs circulent dans le sang et le système lymphatique et résident dans les organes lymphoïdes secondaires. Au sein de ces structures lymphoïdes secondaires, les LT naïfs rencontrent un antigène qui leur est présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA).

#### *Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>*

Le devenir des LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires est déterminé par une série d'évènements composés de 3 signaux (Kapsenberg, 2003) : le 1er signal résulte de la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR et détermine la spécificité de la réponse antigénique ; le 2<sup>ème</sup> signal est un signal de co-stimulation et implique notamment l'interaction de CD28 à la surface du LT naïf avec ses ligands CD80 et CD86 exprimés à la surface de la cellule présentatrice d'antigène (généralement une cellule dendritique) ; enfin, le 3<sup>ème</sup> signal est un signal de polarisation, il dépend de l'environnement cytokinique et promeut le développement des différentes sous-

populations de LT auxiliaires. Une fois activés, les différentes sous-populations de LT vont exercer des fonctions effectrices et sécréter des médiateurs spécifiques (**Figure 9**).



**Figure 9.** Influence de l'environnement cytokinique sur la différenciation des principales sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires et principales fonctions (Jetten, 2009).

Dans le diabète de type-2, deux études ont observé une diminution de la fréquence des lymphocytes T régulateurs (Tregs) dans le sang au profit des cellules Th1 et Th17 pro-inflammatoires (Jagannathan-Bogdan et al., 2011; Zeng et al., 2012). Cela suggère que les lymphocytes T circulants subissent un « switch » pro-inflammatoire et qu'il existe une altération dans la balance Th1-Th17/Tregs dans le sang des sujets DT2.

Dans le contexte de l'obésité, une équipe a quantifié par cytométrie en flux les populations de LT dans le sang périphérique de sujets obèses morbides par rapport à des sujets minces (van der Weerd et al., 2012). Leur étude montre une augmentation du nombre de LT CD4<sup>+</sup> accompagnée d'une augmentation des Tregs CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> et des lymphocytes Th2 chez les

sujets obèses morbides par rapport aux sujets contrôles minces alors que les LT Th1 et Th17 ne sont pas altérés en nombre absolu.

Dans l'obésité humaine, une étude récente a montré une augmentation de la fréquence des lymphocytes Th22 producteurs d'IL-22 dans le sang de sujets obèses et diabétiques de type 2 par rapport à des sujets contrôles (Zhao et al., 2014) en plus de l'augmentation de la fréquence des cellules Th1 et Th17. De manière intéressante, dans cette étude, le niveau élevé de cellules Th22 est positivement corrélé avec l'HOMA-IR (index de résistance à l'insuline) et permet de distinguer les sujets obèses dits métaboliquement sains des sujets diabétiques alors qu'il n'y a pas de corrélation entre l'insulino-résistance et la fréquence des Th1 ou Th17 circulants.

### ***Les Lymphocytes T CD8<sup>+</sup>***

Les LT CD8<sup>+</sup> (cytotoxiques) jouent un rôle important notamment dans l'immunité anti-virale et l'immunité anti-tumorale par leur action cytolytique directe sur les cellules à éliminer (production de molécules cytotoxiques : granzyme et perforine ou apoptose induite par Fas-Fas ligand) et *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). De la même façon que les LT CD4<sup>+</sup>, après maturation dans le thymus, les LT CD8<sup>+</sup> subissent une succession d'évènements leur permettant d'acquérir leurs fonctions effectrices. Le premier signal est induit par la reconnaissance par le TCR de l'antigène présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Le second signal implique les molécules de co-stimulation (CD28 à la surface des LT et CD80/CD86 à la surface des APCs) en présence ou non de cytokines inflammatoires (signal 3). Cette série de signaux induit l'activation, la prolifération et la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> qui acquièrent leurs fonctions cytolytiques.

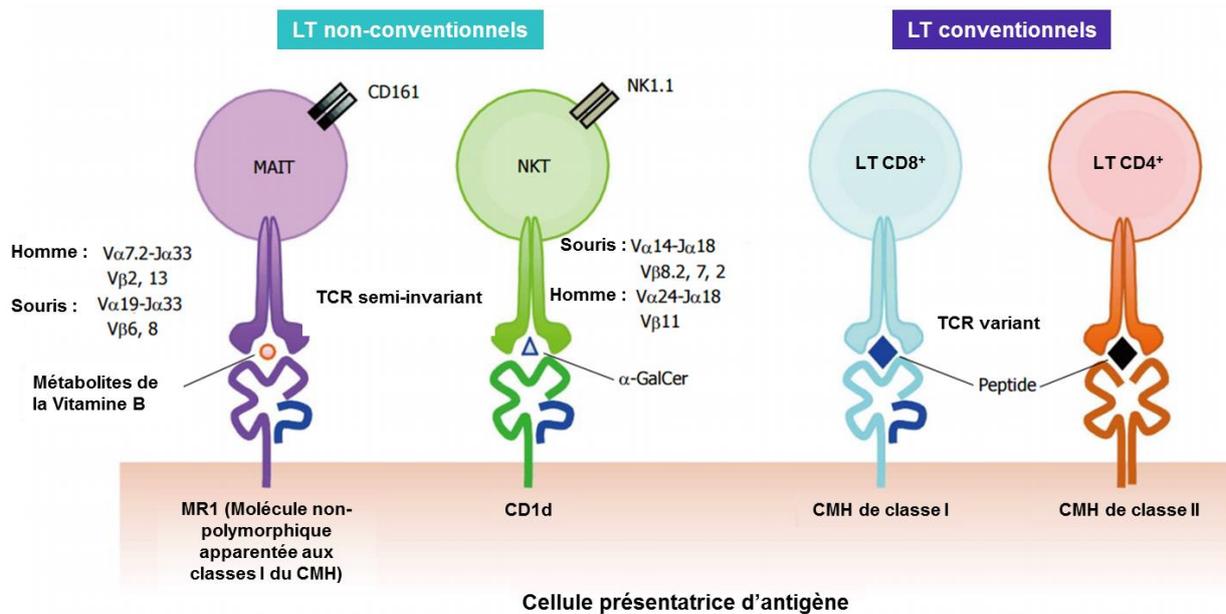
## **2.5 A l'interface entre l'immunité innée et adaptative**

A l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, on retrouve des sous-populations particulières de lymphocytes T qui se distinguent par leur caractère non conventionnel, c'est-à-dire une faible diversité de leur récepteur à l'antigène et pour certaines populations, leur capacité à reconnaître des antigènes présentés par des molécules de CMH non classiques. Ces cellules comprennent les cellules T $\gamma\delta$ , qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit, les cellules T natural killer (NKT) et les cellules MAIT (Mucosal-associated invariant T cells) (Godfrey et al., 2015).

### 2.5.1 Les cellules NKT

Les cellules NKT sont une sous-population de  $LT\alpha\beta$  non-conventionnels. Contrairement aux LT conventionnels qui reconnaissent des complexes CMH-peptide, les cellules NKT reconnaissent des peptides présentés par CD1d, une molécule non-polymorphique apparentée aux molécules de CMH I et qui est majoritairement exprimée par les DCs et les autres CPAs (Tard et al., 2015). Comme leur nom l'indique, les NKT sont apparentés aux cellules NK de l'immunité innée avec lesquelles elles partagent des caractéristiques phénotypiques comme l'expression du marqueur CD161, mais ces cellules expriment également le TCR, caractéristique des LT. On distingue 3 groupes de cellules NKT en fonction de leur spécificité antigénique et de leur TCR : les NKT invariants (iNKT), les NKT de type II et les lymphocytes « NKT-like ». Chez l'homme, les iNKT sont majoritaires et expriment une chaîne  $\alpha$  semi-invariante du TCR ( $V\alpha 24J\alpha 18$ ) associée à un nombre limité de chaînes  $\beta$  (le plus fréquemment  $V\beta 8$ ) qui leur permet de reconnaître des glycosphingolipides présentés par CD1d (**Figure 10**) (Sugimoto et al., 2016). Ces cellules ont la capacité de produire des quantités importantes de cytokines (notamment l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$ ) après stimulation de leur TCR.

De la même façon que les sous-populations de DCs, les iNKT sont difficiles à étudier chez l'homme en raison de leur faible proportion (environ 0.1% des lymphocytes dans le sang), cependant elles peuvent être identifiées grâce à des tétramères CD1d chargés avec le glycosphingolipide d'éponge marine  $\alpha$ -galactocéramide ( $\alpha$ -GalCer) et/ou des anticorps anti- $V\alpha 24J\alpha 18$  qui permettent leur étude chez l'homme. En 2009, Lynch *et al.* (Lynch et al., 2009) décrivent un enrichissement des cellules iNKT avec un fort potentiel cytotoxique et une production rapide de cytokines dans le tissu adipeux omental par rapport aux autres organes ou au sang chez l'homme (10% des LT). Cette même étude montre une diminution des iNKT chez les sujets sévèrement obèses par rapport à des sujets minces. En 2012, la même équipe s'intéresse à nouveau aux iNKT et observe une diminution de cette population cellulaire dans le sang de sujets obèses par rapport à des contrôles minces (Lynch et al., 2012). De manière intéressante, la fréquence des iNKT circulants augmente après perte de poids induite par un bypass gastrique Roux-en-Y bien que ces cellules soient toujours en proportion plus faibles que les contrôles. Chez la souris, l'obésité induite par un régime riche en gras (HFD) entraîne la diminution des iNKT dans le TA. Dans ce modèle murin, il est suggéré que les iNKT pourraient avoir un rôle régulateur sur la prise de poids et le statut métabolique au cours de l'obésité.

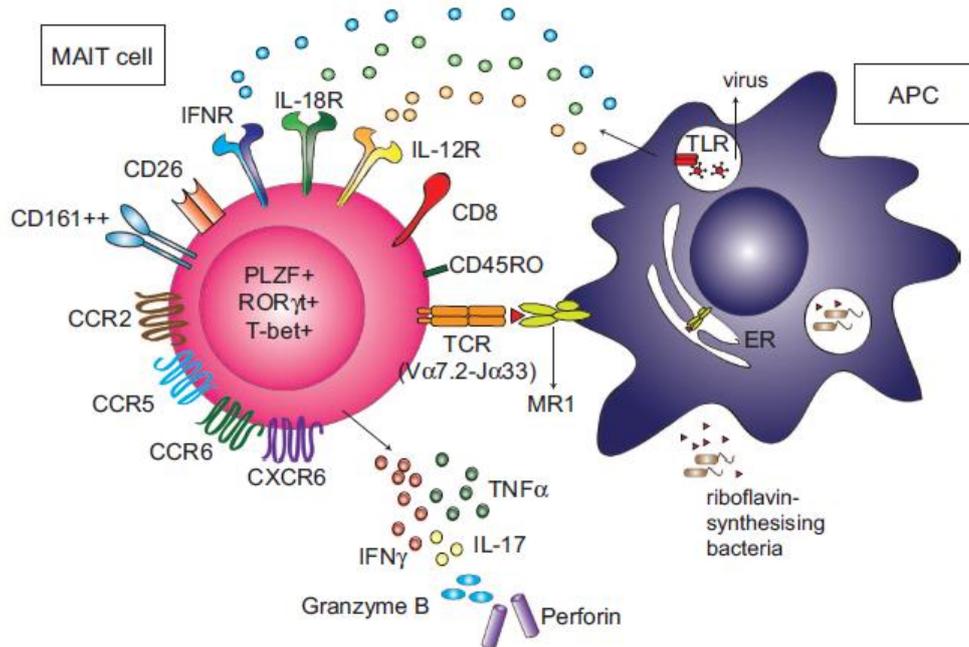


**Figure 10.** Comparaison des récepteurs T (TCR) et des différentes molécules présentatrices d'antigène parmi les LT conventionnels et non conventionnels (adapté de (Sugimoto et al., 2016)).

### 2.5.2 Les lymphocytes MAIT

Comme les cellules NKT, les lymphocytes MAIT (Mucosal-associated invariant T cells) constituent une population de lymphocytes T non conventionnels d'abord décrite dans la muqueuse intestinale (Treiner et al., 2003), mais également présente dans le sang, les poumons, le tissu adipeux (Carolan et al., 2015; Magalhaes et al., 2015a) et en abondance dans le foie (Dusseaux et al., 2011; Kurioka et al., 2016; Tang et al., 2013). Cette sous-population de LT a été décrite pour la première fois par l'équipe d'Olivier Lantz en 1999 (Tilloy et al., 1999) et se distingue par l'expression d'un récepteur des cellules T (TCR) semi-invariant. Chez l'homme, il s'agit de la chaîne TCR Vα7.2-Jα33 invariante (Vα19-Jα33 chez la souris) associée à un nombre limité de segments Vβ (principalement Vβ2 et Vβ13 chez l'homme, et Vβ6 et Vβ8 chez la souris) (**Figure 10**). Ce TCR reconnaît spécifiquement des intermédiaires du métabolisme de la vitamine B2 (riboflavine). Ces molécules sont produites par de nombreuses bactéries et sont présentées aux lymphocytes MAIT par MR1 (*MHC-related protein 1*), une molécule monomorphique apparentée au CMH de classe I (Eckle et al., 2015; Franciszkiewicz et al., 2016; Kjer-Nielsen et al., 2012; McWilliam et al., 2015) (**Figure 11**). Les cellules MAIT se caractérisent par l'expression du facteur de transcription PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), particularité qu'elles partagent avec les cellules NKT (Martin et al., 2009).

Les lymphocytes MAIT ont la particularité de répondre rapidement à un challenge antigénique et ont la capacité de produire des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , le granzyme B, la perforine et l'IL-17. Ces cellules peuvent être activées par plusieurs espèces de bactéries gram négatives et gram positives (Le Bourhis et al., 2010) et sont absentes chez les souris axéniques (Treiner et al., 2003). L'ensemble de ces données suggère un rôle important des cellules MAIT dans l'immunité anti-bactérienne (Gold et al., 2010; Napier et al., 2015).



**Figure 11.** Phénotype des cellules MAIT et mécanismes d'activation (Kurioka et al., 2016).

Les lymphocytes MAIT circulants sont diminués chez les patients atteints de maladies infectieuses (pneumopathie, tuberculose, virus de l'immunodéficience humaine (VIH), choléra) (Howson et al., 2015), dans plusieurs maladies auto-immunes (sclérose en plaque, lupus, polyarthrite rhumatoïde (Hinks, 2016)) et dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD ; maladie de Crohn et colite ulcéreuse) (Serriari et al., 2014; Treiner, 2015)) (Sugimoto et al., 2016). Les cellules MAIT sont également diminuées avec l'âge (Hiejima et al., 2015; Lee et al., 2014; Novak et al., 2014) et cette diminution s'accompagne de perturbations cytokiniques (augmentation de la production d'IL-4 et de la diminution du ratio IFN- $\gamma$ /IL-4) et d'altérations phénotypiques (diminution de la proportion de MAIT CD8<sup>+</sup> au profit des MAIT CD4<sup>+</sup> avec l'âge) (Lee et al., 2014).

Dans le contexte des maladies métaboliques, une étude récente du laboratoire en collaboration avec l'équipe d'Agnès Lehuen (Institut Cochin, Paris) s'est intéressée aux lymphocytes MAIT

circulants dans une cohorte de patients obèses, obèses diabétiques et diabétiques non obèses. Cette étude montre une diminution significative de la fréquence des cellules MAIT parmi les lymphocytes T totaux chez les patients obèses diabétiques et non diabétiques ainsi que chez les sujets diabétiques non obèses par rapport à des sujets contrôles minces. La fréquence des cellules MAIT circulantes dans l'ensemble de la cohorte est négativement corrélée avec l'IMC (Magalhaes et al., 2015a). Parmi les patients obèses diabétiques, les cellules MAIT présentent une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation CD25<sup>+</sup> (IL-2R) et CD69<sup>+</sup> par rapport aux contrôles, suggérant un impact de l'obésité et du DT2 sur l'état d'activation des cellules MAIT. L'étude du profil cytokinique après stimulation *ex vivo* des LT dans les trois groupes de patients montre une augmentation de la production des cytokines de type Th1 et Th17 par les cellules MAIT dans le sang. De plus, une association négative est observée entre la fréquence des MAIT et la production d'IL-17 par les MAIT, comme déjà montré dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Serriari et al., 2014).

La même année, une autre étude, menée par une équipe Irlandaise qui s'intéressait déjà aux cellules iNKT dans l'obésité humaine, a été réalisée chez des adultes et des enfants obèses. Cette deuxième étude confirme les résultats obtenus par notre équipe en montrant une altération des cellules MAIT dans l'obésité. Chez l'adulte, les cellules MAIT circulantes sont diminuées avec une production d'IL-17 augmentée par rapport aux sujets minces (Carolan et al., 2015). Cette étude rapporte également une corrélation positive entre la dérégulation des cellules MAIT et la résistance à l'insuline dans les deux groupes (adultes et enfants).

L'ensemble de ces résultats semblent suggérer un rôle important des cellules MAIT dans les complications associées à l'obésité comme l'insulino-résistance et le diabète de type-2 (Magalhaes et al., 2015b).

### **3. Inflammation tissulaire dans l'obésité et résistance à l'insuline**

Les études cliniques et expérimentales ont établi un lien fort entre l'inflammation de bas grade et l'insulino-résistance dans l'obésité, la dysfonction pancréatique et les complications cardiovasculaires. Cette inflammation de bas grade résulte en partie de l'accumulation de cellules immunitaires proinflammatoires dans des organes métaboliques tels que le tissu adipeux (TA), le foie, le pancréas, le muscle et même l'intestin (Esser et al., 2014; Gregor and Hotamisligil, 2011; Olefsky and Glass, 2010).

### 3.1 Tissu adipeux

#### 3.1.1 Les macrophages

Les premières études rapportant une accumulation de cellules immunitaires dans le TA ont été publiées en 2003, soit dix ans après les travaux pionniers de Spiegelman reliant inflammation et insulino-résistance dans l'obésité (Hotamisligil et al., 1993). Deux études indépendantes ont en effet montré une accumulation de macrophages F4/80<sup>+</sup> ou CD68<sup>+</sup> dans le tissu adipeux qui est positivement corrélée avec l'adiposité chez des souris obèses mais également des sujets obèses (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Cette infiltration de macrophages, qui représente jusqu'à 40% des cellules totales du TA, est associée à une inflammation et une résistance à l'insuline et serait majoritairement responsable de la production de TNF- $\alpha$  observée dans le TA. Ces premières études soulignent que l'inflammation de bas grade représente un lien important entre obésité et un éventail d'anomalies métaboliques comme l'insulino-résistance et le diabète de type 2. En plus du TNF- $\alpha$ , d'autres cytokines pro-inflammatoires ont également été impliquées, notamment l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$ .

*In vitro*, les macrophages peuvent être polarisés en 2 sous-populations en fonction de l'environnement cytokinique : d'une part, les macrophages dits « classiquement activés », également appelés M1, qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  qui peuvent induire la résistance à l'insuline ; et d'autre part les macrophages dits « alternativement activés » ou M2 qui expriment des gènes tels que Ym1 et qui sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et l'IL-4 (Mosser and Edwards, 2008). Chez la souris rendue obèse par un régime gras (HFD), l'expression des gènes de type M2 est diminuée dans les macrophages du TA et on observe alors l'augmentation de l'expression de gènes codant TNF- $\alpha$  et iNOS, caractéristiques des macrophages M1 (Lumeng et al., 2007). Ces macrophages M1 seraient la principale source de médiateurs inflammatoires dans l'inflammation associée à l'obésité. Chez l'homme, cette classification est moins claire et les populations de macrophages infiltrant le TA humain ne correspondent précisément ni au phénotype M1, ni au phénotype M2. En revanche, dans le modèle murin comme dans le modèle humain, il est établi qu'au cours de l'obésité, les macrophages du TA sont fortement activés et expriment un large panel de gènes qui font pencher la balance vers un phénotype clairement pro-inflammatoire (Lumeng et al., 2007; Wentworth et al., 2010). Les cytokines pro-inflammatoires qu'elles sécrètent, en particulier le TNF- $\alpha$ , ont un impact direct sur la résistance à l'insuline en agissant sur des cellules cibles dans les tissus insulino-sensibles à travers des mécanismes paracrines. En 2014,

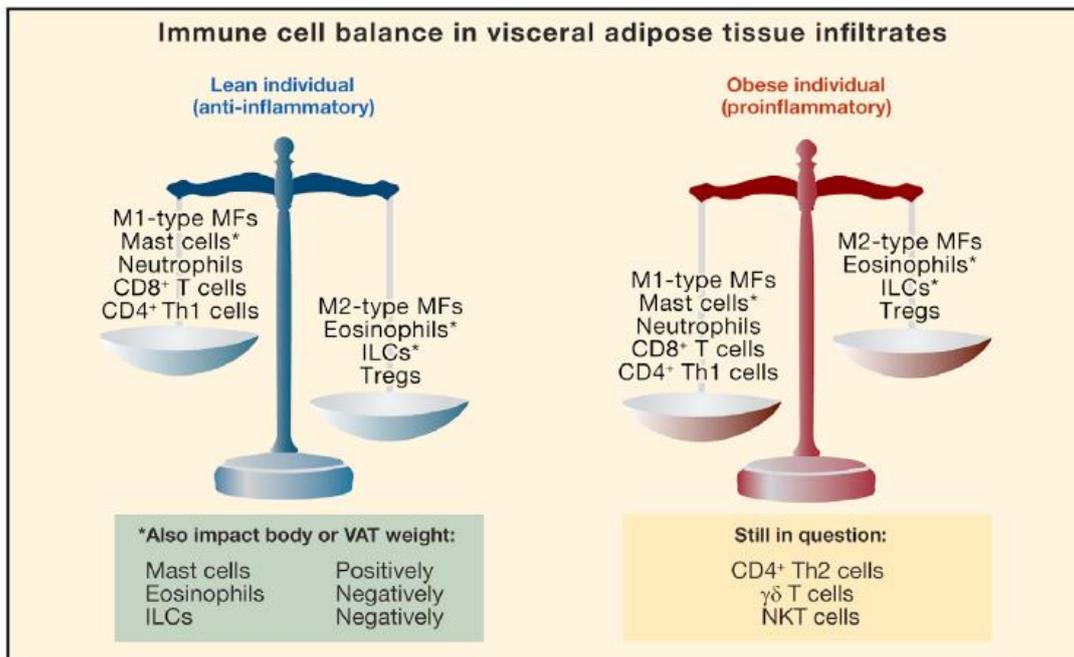
notre équipe a montré une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les macrophages du TA viscéral chez les sujets obèses diabétiques par rapport à des sujets obèses non diabétiques et minces (Dalmas et al., 2014).

### 3.1.2 Les lymphocytes T

Dans la fraction stroma-vasculaire du TA, si les macrophages représentent la population de cellules immunitaires la plus abondante, cela n'exclut pas un rôle de l'immunité adaptative dans l'inflammation et la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Un an après la découverte de l'infiltration de macrophages dans le TA, une autre équipe a montré par immunofluorescence la présence de LT CD3<sup>+</sup> dans le TA (Robker et al., 2004). Les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Nishimura et al., 2009) et les LT CD4<sup>+</sup> Th1 (Winer et al., 2009) induisent une résistance à l'insuline. Dans le TA de souris obèses, les cellules Tregs aux propriétés anti-inflammatoires et régulatrices et les cellules CD4<sup>+</sup> Th2 sont diminuées et jouent un rôle clé dans la modulation des macrophages (Feuerer et al., 2009; Winer et al., 2009).

Chez l'homme, le nombre de lymphocytes T CD3<sup>+</sup> infiltrant le TA est augmenté chez des sujets obèses par rapport à des sujets minces et le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> suit la même augmentation (Duffaut et al., 2009). De la même façon que les macrophages, les LT ont un phénotype pro-inflammatoire dans le TA obèse, la fréquence des LT produisant de l'IFN- $\gamma$  dans le TA humain augmente avec le degré d'adiposité. Récemment, notre équipe a mis en évidence, dans le TA humain obèse, un dialogue pro-inflammatoire entre les macrophages et les cellules T CD4<sup>+</sup> mettant en jeu l'IL-1 $\beta$  et deux cytokines dérivées des cellules T CD4<sup>+</sup> de type Th17, l'IL-17 et l'IL-22. Le pourcentage de cellules Th17 du tissu adipeux des patients obèses est associé positivement au niveau d'HbA1c. De plus, la sécrétion des cytokines impliquées dans cette boucle pro-inflammatoire diminue après une perte de poids induite par la chirurgie bariatrique (Dalmas et al., 2014).

En plus des macrophages et des LT, d'autres composants cellulaires de l'immunité innée et adaptative ont été impliqués dans l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité : les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les ILC de type 2 et les lymphocytes B (**Figure 12**).



**Figure 12.** Altérations des différents types de cellules immunitaires présentes dans le TA au cours de l'obésité (Mathis, 2013).

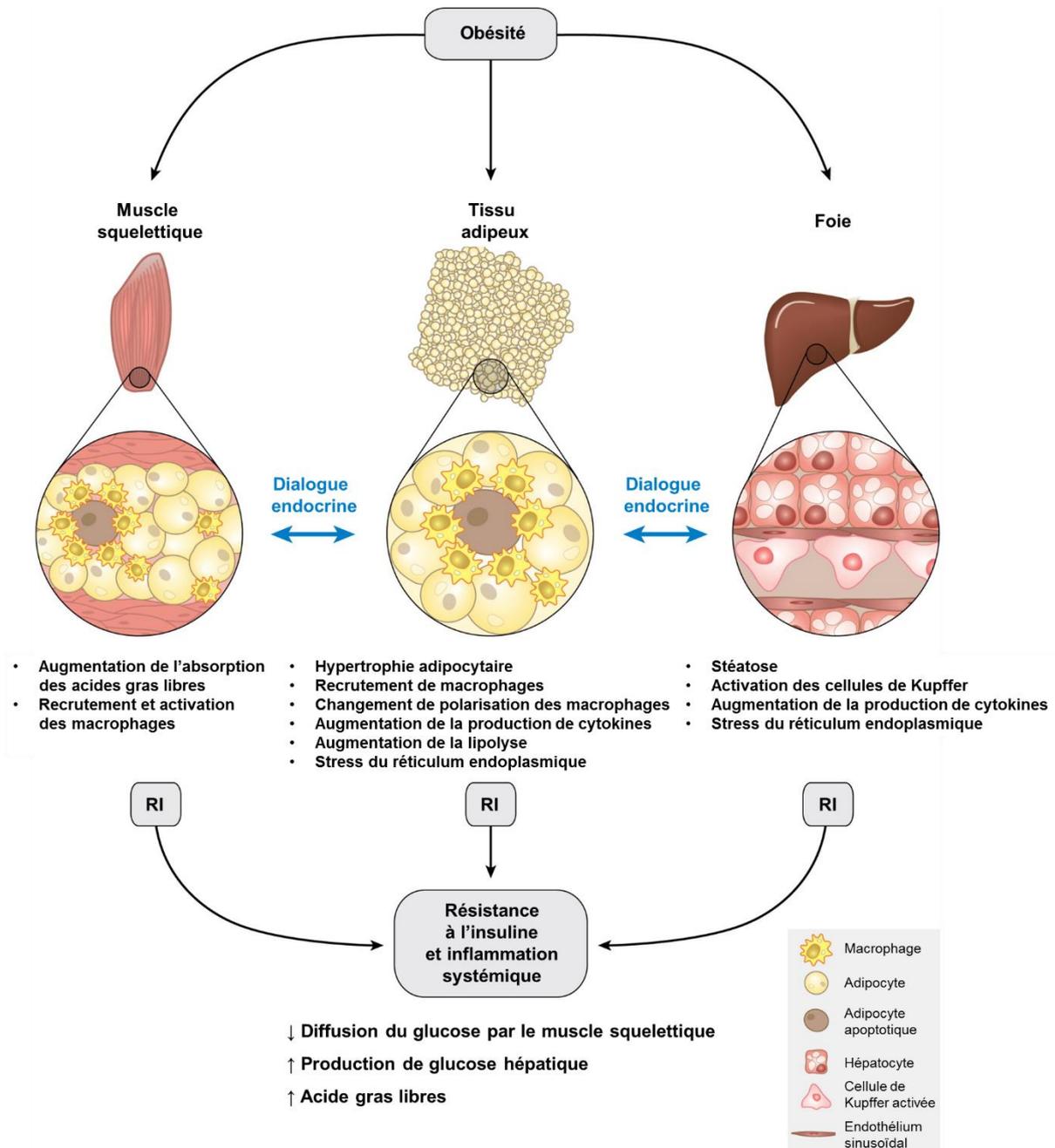
### 3.2 Macrophages et inflammation dans le foie et le muscle

L'obésité est souvent associée à la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et l'inflammation joue un rôle clé dans la progression de cette maladie. Dans l'obésité, la NAFLD et la résistance à l'insuline hépatique sont associées à une augmentation de l'expression et de la production de médiateurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$ . Le foie héberge une population de macrophages résidents appelés les cellules de Kupffer, qui représentent environ 10% des cellules hépatocytaires totales. Contrairement aux macrophages du TA, les cellules de Kupffer ne sont pas augmentées au cours de l'obésité, en revanche leur phénotype est altéré et ces cellules sont activées. Une étude dans un modèle de rat obèse montre que la déplétion des cellules de Kupffer induit une amélioration de la stéatose et de la sensibilité à l'insuline hépatique (Huang et al., 2010). Par le biais de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, les cellules de Kupffer contribuent donc à la résistance à l'insuline dans le foie.

Le muscle représente également une cible majeure de la résistance à l'insuline dans l'obésité et le diabète de type 2. De façon similaire au TA, des études ont rapporté la présence d'un infiltrat de macrophages présentant un phénotype pro-inflammatoire de type M1 dans les muscles squelettiques de souris obèses (Nguyen et al., 2007). Ces macrophages seraient présents notamment dans les dépôts adipeux intermusculaires qui augmentent avec l'obésité. Ces

résultats suggèrent que les macrophages infiltrant le muscle squelettique pourraient également contribuer localement à la résistance à l'insuline.

La **Figure 13** résume les altérations observées dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et le foie au cours de l'obésité et l'impact de ces altérations sur l'inflammation de bas grade et la sensibilité à l'insuline locale et systémique.



**Figure 13.** L'obésité induit des altérations dans les tissus cibles de l'insuline (muscle squelettique, tissu adipeux et foie) ainsi qu'une résistance à l'insuline (RI) et une inflammation locale et systémique (Olefsky and Glass, 2010).

Le tissu adipeux reste l'organe cible dans la pathologie de l'obésité et fait l'objet d'études extensives dans des modèles murins et chez l'homme. Cependant, cela n'exclut pas l'implication d'autres organes dans la physiopathologie de l'obésité : d'autres organes insulino-sensibles comme le foie et les muscles comme décrit précédemment, mais également le pancréas où une accumulation de macrophages dans les îlots pancréatiques a été décrite dans le DT2 (Donath et al., 2010; Ehses et al., 2008) ou bien encore l'hypothalamus où l'obésité induit une résistance à l'insuline locale (Posey et al., 2009).

#### **4. L'intestin grêle, nouvel acteur dans l'obésité**

L'intestin grêle est un organe clé dans la digestion des aliments, l'absorption des nutriments et la production d'hormones en réponse à des composants alimentaires et joue un rôle important dans l'homéostasie glucidique (Hooper and Macpherson, 2010). Situé à l'interface entre le milieu intérieur et la lumière intestinale, l'intestin constitue une barrière physique tenant à distance les microorganismes. L'altération de l'intégrité de cette barrière pourrait permettre le passage d'antigènes alimentaires et de produits bactériens dans la muqueuse intestinale puis dans d'autres tissus (tissu adipeux, foie, cerveau) et induire une activation du système immunitaire local (Winer et al., 2017). Plusieurs études, qui seront présentées dans le chapitre 5, suggèrent un rôle du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance. Chez la souris sous régime gras, ces modifications de la flore bactérienne associées à l'obésité entraînent des altérations de la perméabilité et de l'intégrité de la barrière intestinale (Cani et al., 2008). Ces travaux soulèvent la nécessité d'explorer plus amplement les modifications de l'intestin dans l'obésité.

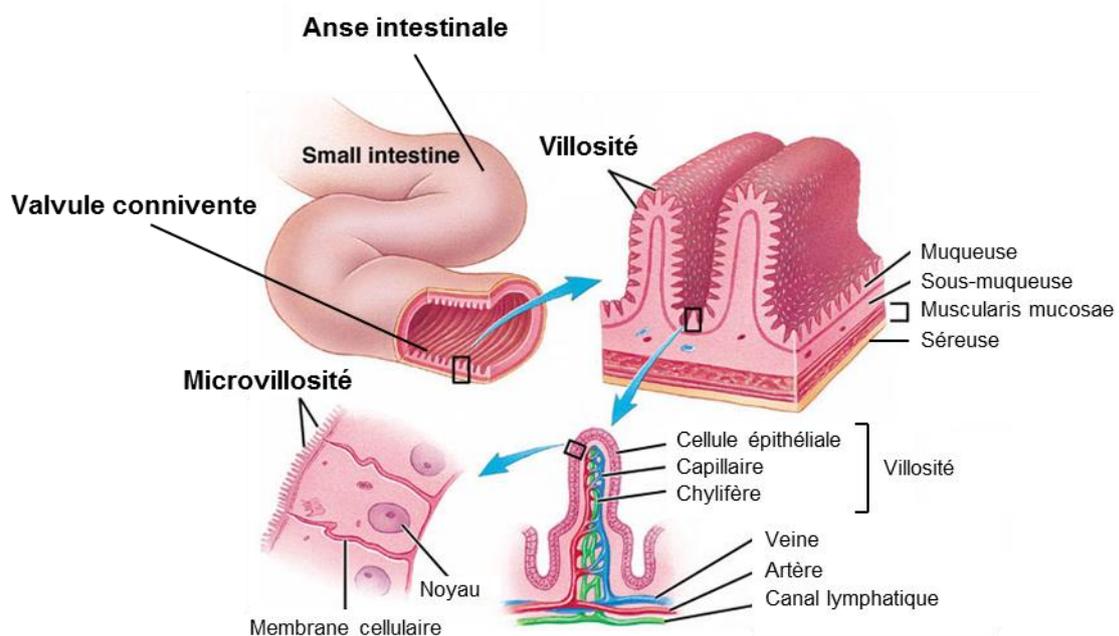
##### **4.1 Structure de l'intestin grêle**

Chez l'homme, l'intestin est divisé en deux parties : l'intestin grêle et le gros intestin qui forment un tube continu dont l'intérieur est bordé d'une monocouche de cellules épithéliales. L'intestin grêle est lui-même divisé en trois segments : le duodénum, qui est le plus proche de l'estomac, suivi par le jéjunum et enfin l'iléum. Dans mon projet de thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'intestin grêle, et plus précisément au jéjunum qui représente sa partie absorptive.

L'intestin grêle est constitué de différentes couches de tissus organisés de façon concentrique avec une couche muqueuse interne, une sous-muqueuse et des assises musculaires lisses

enveloppées d'une séreuse (**Figure 14**). La muqueuse est recouverte d'un épithélium intestinal situé à l'interface entre la lumière intestinale et un tissu de soutien appelé la lamina propria (LP). Cette muqueuse joue un rôle clé dans la fonction d'absorption intestinale grâce à différents dispositifs d'amplification de surface.

Au niveau anatomique, l'intestin grêle forme des anses intestinales qui lui permettent d'atteindre une longueur moyenne de 6 mètres. La muqueuse intestinale forme de nombreux replis appelés les valvules conniventes ou valvules de Kerckring ; ces replis sont eux-mêmes recouverts de villosités intestinales, elles-mêmes tapissées de microvillosités entérocytaires (**Figure 14**). Cette structure particulière représente chez l'adulte une surface d'échange de 200 à 400 m<sup>2</sup>.



**Figure 14.** Structure de l'intestin grêle et système d'amplification de la surface d'absorption (adapté de <https://online.science.psu.edu>)

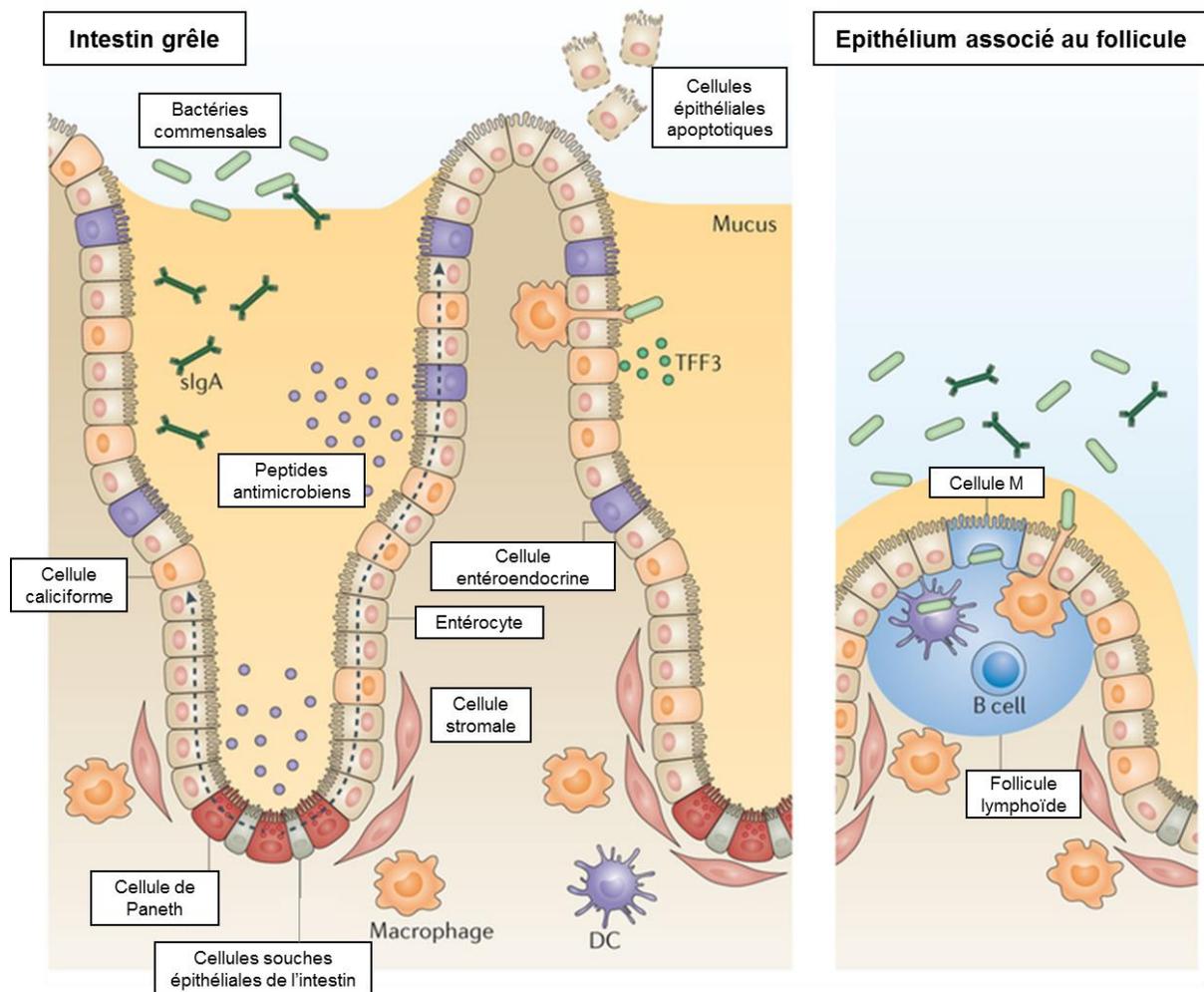
## 4.2 La barrière intestinale

**Barrière chimique :** la surface de l'épithélium intestinal est recouverte d'une couche protectrice de mucus, qui constitue la première barrière biochimique entre la lumière et la muqueuse intestinale. Ce mucus est essentiellement constitué de larges glycoprotéines appelées mucines (dans l'intestin grêle, on retrouve majoritairement la mucine MUC2), celles-ci sont produites et sécrétées en continu par des cellules épithéliales spécialisées localisées essentiellement dans

les cryptes : les cellules caliciformes. Contrairement au colon, les mucines produites au niveau de l'intestin grêle ne sont pas attachées à l'épithélium. La couche de mucus qu'elles forment est pénétrable, mais contient de nombreux médiateurs antibactériens qui tiennent les bactéries à distance de l'épithélium intestinal. On y retrouve notamment des peptides anti-microbiens et les immunoglobulines A (IgA). (Goto and Kiyono, 2012; Johansson and Hansson, 2016).

**Barrière physique** : la muqueuse de l'intestin grêle est bordée d'une monocouche de cellules épithéliales. Celle-ci est principalement constituée d'entérocytes mais également de sous-populations de cellules épithéliales très spécialisées. En plus des cellules caliciformes productrices de mucus, on retrouve les cellules M (capture et transport des antigènes luminaux), les cellules de Paneth (production de facteurs antimicrobiens) et les cellules entéroendocrines (sécrétion d'hormones et de neuropeptides). Les cellules épithéliales intestinales sont en constant renouvellement à partir de cellules souches pluripotentes localisées dans la région des cryptes (**Figure 15**) (Goto and Kiyono, 2012; Peterson and Artis, 2014).

**Barrière immunitaire** : la muqueuse intestinale est dotée d'un système immunitaire complexe qui sera décrit dans le chapitre suivant.



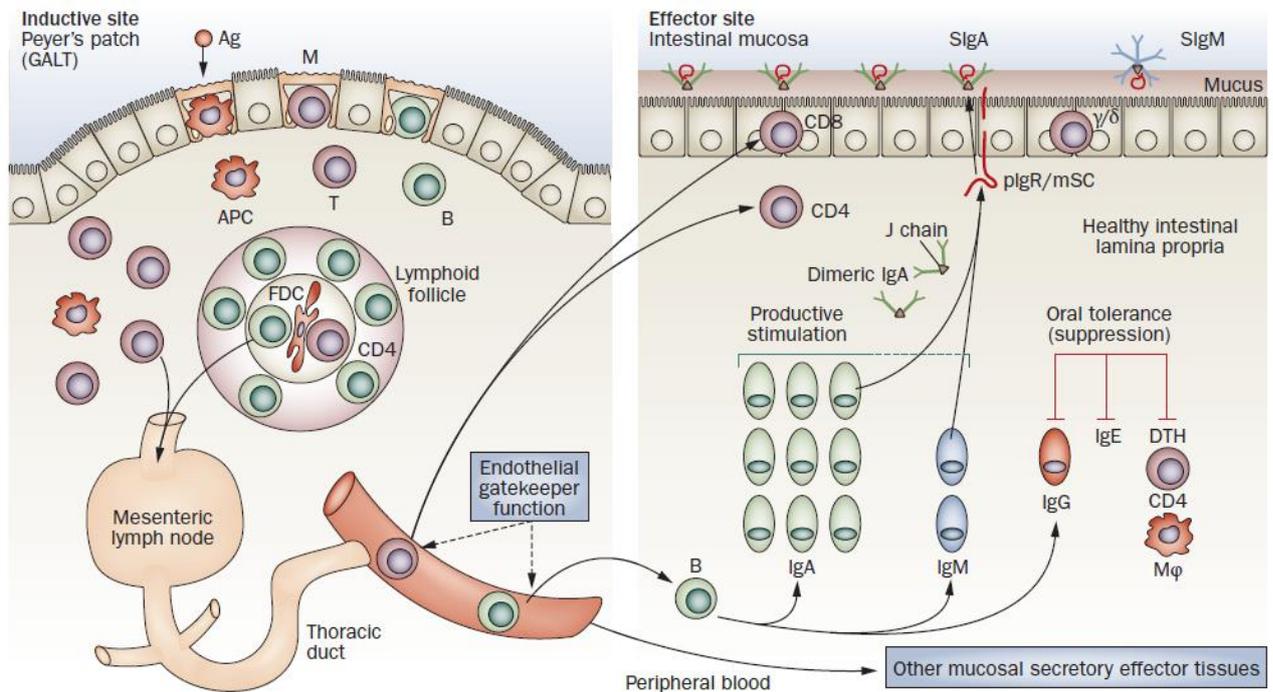
**Figure 15.** Anatomie et composants de la barrière épithéliale intestinale (d'après (Peterson and Artis, 2014))

### 4.3 Particularités du système immunitaire intestinal

Du fait de sa localisation à l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, la muqueuse intestinale est dotée d'un système immunitaire complexe. Celui-ci rencontre plus d'antigènes que dans n'importe quelle autre partie du corps : il doit être à la fois tolérant aux antigènes alimentaires et à la flore commensale tout en assurant une protection vis-à-vis des pathogènes. Ce système nécessite donc d'être finement régulé afin de maintenir l'homéostasie tissulaire (Mowat, 2003).

De par son organisation, le système immunitaire intestinal diffère du système immunitaire circulant. Il peut être divisé en deux compartiments qui se distinguent par leurs fonctions : le compartiment inducteur, où les réponses immunes intestinales sont initiées après stimulation

antigénique, et un second compartiment effecteur, où s'établissent les cellules qui ont été activées par l'antigène (**Figure 16**) (Brandtzaeg, 2010; Brandtzaeg et al., 2008).



**Figure 16.** Représentation schématique du système immunitaire intestinal : compartiment inducteur et compartiment effecteur (d'après (Brandtzaeg, 2010)).

#### 4.3.1 Compartiment inducteur

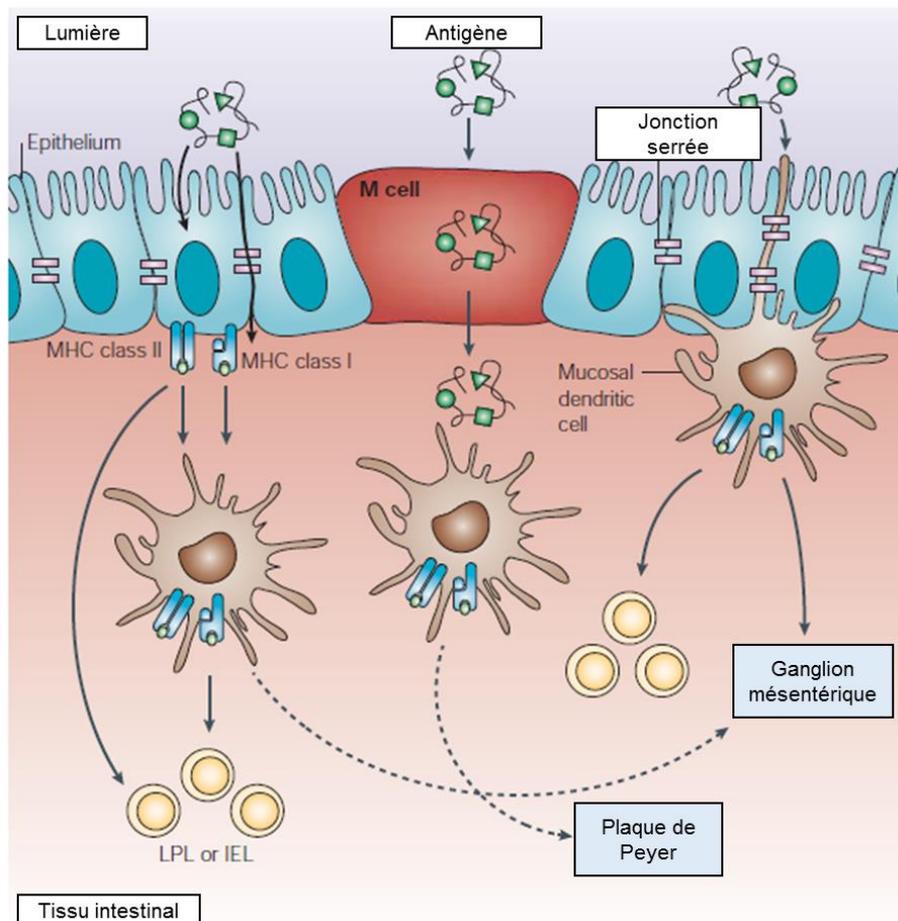
Parmi les principaux sites inducteurs de la réponse immunitaire mucoale, on retrouve le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT) qui regroupe notamment les plaques de Peyer (PPs), les follicules lymphoïdes isolés et les ganglions mésentériques. L'ensemble de ces sites inducteurs font de l'intestin la plus grande masse de tissu lymphoïde de l'organisme.

Les plaques de Peyer sont présentes tout le long de l'intestin grêle et sont constituées de 5 à 200 follicules lymphoïdes regroupés en amas sous la couche de cellules épithéliales (Cornes, 1965). Ces follicules sont principalement constitués de cellules dendritiques, de LT et de LB.

#### 4.3.2 Initiation de la réponse immunitaire

Voies d'entrée et transport des antigènes dans les structures lymphoïdes

La capture des antigènes et leur transport de la lumière intestinale vers les structures lymphoïdes sous-jacentes représentent des étapes clés dans l'induction d'une réponse immunitaire adéquate. Plusieurs mécanismes permettent l'entrée des antigènes luminaux : ceux-ci peuvent pénétrer la barrière épithéliale par l'intermédiaire des cellules M, par les DCs, ou bien directement à travers les entérocytes (**Figure 17**).



**Figure 17.** Mécanismes de capture antigénique dans l'intestin (Cheroutre and Madakamutil, 2004).

L'épithélium couvrant les plaques de Peyer contient des entérocytes spécialisés appelés les cellules M (pour microfold cells) qui se distinguent des autres entérocytes adjacents par des caractéristiques morphologiques facilitant la capture des antigènes luminaux. Contrairement aux autres cellules épithéliales, les cellules M sont recouvertes d'une couche de mucus peu épaisse et possèdent une bordure en brosse très peu développée. Ces entérocytes particuliers sont spécialisés dans la phagocytose et la transcytose de macromolécules provenant de la lumière intestinale. Après leur transcytose, les antigènes ressortent dans une poche intraépithéliale située au pôle basolatéral des cellules M, qui peut contenir des lymphocytes,

des macrophages ou des cellules dendritiques (Kucharzik et al., 2000; Mabbott et al., 2013). Les cellules M n'expriment pas de molécules de CMH, il est donc peu probable qu'elles présentent les antigènes qu'elles capturent. L'hypothèse est qu'elles transmettent l'antigène intact aux cellules présentatrices d'antigène environnantes dans l'épithélium ou le dôme subépithélial (Mowat, 2003).

Parmi ces cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, les cellules dendritiques jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire mucoale. Les DCs sont localisées directement sous les cellules M dans les plaques de Peyer, dans le dôme subépithélial, leur permettant d'apprêter les antigènes capturés et absorbés par les cellules M. Une fois activés suite à la rencontre avec l'antigène, les DCs qui expriment le complexe CMH-peptide, les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et la molécule CCR7 vont migrer vers la région inter-folliculaire des structures lymphoïdes et présenter les peptides antigéniques aux LT naïfs (Cheroutre and Madakamutil, 2004).

Une autre voie, indépendante des cellules M, a également été décrite. En 2001, une étude a en effet montré *in vitro* et *in vivo* que des DCs de l'épithélium intestinal étaient équipées de longues dendrites qui, par extension à travers la barrière d'entérocytes, leur permettraient de capturer directement les antigènes dans la lumière intestinale (Rescigno et al., 2001). Dans ce contexte, de la même façon que les entérocytes, ces DCs expriment des protéines de jonctions serrées, permettant de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale pendant ce processus de capture antigénique.

Les cellules M et les DCs ne représentent pas la seule voie d'entrée des antigènes. En effet, l'épithélium absorbif lui-même n'est pas complètement imperméable et les entérocytes pourraient participer activement à la génération de la réponse immunitaire intestinale. Des études *in vitro* ont en effet montré que les entérocytes pouvaient apprêter et présenter des antigènes aux LT. Enfin, une étude réalisée *in vivo* a mis en évidence le rôle des cellules caliciformes sécrétrices de mucus dans la capture des antigènes de la lumière qu'elles délivrent aux DCs de la lamina propria (LP) sous-jacente (McDole et al., 2012).

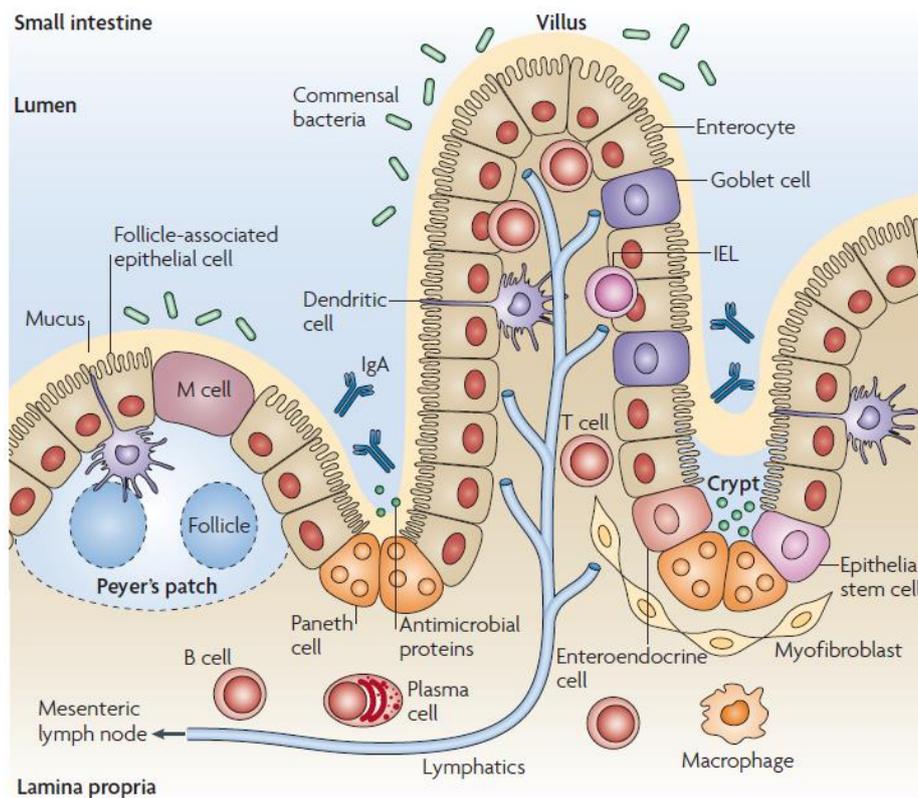
#### Migration vers le compartiment effecteur

Après avoir rencontré l'antigène présenté par les CPAs dans les plaques de Peyer, les LB et les LT perdent l'expression de la L-selectine et acquièrent l'expression de la molécule d'adressage CCR9 (chemokine receptor 9) et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  qui se fixent respectivement aux

chimiokines CCL25 et MadCAM-1 (mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule) exprimées dans la lamina propria. Ainsi, les lymphocytes rejoignent le réseau lymphatique et migrent transitoirement dans les ganglions mésentériques où ils subissent une dernière étape de différenciation. Après cette étape, ils rejoignent la circulation sanguine à travers le canal thoracique puis sont redistribués notamment vers la LP et l'épithélium intestinal où ils vont exercer leurs fonctions effectrices (Mowat, 2003).

### 4.3.3 Compartiment effecteur

L'épithélium intestinal et la LP représentent les sites effecteurs de la réponse immunitaire. La LP est notamment formée de cellules stromales (des myofibroblastes), de LB différenciés en plasmocytes spécialisés dans la production d'IgA, de LT majoritairement CD4<sup>+</sup>, de macrophages et de DCs (**Figure 18**).



**Figure 18.** Système immunitaire de l'intestin grêle. L'épithélium intestinal constitue une barrière physique entre la lumière intestinale et la LP sous-jacente. Composé majoritairement d'entérocytes, l'épithélium contient également des lymphocytes intra-épithéliaux. La LP est quant à elle constituée de lymphocytes B, de cellules stromales, de lymphocytes T, de macrophages et de DCs (Abreu, 2010).

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) sont en contact direct avec les entérocytes de la barrière épithéliale, proches des antigènes de la lumière intestinale et constituent la première ligne de défense contre les pathogènes. Les IEL sont localisés entre les cellules épithéliales et sont très majoritairement des LT CD8<sup>+</sup>, contrairement aux LT circulants et aux LT de la lamina propria (Cheroutre et al., 2011). De la même façon que les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoires présents dans les tissus non lymphoïdes, ils possèdent une activité cytolytique immédiate. On distingue deux catégories d'IEL CD8<sup>+</sup> : les LT qui expriment un co-récepteur conventionnel, c'est-à-dire l'hétérodimère CD8 $\alpha$ /CD8 $\beta$  ou et ceux qui expriment uniquement CD8 $\alpha$ /CD8 $\alpha$ .

#### **4.3.4 Rôle protecteur de l'IL-17 et de l'IL-22 dans l'intestin ?**

Parmi les cellules immunitaires intestinales, on retrouve majoritairement des cellules capables de sécréter de l'IL-17 et de l'IL-22. Ces cytokines sont produites par les cellules Th17 et Th22 (Moseley et al., 2003), mais également par des cellules T $\gamma\delta$ , les cellules NKT, les cellules MAIT et des cellules de l'immunité innée, les ILC3. Les données quant à leur rôle protecteur ou pro-inflammatoire dans l'intestin sont encore controversées, bien qu'elles semblent jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale.

Dans un modèle murin de colite expérimentale provoquée par le dextran sodium sulfate (DSS), l'IL-17A produite par les LT $\gamma\delta$  du colon a une action positive sur la localisation membranaire de l'occludine favorisant ainsi les jonctions serrées entre les cellules épithéliales (Lee et al., 2015). L'IL-17 jouerait également un rôle sur la maintenance de l'intégrité épithéliale dans un contexte inflammatoire (Maxwell et al., 2015). Outre l'effet direct sur les cellules épithéliales, les cellules Th17 productrices d'IL-17 et d'IL-22 joueraient également un rôle dans la production d'IgA qui représentent la première ligne de défense de l'intégrité de la surface mucosale et sont impliquées d'une façon générale dans la maintenance des communautés de bactéries commensales (Peterson et al., 2007). Cependant, plusieurs études rapportent également un rôle pro-inflammatoire de l'IL-17 chez l'homme et la souris, notamment dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD) (Cătană et al., 2015).

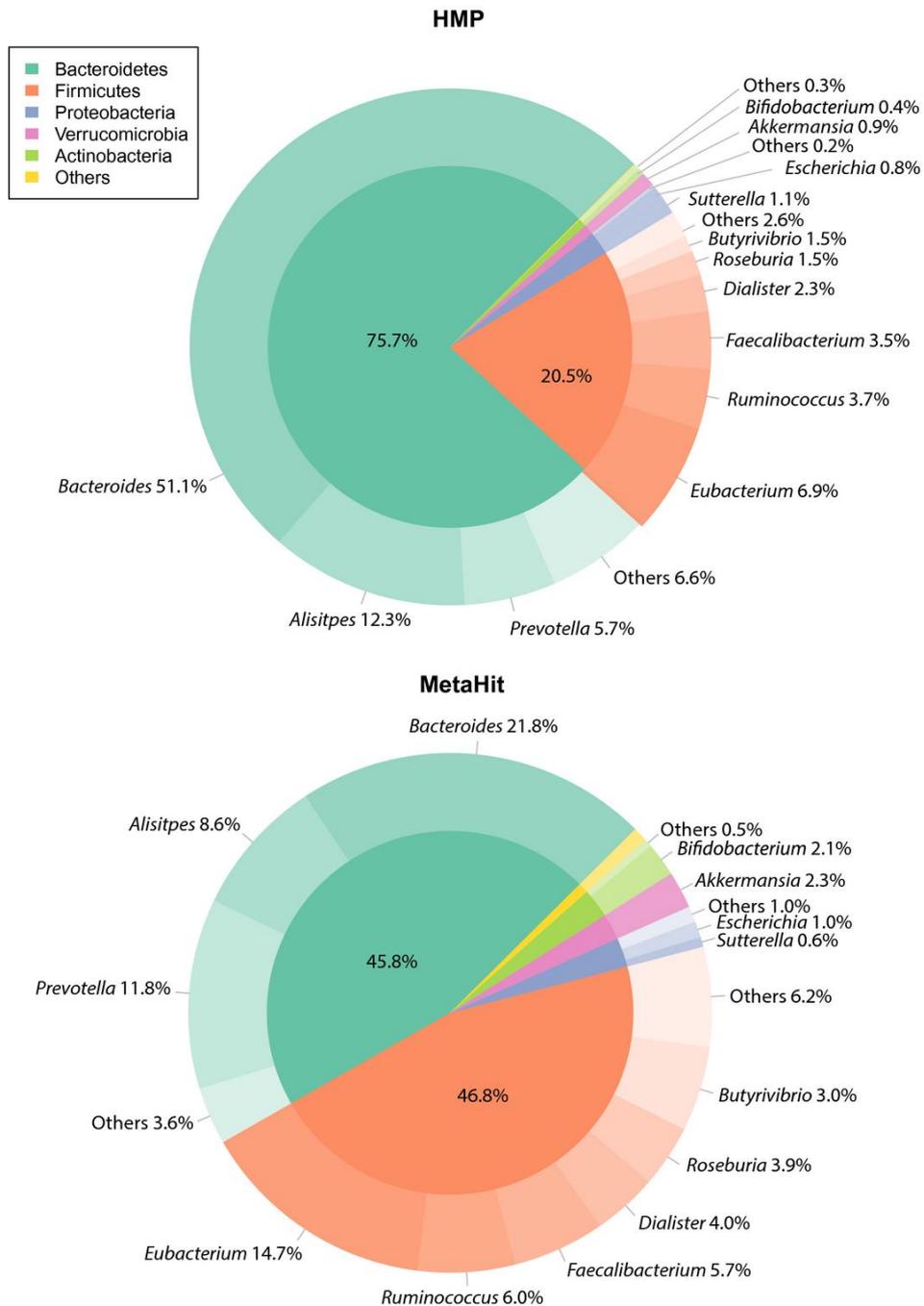
L'IL-22 est une autre cytokine produite par la famille des Th17, et par les Th22. Son récepteur, IL-22R, est notamment exprimé par les cellules épithéliales intestinales. L'IL-22 jouerait un rôle protecteur sur la barrière épithéliale intestinale en agissant directement sur les cellules épithéliales (Sonnenberg et al., 2011). L'IL-22 est impliqué dans le chimiotactisme, la génération de peptides anti-bactériens, la réparation tissulaire, la survie, la prolifération et la

différentiation des cellules épithéliales (Kolls et al., 2008; Sonnenberg et al., 2011; Zheng et al., 2008).

#### **4.3.5 Rôle du microbiote intestinal dans la maturation du système immunitaire intestinal et dans la différenciation des LT**

##### *Généralités sur le microbiote intestinal*

L'intestin héberge entre autres microorganismes, l'ensemble des  $10^{14}$  bactéries du microbiote intestinal. Cet écosystème riche et complexe est colonisé dès la naissance et est influencé par différents facteurs environnementaux et alimentaires comme le mode d'accouchement (voie basse ou césarienne), le régime alimentaire (allaitement ou non), l'hygiène et la prise d'antibiotiques. L'établissement du microbiote intestinal adulte est atteint entre l'âge de 2 et 5 ans puis se stabilise et devient unique pour chaque individu (Boulangé et al., 2016). La composition et la distribution précise du microbiote intestinal reste cependant à déterminer ; on estime en effet que plus de 90% des espèces bactériennes peuplant le tractus digestif ne sont pas cultivables *in vitro*. Cependant, les techniques moléculaires actuelles révèlent qu'au total, le microbiote intestinal humain abrite plus de 1000 espèces différentes dont la densité suit un gradient oro-anal (Mowat and Agace, 2014). Si en termes d'espèces bactériennes la composition du microbiote intestinal est propre à chaque individu, les caractéristiques en termes de composition au niveau des grands groupes phylogénétiques sont très conservées d'un individu à l'autre. Ces espèces bactériennes sont réparties en grands phyla dont les nombres relatifs varient d'un individu à un autre. Les 5 phyla dominants sont : *Firmicutes* et *Bacteroidetes* qui sont largement majoritaires, ainsi que les *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Verrucomicrobia* (**Figure 19**) (Arora and Bäckhed, 2016; Landman and Quévrain, 2016).



**Figure 19.** Comparaison quantitative du microbiote fécal dans 2 populations de sujets sains chez 139 individus américains du projet Human Microbiome Project (HMP) et 99 individus européens du projet Metagenomics of human intestinal tract (MetaHIT). Les pourcentages intérieurs du graphique représentent l'abondance relative des grands phyla bactériens et les pourcentages extérieurs représentent les genres au sein de ces phyla (Arora and Bäckhed, 2016).

Le microbiote intestinal est impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques dont la plus importante est la fermentation et l'absorption de substrats (carbohydrates) non digérés par l'hôte

qui permet de fournir jusqu'à 10% des besoins énergétiques chez l'homme (Kaoutari et al., 2014). En plus de ce processus métabolique, le microbiote intestinal exerce d'autres fonctions, et joue notamment un rôle important dans la mise en place et la maturation du système immunitaire (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Hooper et al., 2012).

### ***Influence du microbiote sur la maturation du système immunitaire intestinal***

Le développement du système immunitaire intestinal est initié avant la naissance et détermine la formation des ganglions mésentériques et des plaques de Peyer, sites d'initiation de la réponse immunitaire (van de Pavert and Mebius, 2010). Il est aujourd'hui établi que le développement et la maturation du système immunitaire intestinal sont fortement influencés par le microbiote intestinal (Hooper et al., 2012). En effet, de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal ont été observées chez des souris axéniques (élevées en conditions stériles et dépourvues de microbiote) comparées à des souris conventionnelles (élevées en animalerie classique) (Macpherson and Harris, 2004). Les souris axéniques présentent une hypoplasie des plaques de Peyer avec peu de centres germinatifs, une diminution du nombre de plasmocytes producteurs d'IgA et une réduction des LT CD4<sup>+</sup> dans la LP. Ces altérations sont cependant réversibles lorsque les souris axéniques sont colonisées plusieurs semaines avec des bactéries commensales. Plusieurs études ont par la suite montré que certaines bactéries ou métabolites bactériens pouvaient influencer la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> intestinaux.

Une étude de l'équipe de Dan Littman publiée en 2008 a montré dans un modèle de souris axéniques que les cellules Th17 étaient induites dans l'intestin grêle en réponse à des composants spécifiques du microbiote intestinal et que leur différenciation était inhibée dans l'intestin des souris traitées avec des antibiotiques (Ivanov et al., 2008). De manière intéressante, cette étude a montré une différence significative dans le nombre de cellules Th17 de la lamina propria en fonction de la provenance des animaux (différents fournisseurs), soulignant l'importance non pas uniquement de la présence, mais surtout de la composition du microbiote sur le développement de ces cellules. Parmi ces composants du microbiote, la même équipe montrera l'année suivante que l'induction de cellules Th17 dans l'intestin est médiée par une bactérie spécifique : la bactérie filamenteuse segmentée (SFB) (Ivanov et al., 2009). Une autre équipe a également montré en parallèle le rôle de la SFB dans le développement des réponses des LT auxiliaires, complétant des travaux plus anciens suggérant que la SFB est également un puissant inducteur des réponses IgA intestinales (Gaboriau-Routhiau et al., 2009).

La SFB est une bactérie qui a la particularité de s'attacher à la muqueuse de l'iléon, en particulier à l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer et une corrélation positive a été montrée entre la présence de la SFB et la résistance à une infection par une bactérie pathogène adhérant aux PPs (*Salmonella enteritidis*) (Garland et al., 1982).

D'autres mécanismes sont également capables de moduler la différenciation et la fonction des lymphocytes T intestinaux. Les bactéries de la flore commensale produisent un grand nombre de métabolites qui régulent la physiologie, la nutrition et l'immunité chez l'hôte. Parmi ces métabolites pouvant influencer la réponse immunitaire adaptative, on retrouve les acides gras à chaîne carbonée courte ou SCFA (*short-chain fatty acid*) produits notamment par *Akkermansia muciniphila* et *Faecalibacterium prausnitzii*. Les SCFA incluent l'acétate (C2), le propionate (C3) et le butyrate (C4) qui sont des produits issus de la fermentation des fibres et des carbohydrates non digérés dans le colon. Des études ont notamment montré que les SCFA, en particulier le butyrate, régulaient le nombre, la différenciation et la fonction des lymphocytes T régulateurs (Tregs) dans le colon des souris (Furusawa et al., 2013; Smith et al., 2013). Une étude plus récente a également révélé que les SCFA pouvaient promouvoir la réponse IgA intestinale (Wu et al., 2016).

Le microbiote intestinal joue donc un rôle prépondérant dans l'homéostasie du système immunitaire intestinal, et notamment dans l'équilibre des cellules Th17/Tregs et donc potentiellement sur l'intégrité de la barrière mucoale.

#### **4.3.6 Altérations de l'immunité intestinale dans l'obésité et le diabète de type 2**

L'intérêt porté aux modifications de l'immunité et à l'inflammation intestinale au cours de l'obésité en lien avec l'insulino-résistance est relativement récent et reste peu documenté. Cela peut paraître surprenant en sachant que l'intestin représente la plus large masse de tissu lymphoïde du corps humain. L'impact de l'infiltrat de cellules immunitaires intestinales sur le développement de l'obésité et des maladies métaboliques mérite donc d'être plus amplement étudié. Quelques études très récentes montrent cependant des modifications de la fréquence et/ou du nombre de cellules immunitaires des souris obèses sous régime gras (HFD) (Winer et al., 2016, 2017).

Dans l'obésité induite par un régime gras, les ILC3, qui sont particulièrement présentes dans l'intestin, seraient diminuées dans la lamina propria des souris obèses par rapport aux souris minces (Luck et al., 2015). Ces cellules produisent de larges quantités d'IL-22 (Spits et al.,

2013) dont le rôle est de maintenir l'intégrité de la barrière mucoale. Dans l'obésité, l'IL-22 semblerait avoir un rôle protecteur. Dans une étude utilisant un modèle de souris HFD et un modèle de souris obèses db/db (déficientes pour le gène de la leptine), les auteurs montrent que l'administration d'IL-22 améliore les symptômes métaboliques induits par l'obésité comme l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline.

Dans l'intestin des souris obèses, une diminution du nombre et de la fréquence des éosinophiles est observée au bout d'une semaine de régime gras (Johnson et al., 2015). Cette diminution est associée avec une augmentation de la perméabilité intestinale.

Finalement, assez peu d'études se sont intéressées aux cellules immunitaires innées dans l'intestin au cours de l'obésité. En revanche, des études portant sur des changements de l'immunité adaptative, et notamment des LT ont été réalisées dans des modèles murins d'obésité. Après 12 à 16 semaines, l'obésité induite par un régime gras induit une polarisation proinflammatoire dans le colon et l'intestin grêle : le nombre absolu et/ou le pourcentage de LT Th1 produisant de l'IFN- $\gamma$  et le nombre de LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup> sont augmentés par rapport à des souris minces (Luck et al., 2015). A l'inverse, la proportion de LT régulateurs (Tregs) CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> se retrouve diminuée. Dans une autre étude, la proportion des cellules Tregs est également diminuée dans l'iléon des souris après 30 jours de HFD alors que la fréquence des cellules Th1 est augmentée (Garidou et al., 2015). Si ces études semblent s'accorder sur une augmentation du ratio Th1/Tregs dans l'obésité, les études comparant la proportion des cellules Th17 dans l'intestin des souris obèses présentent des résultats plus variables. La plupart des études montrent en effet une diminution de ces cellules chez la souris obèse. Dans les souris HFD, le nombre de Th17 dans l'iléon est diminué et associé à la diminution de la bactérie SFB (Garidou et al., 2015). Deux autres études semblent également confirmer ces résultats (Cavallari et al., 2016; Cox et al., 2014). Cependant, une étude récente explorant également les modifications de l'immunité innée dans l'intestin grêle et le côlon de souris obèses ne montre aucune différence dans la fréquence des cellules Th17 mais une augmentation des cellules T $\gamma\delta$  produisant de l'IL-17 après 3 et 12 semaines de régime gras (Luck et al., 2015). Chez l'homme, les modifications de l'immunité intestinale induite par l'obésité et le diabète de type 2 sont très peu documentées et restent encore à explorer.

## 5. Relations entre microbiote intestinal et obésité

D'un point de vue immunologique, les microorganismes sont reconnus comme des pathogènes par le système immunitaire qui reconnaît et élimine ces microorganismes. Cependant, la majorité des bactéries intestinales sont non-pathogènes et co-habitent avec les entérocytes et les composants du système immunitaire intestinal dans une relation symbiotique. Dans certains cas, cette masse considérable de bactéries peut constituer une menace pour l'hôte. Les altérations dans la distribution des espèces bactériennes composant le microbiote intestinal sont appelées dysbiose et ont été associées avec un grand nombre de pathologies comme certaines maladies auto-immunes, les pathologies du système digestif (cancer colorectal, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), les allergies et également les maladies métaboliques (Clemente et al., 2012).

Les travaux pionniers de JI Gordon mettant en jeu des transferts de flore intestinale chez la souris, ont révélé l'importance du microbiote intestinal dans la pathophysiologie de l'obésité (Bäckhed et al., 2004; Turnbaugh et al., 2006). Ces premières études sont basées sur l'utilisation de souris axéniques. Chez la souris rendue obèse par un régime hyperlipidique, des modifications de la flore intestinale induisent une augmentation de la production d'endotoxines et une altération de la perméabilité intestinale (Cani et al., 2007a; Serino et al., 2012). L'endotoxémie qui en résulte active le système immunitaire et induit une inflammation. Ce mécanisme délétère peut être atténué par des modifications du microbiote produites par des traitements antibiotiques ou prébiotiques chez la souris obèse (Cani et al., 2007b, 2008, 2009; Serino et al., 2012).

Des études cliniques et des études utilisant des modèles animaux ont montré que le microbiote intestinal était altéré au cours de l'obésité (Aron-Wisnewsky and Clément, 2016). Une des premières études comparant la composition bactérienne dans l'intestin distal (caecum) de souris minces par rapport à des souris obèses *lep/lep* (déficientes pour l'hormone de la leptine) montre une différence dans l'abondance des deux phyla bactériens majeurs Bacteroidetes et Firmicutes avec une réduction de l'abondance des Bacteroidetes au profit des Firmicutes ainsi qu'un ratio Firmicutes/Bacteroidetes positivement corrélé avec l'obésité (Ley et al., 2005). L'année suivante, la même équipe montre des résultats similaires dans un modèle de souris rendues obèses par HFD (Turnbaugh et al., 2006). Cette modification du ratio Firmicutes/Bacteroidetes a également été explorée chez l'homme, mais cette hypothèse est controversée, plusieurs études s'avérant être discordantes sur la question. En effet, la comparaison entre le microbiote

intestinal de 12 sujets obèses par rapport à 3 sujets minces a révélé que les sujets obèses présentaient une augmentation de l'abondance de Firmicutes et une diminution du niveau de Bacteroidetes par rapport aux sujets minces (Ley et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés dans une cohorte plus large, mais d'autres études plus récentes ne détectent aucune différence dans la proportion des Bacteroidetes entre les individus obèses et non obèses (Aron-Wisniewsky et al., 2012).

Plus récemment, une étude de l'équipe de JI Gordon impliquant le transfert de microbiote fécal provenant d'une paire de jumeaux discordants pour l'obésité à des souris axéniques montre que les souris qui reçoivent le microbiote du jumeau obèse développent des altérations métaboliques et prennent plus de poids que les souris ayant reçu le microbiote du jumeau mince (Ridaura et al., 2013). Lorsque les deux groupes de souris sont réunis dans la même cage, le transfert de microbiote intestinal induit par coprophagie montre que le microbiote des souris ayant reçu le microbiote obèse est altéré et s'accompagne d'une amélioration du phénotype métabolique.

De nombreuses études cliniques démontrent que le microbiote intestinal est également altéré dans l'obésité humaine et le diabète de type-2 (Ley et al., 2006; Qin et al., 2012). Notre équipe a notamment mis en évidence des changements de composition de la flore intestinale chez les sujets obèses par rapport à des sujets de poids normal (Furet et al., 2010; Kong et al., 2013).

La diversité bactérienne est également un paramètre important à prendre en compte. Une étude analysant la composition du microbiote intestinal dans une population Danoise de sujets minces et obèses identifie deux groupes d'individus qui se distinguent par le nombre de gènes du microbiote intestinal et donc par la richesse bactérienne intestinale (Le Chatelier et al., 2013). Les individus dont la richesse bactérienne est faible (LGC, *low-gene-count*, 23% de la population) sont caractérisés par une plus forte adiposité, une résistance à l'insuline, une dyslipidémie et un phénotype inflammatoire plus prononcé par rapport à des individus présentant une richesse bactérienne élevée. Ces altérations métaboliques pourraient contribuer à une augmentation du risque cardiovasculaire chez les patients. Dans une autre étude, notre équipe a montré qu'après restriction calorique chez des sujets obèses ou en surpoids, la richesse du microbiote est significativement associée à l'amélioration du statut glucidique et/ou inflammatoire des patients (Cotillard et al., 2013). Parmi les espèces bactériennes présentes, l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* est associée à un meilleur profil métabolique, une meilleure sensibilité à l'insuline et un meilleur profil métabolique après perte de poids (Dao et al., 2015).

Depuis la première étude menée par l'équipe de JI Gordon en 2004 et avec le développement des techniques permettant l'analyse du microbiote, un nombre toujours croissant d'études, menées à la fois à l'aide de modèles murins et dans des cohortes humaines, suggèrent un rôle important du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité et des comorbidités associées. Cependant, ces études, notamment chez l'homme, sont souvent basées sur des associations entre le constat d'un microbiote intestinal altéré et un phénotype pathologique. Des études complémentaires sont nécessaires, afin de montrer si le microbiote intestinal contribue effectivement au développement de ces pathologies ou bien si la dysbiose observée en est simplement le reflet.

# PROJET DE RECHERCHE ET RESULTATS

## 1. Hypothèse de travail et objectifs

Mon travail de thèse s'inscrit dans le contexte physiopathologique de l'obésité humaine où l'inflammation tissulaire, notamment dans le tissu adipeux, participe au maintien de l'inflammation chronique de bas grade et au développement des comorbidités et complications associées à l'obésité. Si de nombreuses études se sont en effet intéressées au tissu adipeux blanc qui est l'organe cible dans la pathologie de l'obésité, l'intestin grêle absorptif peut également être altéré.

**L'objectif de mon projet de thèse est d'étudier les relations entre l'inflammation systémique et l'inflammation intestinale en relation avec le statut métabolique dans l'obésité humaine et les maladies cardiométaboliques associées.**

J'ai dans un premier temps participé à un projet s'intéressant pour la première fois aux altérations du nombre et du phénotype des cellules immunitaires innées et adaptatives dans l'intestin grêle de sujets obèses par rapport à des sujets minces. Parmi les cellules immunitaires étudiées, les LT représentent la population la plus abondante et sont augmentés en nombre dans l'intestin des sujets obèses. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de ces LT et de leurs sécrétions cytokiniques sur la fonction des entérocytes de la barrière épithéliale. Cette première étude a été publiée dans Cell Metabolism (**article #1**).

A la suite de cette première publication, j'ai mené une étude complémentaire s'intéressant cette fois-ci à la caractérisation par cytométrie en flux de la fréquence, du phénotype et du nombre absolu des cellules immunitaires dans l'intestin mais également dans le sang circulant d'une même cohorte de patients. Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet Européen MetaCardis dont l'objectif est d'étudier l'impact des changements qualitatifs et quantitatifs du microbiote intestinal sur la pathogenèse des maladies cardiométaboliques et des comorbidités qui leur sont associées. Dans ce contexte, notre objectif est de relier les altérations observées au niveau systémique et intestinal avec le phénotype clinique des patients ainsi qu'avec des changements dans la composition du microbiote intestinal. La première partie des résultats obtenus, c'est à dire la caractérisation des cellules immunitaires chez des sujets minces, obèses et obèses diabétiques sont présentés dans l'**étude #2**.

Enfin, je me suis intéressée à une population de lymphocytes T non conventionnels, les cellules MAIT, qui ont pour ligands des métabolites bactériens dérivés de la voie de synthèse de la vitamine B. L'obésité et le diabète induit une diminution de la fréquence de cette population dans le sang. Mon objectif a été de caractériser les cellules MAIT à d'autres stades de pathologies cardiométaboliques comme le syndrome métabolique et les maladies coronariennes et de proposer un mécanisme expliquant la diminution de cette population dans le sang périphérique. Les résultats de cette étude sont décrits dans l'**article #2**.

## **2. Etude n°1 – Rôle de la production d'IL-17 et d'IL-22 par les lymphocytes T intestinaux dans l'obésité humaine : potentielle implication dans l'altération de la sensibilité à l'insuline des entérocytes**

### **Article #1**

Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, Cotillard A, Fohrer-Ting H, Hubert EL, Remark R, Genser L, Tordjman J, Garbin K, Osinski C, Sautès-Fridman C, Leturque A, Clément K, Brot-Laroche E. *Jejunal T-cell inflammation in human obesity correlates with decreased enterocyte insulin signaling*. **Cell Metabolism**. 2015 Jul 7;22(1):113-24. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.05.020.

#### Contexte et objectifs :

Cette étude, réalisée en collaboration avec le Dr Edith Brot-Laroche (INSERM UMRS 1138, équipe « Physiopathologies intestinales : nutrition et fonction de barrière » dirigée par le Dr Armelle Leturque) fait l'objet d'une publication dans Cell Metabolism en 2015 (Monteiro-Sepulveda et al., 2015) et étudie pour la première fois les modifications de l'immunité intestinale dans une cohorte de 185 sujets obèses par rapport à 33 sujets minces en relation avec des paramètres biocliniques. **Dans le cadre de cette collaboration, les objectifs spécifiques de mon travail de thèse ont été :**

**1) d'analyser par cytométrie en flux et RT-PCR le phénotype et le profil cytokinique des lymphocytes T intestinaux en relation avec le statut pondéral et glycémique des sujets**

**2) et dans un deuxième temps d'évaluer *in vitro* les relations fonctionnelles entre lymphocytes T et entérocytes dans un système de co-culture avec la lignée Caco-2/TC7.**

La première partie du travail montre d'une part l'augmentation de la surface absorbative de la muqueuse intestinale chez le sujet obèse (augmentation de la hauteur des villosités intestinales et de la profondeur des cryptes) et d'autre part l'augmentation de l'infiltrat de cellules immunitaires innées et adaptatives (macrophages, cellules dendritiques, cellules NK et lymphocytes T) dans la muqueuse jéjunale obèse. Parmi ces cellules, les lymphocytes T sont significativement augmentés dans la muqueuse jéjunale avec un tropisme préférentiel vers l'épithélium intestinal chez les sujets obèses par rapport aux sujets minces.

Il a été montré par nos collaborateurs que l'intestin est un tissu sensible à l'insuline. L'absorption intestinale des sucres dépend en effet du trafic insulino-sensible intracellulaire du transporteur de glucose 2 (GLUT2), dont la localisation est modifiée dans l'obésité et le diabète (Tobin et al., 2008). Ces résultats ont été validés dans l'obésité humaine (Ait-Omar et al., 2011). Dans le TA des sujets obèses, la sécrétion locale de cytokines pro-inflammatoires pourrait participer à la mise en place de cette résistance à l'insuline. Cependant, il existe peu de données concernant la relation entre l'immunité intestinale et la sensibilité à l'insuline dans l'intestin. Les lymphocytes T constituent la population immunitaire majoritaire dans la muqueuse intestinale. Ces cellules étant augmentées dans l'obésité et se trouvant en première ligne dans la protection de la barrière intestinale, nous nous sommes intéressés à la relation entre le phénotype des lymphocytes T intestinaux et la réponse à l'insuline intestinale. Ces questions font l'objet de la première partie de ma thèse.

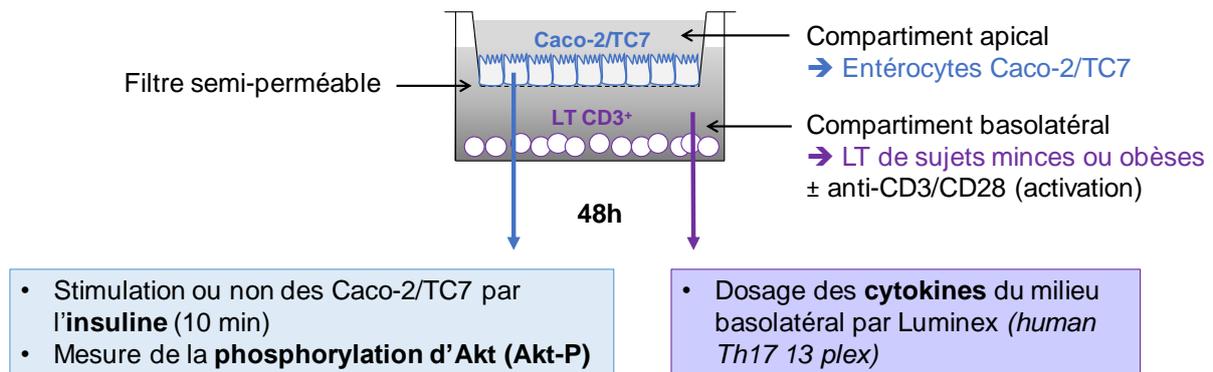
### Résultats principaux :

Dans un premier temps, nous avons évalué par RT-PCR quantitative l'expression génique de différentes cytokines et chimiokines dans des échantillons de LP ou de cellules épithéliales totales (cellules non immunitaires et cellules immunitaires) de sujets non obèses et obèses. Ces analyses ont révélé une augmentation de l'expression de l'IL-6, IL-17, IL-22 et CCL2 uniquement dans la LP et de l'IL-23, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  et IFN- $\gamma$  dans l'épithélium et la LP des sujets obèses par rapport aux sujets minces. Ces profils révèlent une augmentation de l'inflammation mucosale dans le jéjunum des sujets obèses.

L'IL-23 étant une cytokine clé dans la régulation de la réponse Th17, nous avons également exploré la signature cytokinique des lymphocytes T jéjunaux par cytométrie en flux après stimulation non spécifique avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et de la ionomycine. Nos résultats montrent une augmentation du pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 dans la LP des sujets obèses, et une augmentation du pourcentage de cellules CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN- $\gamma$  la LP et dans l'épithélium des sujets obèses par rapport aux sujets minces. Ces résultats suggèrent que dans l'obésité, l'immunité jéjunale est orientée vers des réponses proinflammatoires, notamment de type Th17/Th22.

Afin d'évaluer l'impact fonctionnel du profil pro-inflammatoire des lymphocytes T intestinaux sur le jéjunum, nous avons mis en place un système de co-culture *in vitro/ex vivo* utilisant la lignée Caco-2/TC7 et des cellules T CD3<sup>+</sup> immunosélectionnées à partir de LP ou d'EPI de sujets minces ou obèses (**Figure 20**). La lignée Caco-2/TC7 a la particularité de s'organiser en

monocouche d'entérocytes polarisés en culture sur filtre semi-perméable et de présenter un phénotype d'intestin grêle, mimant ainsi la barrière épithéliale (Chantret et al., 1994).



**Figure 20.** Description du système de co-culture mettant en jeu des entérocytes Caco-2/TC7 dans le compartiment apical et des LT de patients minces ou obèses dans le compartiment basolatéral.

Après 48h de co-culture, nous avons évalué la sensibilité à l'insuline entérocytaire en quantifiant par Western Blot la phosphorylation d'Akt, une kinase impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline, dans les entérocytes Caco-2/TC7 en réponse à une stimulation par l'insuline. Nos résultats montrent qu'en co-culture avec des cellules CD3<sup>+</sup> activées de sujets obèses et non de sujets minces, la phosphorylation d'Akt est réduite dans les Caco-2/TC7, montrant que les lymphocytes T de sujets obèses ont la capacité d'altérer la réponse à l'insuline des entérocytes par l'intermédiaire de facteurs solubles. Ces résultats suggèrent que les profils de sécrétion entre les deux groupes de patients diffèrent.

Nous avons donc dosé 13 cytokines par multiplex dans le surnageant de sécrétion basolatéral des lymphocytes T. Ce dosage montre que la co-culture de Caco-2/TC7 avec des lymphocytes de sujets obèses induit une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-17 et l'IL-22 étant les plus augmentées dans les surnageants de lymphocytes de LP de sujets obèses par rapport aux sujets minces.

Enfin, pour confirmer l'effet de ces facteurs solubles et évaluer leur impact direct sur la réponse à l'insuline des Caco-2/TC7, nous avons cultivé des entérocytes Caco-2/TC7 en présence de cytokines recombinantes et avons à nouveau évalué la réponse à l'insuline des entérocytes. Cette expérience a montré que les cytokines proinflammatoires (IL-9, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-21, IL-17A et IL-22) altèrent directement la signalisation de l'insuline des entérocytes, l'IL-17 et l'IL-22 ayant un effet majeur sur celle-ci.

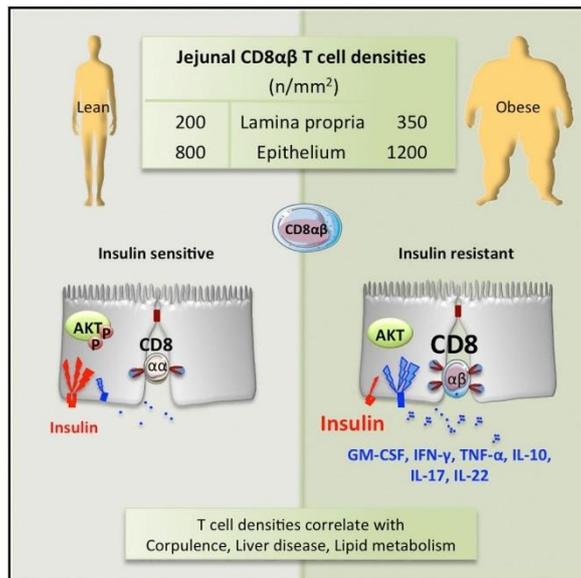
### Conclusion :

Dans l'obésité, l'inflammation contribue à la résistance à l'insuline dans différents tissus cibles (tissu adipeux, foie et muscle) (Olefsky and Glass, 2010). Dans cette étude, nous montrons que l'immunité intestinale est altérée dans l'obésité et que les LT des sujets obèses ont un phénotype plus proinflammatoire par rapport à des sujets minces. Aussi, nous montrons que des facteurs solubles sécrétés par des lymphocytes T intestinaux de sujets obèses et non de sujets minces ont la capacité, *in vitro*, de diminuer la réponse à une stimulation par l'insuline des entérocytes.

# Cell Metabolism

## Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling

### Graphical Abstract



### Authors

Milena Monteiro-Sepulveda,  
Sothea Touch,  
Carla Mendes-Sá, Sébastien André, ...,  
Armelle Leturque, Karine Clément,  
Edith Brot-Laroche

### Correspondence

karine.clement@psl.aphp.fr (K.C.),  
edith.brot-laroche@crc.jussieu.fr  
(E.B.-L.)

### In Brief

Monteiro-Sepulveda et al. conduct a comprehensive obesity-related study of the absorptive upper intestine. They find that, relative to lean individuals, obese subjects have increased jejunal mucosal surface and an increase in both local innate and adaptive immune cells. Increased jejunal T cells, especially at the epithelial mucosa surface, correlate with decreased enterocyte insulin signaling.

### Highlights

- Human obesity causes an increase in the jejunal mucosal surface
- Both innate and adaptive immune cells are increased in the gut in obesity
- There is increased homing of CD8 $\alpha\beta$  T cells in the obese jejunum epithelium
- T cells from obese subjects impair insulin sensitivity of enterocytes

Monteiro-Sepulveda et al., 2015, *Cell Metabolism* 22, 1–12  
July 7, 2015 ©2015 Elsevier Inc.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.020>

**CellPress**

## Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling

Milena Monteiro-Sepulveda,<sup>1,2,6</sup> Sothea Touch,<sup>1,3,6</sup> Carla Mendes-Sá,<sup>3,6</sup> Sébastien André,<sup>1,3,6</sup> Christine Poitou,<sup>1,3,5,6</sup> Omran Allatif,<sup>1,3,6</sup> Aurélie Cotillard,<sup>1,3,6</sup> Hélène Fohrer-Ting,<sup>1,2</sup> Edwige-Ludwiwyne Hubert,<sup>1,2,6</sup> Romain Remark,<sup>2,4</sup> Laurent Genser,<sup>1,3,5,6</sup> Joan Tordjman,<sup>1,3,6</sup> Kevin Garbin,<sup>1,2</sup> Céline Osinski,<sup>1,2</sup> Catherine Sautés-Fridman,<sup>2,4</sup> Armelle Leturque,<sup>1,2,6</sup> Karine Clément,<sup>1,3,5,6,\*</sup> and Edith Brot-Laroche<sup>1,2,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMRS 1138 and UMRS 1166, F-75005 Paris, France

<sup>2</sup>INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75005 Paris, France

<sup>3</sup>INSERM, UMRS 1166, Nutriomics team 6, F-75013 Paris, France

<sup>4</sup>Université Paris Descartes-Paris 5, UMRS 1138, F-75006 Paris, France

<sup>5</sup>Assistance Publique Hôpitaux de Paris, AP-HP, Pitié-Salpêtrière hospital, Nutrition and Endocrinology Department and Hepato-biliary and Digestive Surgery Department, F-75013 Paris, France

<sup>6</sup>Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Pitié-Salpêtrière Hospital F-75013, Paris, France

\*Correspondence: [karine.clement@psl.aphp.fr](mailto:karine.clement@psl.aphp.fr) (K.C.), [edith.brot-laroche@crc.jussieu.fr](mailto:edith.brot-laroche@crc.jussieu.fr) (E.B.-L.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.020>

### SUMMARY

In obesity, insulin resistance is linked to inflammation in several tissues. Although the gut is a very large lymphoid tissue, inflammation in the absorptive small intestine, the jejunum, where insulin regulates lipid and sugar absorption is unknown. We analyzed jejunal samples of 185 obese subjects stratified in three metabolic groups: without comorbidity, suffering from obesity-related comorbidity, and diabetic, versus 33 lean controls. Obesity increased both mucosa surface due to lower cell apoptosis and innate and adaptive immune cell populations. The preferential CD8 $\alpha$  $\beta$  T cell location in epithelium over lamina propria appears a hallmark of obesity. Cytokine secretion by T cells from obese, but not lean, subjects blunted insulin signaling in enterocytes relevant to apical GLUT2 mislocation. Statistical links between T cell densities and BMI, NAFLD, or lipid metabolism suggest tissue crosstalk. Obesity triggers T-cell-mediated inflammation and enterocyte insulin resistance in the jejunum with potential broader systemic implications.

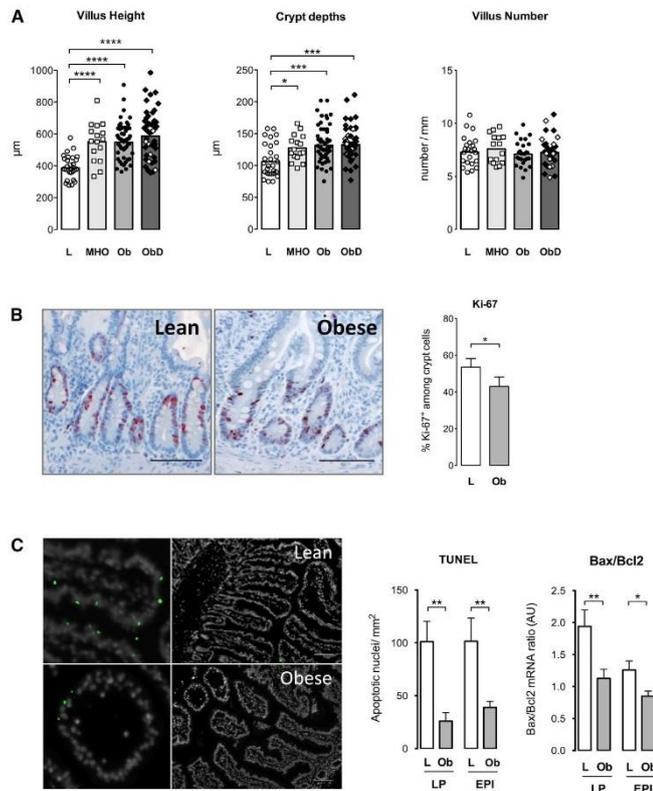
### INTRODUCTION

In obesity, systemic and tissue low-grade inflammation contribute to metabolic disorders leading to type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Ganeshan and Chawla, 2014; Johnson and Olefsky, 2013; Vajro et al., 2013). In humans, the current concepts suggest that the visceral adipose tissue is a major source of inflammation from the accumulation of inflammatory macrophages, NK cells, and mast cells, as well as T cells (Cancello et al., 2006; Dalmás et al., 2014; Divoux et al., 2012; Duffaut et al., 2009; O'Rourke et al., 2009; Weisberg

et al., 2003; Zeyda et al., 2007). In mouse adipose tissue, the accumulation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells contribute to macrophage recruitment and activation (Nishimura et al., 2009). In addition, in human and mouse, regulatory T cells are diminished in obesity thereby lowering anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects (Deiuliis et al., 2011; Eller et al., 2011; Feuerer et al., 2009). In liver, the pro-inflammatory cytokine tonus and insulin resistance associate with NAFLD (Tran and Gual, 2013). Many inflammatory mediators have been studied, and TNF- $\alpha$  was the first cytokine identified that alter insulin sensitivity of tissues, at least in rodents (Gregor and Hotamisligil, 2011; Hotamisligil et al., 1993). In human obesity, the contribution of the intestinal immunity has yet received little attention, despite the large size of the gut as a lymphoid tissue (Brandtzaeg et al., 1989). This is particularly intriguing in the jejunum, which is an intestinal segment where insulin is a regulator of lipid and sugar absorption (Ait-Omar et al., 2011; Haidari et al., 2002; Tobin et al., 2008). Therefore, jejunal function is a potential target for local inflammation and insulin resistance in enterocytes.

The challenging function of the immune system of the gut is to maintain tolerance to luminal antigens from food and commensal microbes while maintaining efficient immunity against pathogens (reviewed in Cheroutte et al., 2011). This relies on a precise organization of immune cells in the different layers of the intestinal mucosa. Immune cells colonize the lamina propria and epithelium as well as gut-associated lymphoid structures like Peyer's patches, isolated lymphoid follicles (ILFs), and draining mesenteric lymph nodes to constitute the intestinal immune barrier. Whereas T cells reside throughout the mucosa, innate immune cells and B cells are mainly located in the lamina propria and lymphoid structures (reviewed in Izcue et al., 2009; Schulz and Pabst, 2013). Epithelial T cells, mainly CD8<sup>+</sup> T cells, are more abundant in the small than in the large intestine, which is probably related to the different antigen challenge they face from food antigens in the small intestine to microbial antigens in the lower gut (Melgar et al., 2002).

Indeed, gut inflammation and loss of tolerance may lead to severe bowel inflammation or cancer (Izcue et al., 2009; Wang and



**Figure 1. Increased Mucosa Size Is Related to Decreased Apoptosis in Obesity**

Lean subjects (L, n = 22–28, open circle) were compared to metabolically healthy obese (MHO, n = 15–17, open square), obese with at least a comorbidity (Ob, n = 26–55, black circle), and obese diabetic subjects (ObD, n = 21–50, black diamond), including the untreated (ObD-ut, n = 10, open diamond).

(A) Morphology parameters were measured in jejunal sections (5 μm thick, 10–200 mm<sup>2</sup>) of the crypt-villus axis: villus heights (μm, left), crypt depths (μm, middle), and number of villi per mm mucosa length taken at stromal tissue junction (right, 6–12 aligned villi, 2–4 histology images). Figure S1 shows enterocyte and goblet cell densities (n/mm<sup>2</sup>), villus widths, villus/crypt length ratios, and villi surfaces. Results are given as scatter plot with bar at geometric mean.

(B) Representative images of proliferating Ki-67<sup>+</sup> cells and quantification (mean ± SEM) obtained in L (n = 12), Ob (n = 15), and ObD (n = 17) groups.

(C) Representative images of TUNEL assay in crypt-villus axis (right) with magnification (left) and quantification (mean ± SEM) of apoptotic nuclei (n/mm<sup>2</sup> mucosa, 12–16 images) performed in the lamina propria (LP) and the epithelium (EPI) of subjects displaying short (L, n = 5) and long (Ob, n = 5) villi. Scale bar 100 μm.

(D) qRT-PCR of Bax and Bcl2 apoptosis markers of L (n = 7) and Ob (n = 20) expressed as Bax/Bcl2 ratio. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance of Mann-Whitney test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, and \*\*\*\*p < 0.0001.

obesity triggers jejunal inflammation and a marked attraction of T cells into the epithelium. T cells impacted the insulin response of enterocyte, consistent with an altered location of the GLUT2 sugar transporter. At a broader level, statistical links were established between jejunal T cell densities and metabolic phenotypes of obese subjects.

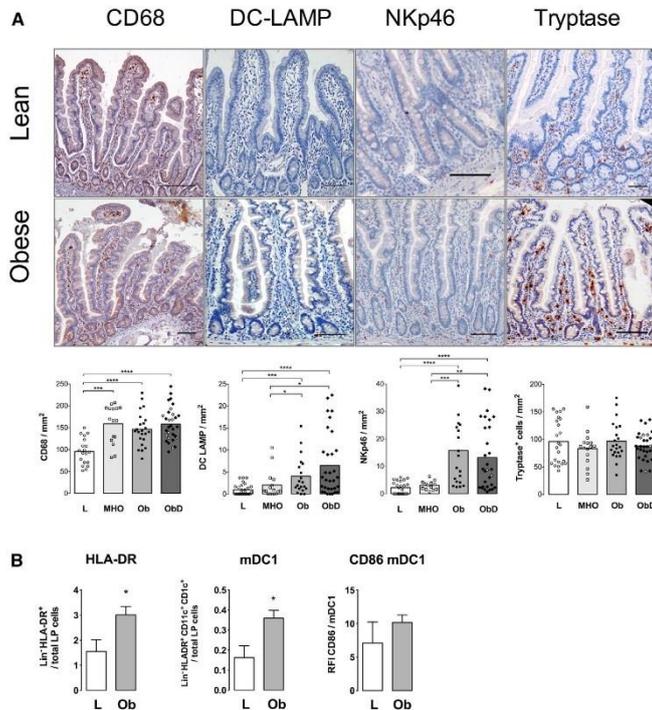
## RESULTS

### Intestinal Mucosa Hyperplasia Is Related to Decreased Apoptosis in Obesity

The villus heights and related epithelial surface are key factors that determine the exchanges of the intestinal mucosa with luminal contents and consequently the size of the immune compartment. Morphological features were measured in 28 lean and 122 obese subjects stratified by metabolic status (Figure 1A). Jejunal villus heights (583 ± 12 μm versus 395 ± 14, p < 0.0001) and crypts depths (134 ± 3 μm versus 109 ± 5, p < 0.0001) increased in all obese versus lean groups. The villus widths (117 ± 2 μm) and number of villi per mucosa length (7 ± 0.1 villi/mm, Figure S1A and 1A) were unchanged. Accordingly, villi surface (cylinder-like) calculated from villi heights and widths was 1.5-fold larger (p < 0.0001) in obese groups than in lean groups, independent of metabolic status (Figure S1A). The villus to crypt length ratios (index of

Karin, 2013) with major tissue damage and weight loss. Classical cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells expressing cytokines and cytolytic perforin/Gzmb are rare in the healthy gut (Melgar et al., 2002) but are increased in inflammatory bowel diseases (IBDs) and colitis (Izcue et al., 2009). Interestingly, the prevalence of IBD and cancer, including colorectal cancer, is increased in obesity (Calle and Kaaks, 2004; Versini et al., 2014), suggesting a pro-inflammatory microenvironment of gut mucosa in metabolic disease. In obesity, the inflammatory state of the gut is known essentially from contrasting measures of nitric acid and calprotectin, two fecal markers of intestinal inflammation in colon mucosa (Ding and Lund, 2011) and from reduced microbial gene richness (Cottillard et al., 2013).

Here we provide, in Human, a comprehensive picture of obesity-related alterations of immunity in the jejunum of lean and obese subjects, distinguishing metabolically healthy (MHO) subjects from subjects with at least one comorbidity (Ob) or diabetes (ObD). Immunohistology and flow cytometry analysis were performed to measure potential alterations of jejunal morphology, immune cell location, density, and phenotype in the lamina propria and epithelial compartments. We showed that



**Figure 2. Increased Innate Cell Densities and Maturation of Antigen Presenting Cells in Obesity**

(A) Representative immunohistology images of macrophages (CD68), mature dendritic (DC-LAMP), natural killer (NKp46), and mast (tryptase<sup>+</sup> and chymase<sup>+</sup> in Figure S2A) cells taken in jejunal sections of L (n = 21–23, open circle), MHO (n = 14–16, open square), Ob (n = 18–20, black square), ObD (n = 29–33, black diamond), and ObD-ut (n = 10–12, open diamond) groups. Scale bar 100  $\mu$ m. Dot plots of densities (n/mm<sup>2</sup>, four images) with bars at geometric mean are shown.

(B) Flow cytometry analysis of percent Lin<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells in total lamina propria cells ignoring CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, and CD20<sup>+</sup> cells and percent mDC1<sup>+</sup> cells among total cells and CD86<sup>+</sup> cells among mDC1<sup>+</sup> cells was performed in L (n = 3) and Ob (n = 12) groups. Relative fluorescence intensity (RFI) is the ratio of mean fluorescence intensity (MFI) of anti-CD86 antibodies to isotype controls. Figure S2 shows gating strategy for DC subset analysis (Figure S2B), the quantification of rare CD68<sup>+</sup>DC-Lamp<sup>+</sup> cells (Figure S2C), and a heatmap of correlations between innate cell densities and villus size (Figures S2D and S5). Statistical significance of Mann-Whitney test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, and \*\*\*\*p < 0.0001.

proliferation) increased in obese ( $4.4 \pm 0.1$  p = 0.0036) versus lean ( $3.8 \pm 0.2$ ) groups (Figure S1A). Goblet cell ( $319 \pm 8$  cells/mm<sup>2</sup>) and enterocyte ( $5109 \pm 168$  cells/mm<sup>2</sup>) densities were unchanged in obesity (Figure S1B). Taken together, these results indicate villus hyperplasia increasing the surface of exchange with luminal contents.

Hyperplasia is supported by proliferation or longer lifespan of cells. The Ki-67 proliferation marker was restricted to epithelial cells in crypts (Figure 1B), and the densities of Ki-67<sup>+</sup> cells were lower ( $34 \pm 4$ ; p = 0.0232) in obese versus lean ( $54 \pm 5$ ) groups. Therefore, proliferation could not explain taller villi. To test reduced cell death, a TUNEL assay of apoptotic nuclei was done in subjects with shortest (L, n = 5) and longest (Ob, n = 5) villi. In Ob, apoptosis was reduced by 80% in lamina propria and 60% in epithelium, in both crypt and villus cells. Accordingly, the Bax/Bcl2 expression ratio was decreased (Figure 1C), indicating an anti-apoptotic mechanism triggering jejunal mucosa hyperplasia.

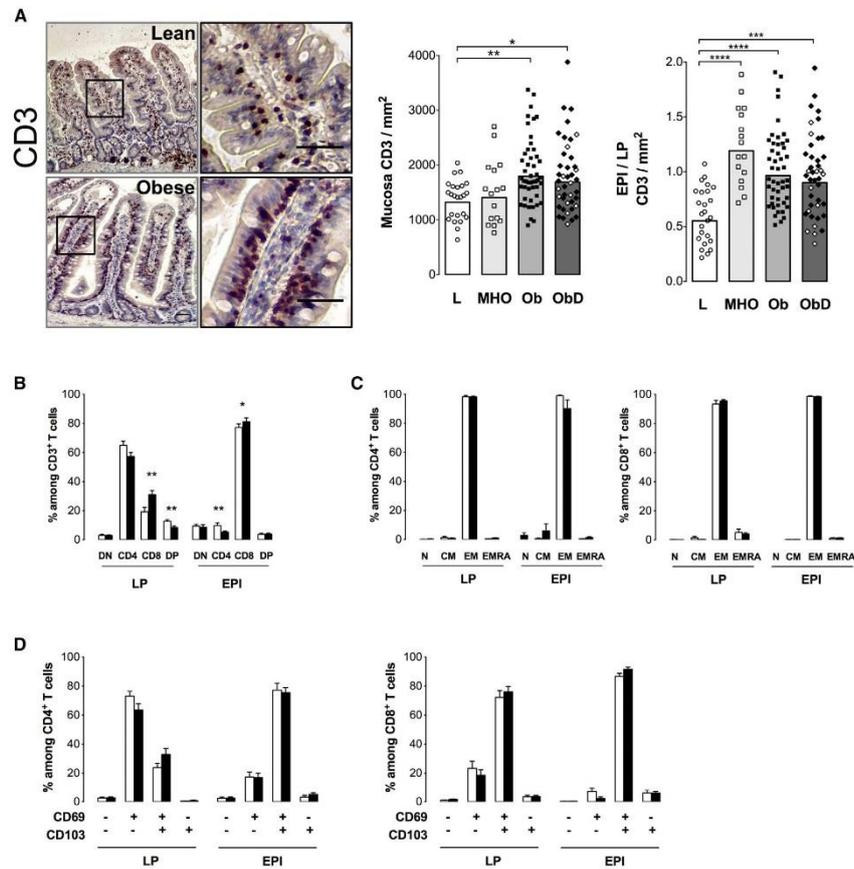
#### Increase Jejunal Innate Cell Densities Depends on Metabolic Status of Obese Subjects

Activation of the innate immune system is relevant to liver, pancreas, and adipose tissue inflammation in obesity (Lumeng, 2013). In the jejunum, innate cell populations were evaluated in 24 lean and 90 obese subjects. The location of innate immune

cells in the lamina propria was unchanged in obesity (Figure 2A). Mast cell densities were similar in lean and obese groups (Figures 2A and S2A). Macrophage density (CD68) increased 1.6-fold in all obese ( $156 \pm 4$  cells/mm<sup>2</sup>, p < 0.0001) versus lean ( $96 \pm 7$ ) groups. In lean subjects, mature DC (DC-Lamp) were nearly absent from the lamina propria, but densities increased 6-fold in Ob ( $4 \pm 1$ , p < 0.0001) and 11-fold in ObD ( $8 \pm 2$ , p < 0.0001) groups, including some rare double positive CD68<sup>+</sup>DC-Lamp<sup>+</sup> cells (Figure S2C). In flow cytometry analysis, the frequency of Lin<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells and mDC1 (Lin<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) increased, consistent with elevated mature DC (Figures 2B and S2B). However, the expression of CD86 costimulatory molecule among mDC1 cells suggested a similar activation in lean and obese subjects. The mDC2 (Lin<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup>) and pDC (Lin<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD303<sup>+</sup>) subsets were undetectable (Figure S2B). Similarly, NKp46<sup>+</sup> cell density ( $14 \pm 2$ ) was increased 7.3-fold (p < 0.0001) in Ob and ObD versus L ( $2.2 \pm 0.5$ ) groups. Interestingly, innate cell densities appear to correlate with mucosa size (Figure S2D). Moreover, mature DC and NK cell densities were similar in MHO and L groups contrasting with their large increase in metabolically altered Ob and ObD group. Thus, jejunal innate immunity is enhanced in obesity with local and metabolic impact.

#### Obesity Increases the Density of Jejunal T Cells in Epithelium

Since innate cells are increased in the jejunal mucosa, a concomitant change of adaptive immunity can be anticipated. B cell densities ( $CD20$ ;  $16 \pm 1$  cell/mm<sup>2</sup>) sitting in lamina propria around proliferating crypts were unaltered in obesity (Figure S3A). In



**Figure 3. Obesity Increases the Density of Jejunal T Cells in Epithelium**

(A) Representative immunohistology of CD3<sup>+</sup> T cells in lean and obese subjects (left images) and magnifications at mid-villus (right images) showing their distribution between epithelium (EPI) and lamina propria (LP). Scale bar, 50  $\mu$ m. T cell densities (cell/mm<sup>2</sup>) in total mucosa and EPI/LP ratios were calculated for L (n = 24, open circle), MHO (n = 17, open square), Ob (n = 52, black square), ObD (n = 49, black diamond), and ObD-ut (n = 12, open diamond) groups. Results are given as dot plots with bar at geometric mean. **Figures S3A, S3B, S3C, and S5** show B cell densities (CD20), CD3<sup>+</sup> T cell densities in EPI or LP and correlations between T cell and innate cell densities.

(B–D) Flow cytometry analysis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in LP and EPI.

(B) The % of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, double positive (DP) and double negative (DN) T cells were analyzed among T cells of L (n = 18, open bar) and Ob (n = 27, black bar) groups. Results in Ob and ObD groups were statistically similar and merged. **Figures S3D and S3F** show a representative gating strategy of T cell phenotyping and percentage of  $\gamma\delta$  T cells.

(C) Memory status of T cells of L (n = 4 LP & n = 9 EPI) and Ob (n = 13 LP & n = 22 EPI) subjects—i.e., naïve (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), CM (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), EM (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), and EMRA (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) profiles.

(D) Percentage CD69<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> among T cells of L (n = 12, open bar) and Ob (n = 20, black bar) groups. **Figure S3E** shows percentage of CD62L<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, and CD25<sup>+</sup> cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of Mann-Whitney test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, and \*\*\*\*p < 0.0001.

contrast, total T cell density (CD3/mm<sup>2</sup>) in Ob and ObD (**Figure 3A**) increased 1.3-fold (1,840  $\pm$  70, p = 0.0004) as compared to L (1,370  $\pm$  70) groups. Most striking was the increase of intra-epithelial T cell densities in obesity increasing by 1.4-fold in MHO (1,580  $\pm$  140, p = 0.0196) and 1.6-fold in Ob (1,830  $\pm$  70, p < 0.0001) versus lean (1,120  $\pm$  90) groups (**Figure 3B**). In the lamina propria, T cell density was similar in lean (L) (1,960  $\pm$  80) and Ob+ObD (1,760  $\pm$  100) groups but was lower in MHO

(Figure S3B). Accordingly, the epithelial to lamina propria (EPI/LP) density ratios increased by 2.0-fold ( $p < 0.0001$ ) in obesity. However, diabetes per se did not alter further T cell densities than in the non-diabetic obese group. These observations reveal a preferential location of T cells in the epithelium, a hallmark of obesity in the jejunum. Correlation analysis between innate and adaptive cells further highlighted the interaction of mature DC in lamina propria with T cells in epithelium (Figures S3C and S5).

Characterization of the differentiation, homing, and activation of T cells was performed by flow cytometry, comparing T cell phenotypes in lamina propria and epithelium of 23 obese and 17 lean subjects. CD4 and CD8 T cell proportions were similar in Ob and ObD groups, indicating no marked impact of diabetes per se on T cell phenotype (pooled data; Figure 3B). CD8 proportions among T cells increased, indicating that they contribute to a global increase of T cells in obesity (Figure 3B). In contrast, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells (DP) and CD4<sup>+</sup> T cell proportions decreased (Figures 3B and S3D). The  $\gamma\delta$  T cells were a small and unaltered T cell population in the jejunal mucosa of obese subjects (Figure S3F). In humans, expression of CD45RA is a marker of naive versus memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell. Additional functional subsets of CD45RA<sup>+</sup> or CD45RA<sup>-</sup> T cells are defined by lymph node homing receptors CCR7 and CD62L. Naive T cells are CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>. Terminally differentiated effector T cells (TEMRA cells) are CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T cells. CD45RA<sup>-</sup> memory T cells are subdivided CCR7<sup>+</sup> central memory (CM) cells, able to migrate to lymphoid tissue, as opposed to CCR7<sup>-</sup> effector memory (EM) cells in tissues. In the jejunum of lean and obese groups, T cells were predominantly CD45RA<sup>-</sup> memory T cells (Figure 3C). In addition, over 70% CD8 T were CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>, consistent with non-lymphoid organ cell homing (Figures 3D and S3E) and effector resident memory T cell phenotype. Memory phenotypes were similar in lean and obese groups, suggesting that the trafficking and homing of T cells toward secondary lymphoid tissue are unaltered. In addition, obesity did not change the expression of CD27 and CD28 co-stimulatory molecules (Figure S3E). T cells did not express CD25 (Figure S3E) relevant to an absence of proliferation in the lamina propria (Ki-67, Figure 1). Thus, the differentiation and activation profiles of T cells appear similar in lean and obese groups, but the proportion of CD8 T cells is increased in obesity. In addition, CD8 T cells displayed better equipment for intestinal attraction and homing.

#### In Obesity, Intra-Epithelial T Cell Enrichment Is by CD8 $\alpha\beta$ Cells

As CD8 $\alpha\beta$  T cell coreceptor denotes increased T cell sensitivity to antigen as opposed to CD8 $\alpha\alpha$  corepressor effect (Cheroutre et al., 2011), a first evaluation of T cell activation was performed by immunofluorescence analysis of  $\alpha\beta$  and  $\alpha\alpha$  CD8 co-receptors in T cells in the lamina propria and epithelium of 13 lean and 108 obese subjects (Figure 4A). In the lamina propria, CD8 $\alpha\beta$  T cell densities were higher in Ob ( $384 \pm 41$  n/mm<sup>2</sup>,  $p = 0.0176$ ) and ObD ( $360 \pm 47$ ,  $p = 0.0472$ ) groups than in L ( $216 \pm 61$ ). Epithelial CD8 $\alpha\beta$  T cell densities increased by 2.5- and 2.0-fold, respectively, in Ob ( $1,530 \pm 129$ ,  $p < 0.0001$ ) and ObD ( $1,219 \pm 109$ ,  $p = 0.0002$ ) groups but were similar in MHO ( $949 \pm 225$ ) and L ( $622 \pm 225$ ) groups, indicating that CD8 $\alpha\beta$  T cells are main contributors to the increase of epithelial CD8 T cells. Concomitantly,

CD8 $\alpha\alpha$  T cell densities decreased both in the epithelium (L  $801 \pm 113$  n/mm<sup>2</sup>; MHO  $308 \pm 68$ ; Ob  $352 \pm 31$ ; ObD  $416 \pm 60$ ) and lamina propria (L  $477 \pm 84$ ; MHO  $221 \pm 54$ ; Ob  $195 \pm 25$ ; ObD  $237 \pm 36$ ). Accordingly, the 4-fold ( $p < 0.0001$ ) increase of CD8 $\alpha\beta$ /CD8 $\alpha\alpha$  density ratio in obesity, including in MHO subjects, suggested that the favored epithelial CD8 $\alpha\beta$  T cell location is independent of the metabolic status of obese subjects.

To further evaluate the potential cytotoxicity of CD8 $\alpha\beta$  T cells, we performed an immunofluorescence analysis of Granzyme B (GzmB) expression in jejunal cells (Figure 4B). The low number of GzmB<sup>+</sup> cells was consistent with epithelial integrity. However, most GzmB<sup>+</sup> cells were located in CD8-negative cells of the lamina propria and were increased 2.0- and 2.5-fold in Ob and ObD subjects, respectively. Mast and NKp46<sup>+</sup> cells were the major contributors to GzmB<sup>+</sup> cells (Figures S4A and S4B).

#### Obesity Enhances Jejunal Inflammation

The functional relevance of increased immune cell densities was analyzed by qRT-PCR of mRNA expressions of cytokines, chemokines, and costimulation factors in lamina propria and epithelial cell fractions containing immune and non-immune cells (Figure 5A). Cytokines and chemokines (i.e IL-6, IL-17, IL-22, and CCL2 in lamina propria only and IL-23, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and IFN- $\gamma$  in lamina propria and epithelium) increased in obesity. Antigen-presenting (HLA-DR) and costimulation factors (CTLA4 and CD80) were significantly increased only in LP, whereas CD28, ICOS increased in both LP and EPI fractions. CD3 $\epsilon$  mRNA increased consistent with higher CD3 T cell density. These profiles revealed enhanced mucosal inflammation and antigen presentation in the jejunum of obese subjects.

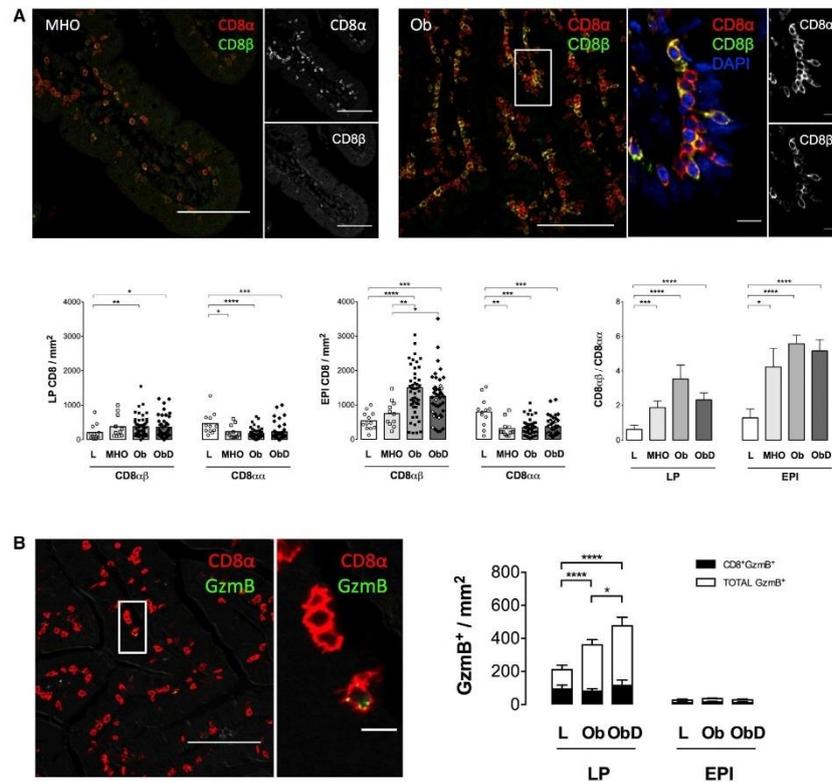
Surprisingly in obesity, renin mRNA increased 70-fold in epithelial cells and angiotensin receptor 2 (AGTR2) tended to increase (Figure 5B). Accordingly, COX2 and IL-17, two downstream targets of the renin angiotensin system (RAS), were increased.

Considering that IL-23 is a regulator of Th17 expansion, we explored jejunal T cell cytokine signature by intracellular staining of Th1 (IFN- $\gamma$ ) and Th17 (IL-17, IL-22) (Figure 5C). IL-17 and IL-22 were increased in CD4<sup>+</sup> T cells of lamina propria. IFN- $\gamma$  production was also increased in obesity due to epithelial CD8 T cells. These results revealed that jejunal immunity is oriented toward proinflammatory responses in obesity.

#### Activated Intestinal T Cells Reduce Enterocyte Insulin Sensitivity in Obesity

Tissue inflammation inhibits cell responses to insulin (Johnson and Olefsky, 2013). To evaluate the functional impact of T cells in the jejunum, we performed an insulin sensitivity assay ex vivo on mucosa explants and in vitro on human Caco-2/TC7 enterocytes in coculture with immuno-selected T cells of obese and lean subjects. The Ser<sup>473</sup>Akt phosphorylation in response to insulin was impaired in jejunal explants of obese but not lean subjects (Figure 6A). Accordingly, soluble factors secreted by activated T cells of obese subjects strongly decreased p<sup>Ser473</sup>-Akt in Caco-2/TC7, indicating that they trigger a loss of enterocyte insulin sensitivity (Figure 6B). We observed no counter-insulin effect with non-activated T cells. Thus, intestinal T cells may contribute to impaired epithelial insulin sensitivity in obesity.

Cytokines and insulin share some steps in their signaling pathways, which may interfere with Akt phosphorylation (Samuel and



**Figure 4. Epithelial CD8 $\alpha\beta$  T Cells Are Enriched in Obese Jejunum**

(A) Confocal images in representative samples showing the distribution of CD8 $\alpha\alpha x$  (red) versus CD8 $\alpha\beta$  (yellow) T cells in the mucosa of MHO (left) and obese Ob (right) subjects. Magnification of boxed epithelial zone (right) with split images of CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  (Scale bar 10  $\mu$ m). Nuclei are labeled with DAPI (blue). Quantification of CD8 $\alpha\alpha x$  and CD8 $\alpha\beta$  T cell densities (cells/mm<sup>2</sup>) in L (n = 13, open circle), MHO (n = 12, open square), Ob (n = 52, black square), ObD (n = 44, black diamond), and ObD-ut (n = 10, white diamond) groups are given as dot plots with bar at geometric mean. Histograms (right) show CD8 $\alpha\beta$ /CD8 $\alpha\alpha x$  T cell density ratios in LP and EPI according to metabolic status.

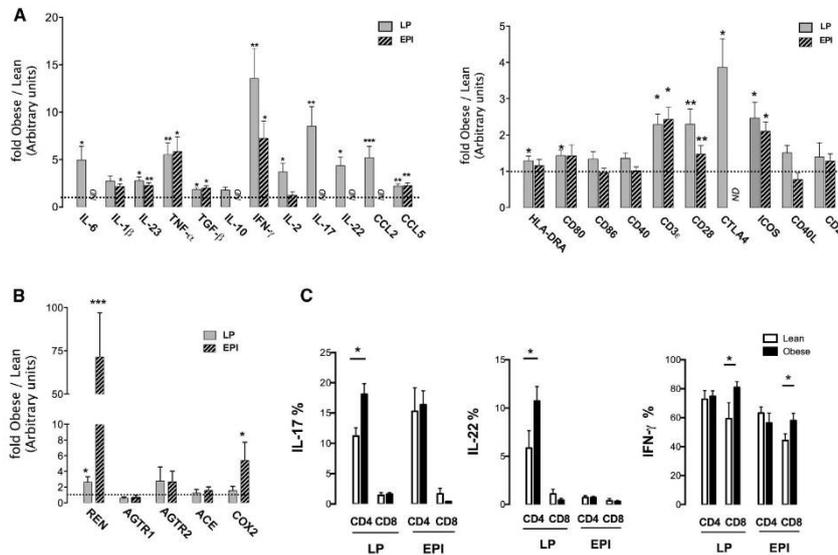
(B) Representative confocal image of GzmB expression (green) in CD8<sup>+</sup> (red) cells in an obese subject. Scale bar 100  $\mu$ m and 10  $\mu$ m. Histograms show the quantification of LP and EPI GzmB<sup>+</sup> CD8 T cells (black bar) and total GzmB<sup>+</sup> (open bar) cells in L (n = 11), Ob (n = 14) and ObD (n = 7) subjects. Figure S4 shows GzmB expression in mast and NKp46 cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of Mann-Whitney test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, and \*\*\*\*p < 0.0001.

Shulman, 2012). When cocultured with Caco-2/TC7, lamina propria T cells of obese subjects secreted more IL-10, IL-9, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-21, IL-17, and IL-22 than T cells of lean subjects. By comparison, epithelial T cells of obese subjects only stimulated IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and GM-CSF secretions (Figure 6C). Added as recombinant molecules in the basolateral culture medium, all upregulated cytokines except IL-10 decreased p<sup>Ser473</sup>-Akt with different potency, confirming their effectiveness in modulating Caco2/TC7 enterocyte insulin sensitivity (Figure 6D). These ex vivo experiments revealed that T-cell-derived proinflammatory cytokines have potential to directly impair intestinal insulin response.

#### T Cell Densities Correlate with Comorbidities in Obesity

To gather information on possible influence of jejunal immunity on metabolism in obesity, we examined statistical links between immune cell densities and a series of clinical parameters (Figures 7 and S6). None of the innate or adaptive cell densities were correlated with subject age (Figure S6; Table S1). We found some associations between innate immune cells and metabolic and inflammatory variables (Figure S6).

Depending on T cell location in the intestinal mucosa, we found several associations between T cells densities and clinical phenotypes related to systemic inflammation (CRP and leucocytes), body weight (BMI, Leptin), lipid variables (Cholesterol,



**Figure 5. Obesity Enhances Inflammatory Responses in Jejunum**

(A and B) Gene expression in immune and non-immune cells isolated from lamina propria (LP) and epithelium (EPI) were analyzed by qRT-PCR in L (n = 13) and Ob (n = 24) subjects. RNA levels are normalized to 18S (arbitrary units, AU). Results are given as fold expression in obese over lean (mean  $\pm$  SEM) in LP (gray bars) and EPI (hatched bars). Non-detected RNA levels are marked ND.

(A) Genes relevant to mucosal immunity.

(B) Genes relevant to the RAS.

(C) Flow cytometry analysis of intracellular labeling of IL-17A, IL-22, and IFN- $\gamma$  cytokines of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from LP and EPI, after PMA and ionomycin stimulation (Lean, n = 8, open bar; n = 20, Ob&ObD, black bar). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of Mann-Whitney test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001.

TG, HDL, and Apo B), and markers of liver alterations (ASAT, ALAT, GGT, and NAS score evaluated by liver histology) (Figure 7A)—all features frequently associated with severe obesity. Importantly, T cell accumulation in the epithelium increased together (positive correlation) with markers of systemic inflammation, corpulence, and liver parameters. Dyslipidemia (reduced HDL cholesterol) was associated to higher epithelial T cell density. The epithelial T cell densities were not correlated to total calorie intake but were correlated to the consumption of an unbalanced diet with reduced percentage CHO in lipid-rich diet (Table S1; Figure S6). This suggests that T cell attraction into the jejunal epithelium is related to an unbalance diet (i.e., lipid versus CHO).

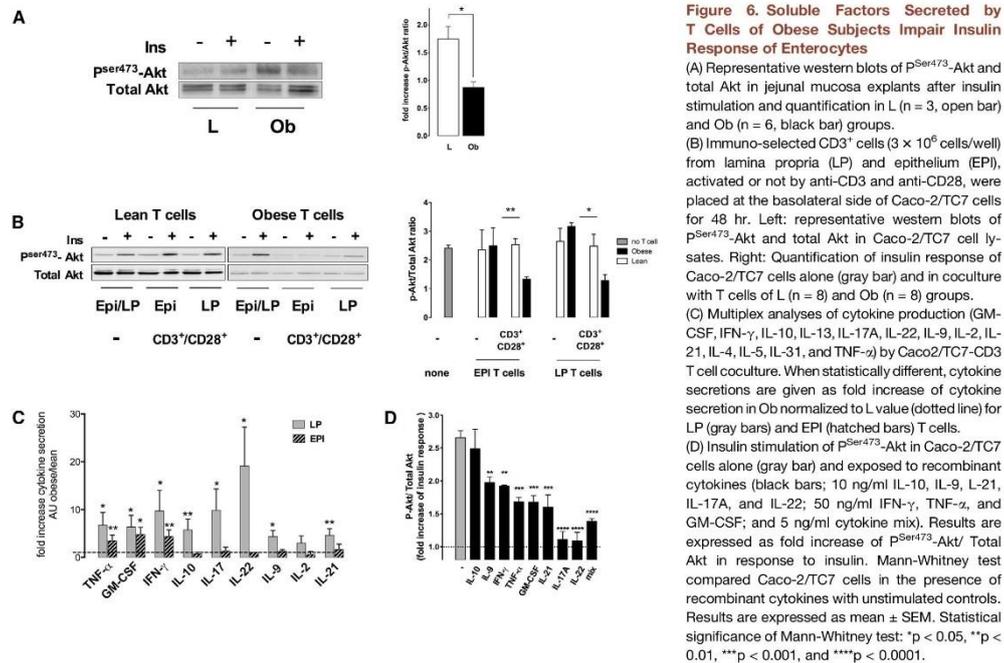
We previously showed that a pathological accumulation of GLUT2 in the apical membrane of enterocytes is a hallmark of insulin resistance. Epithelial CD8 T cell density was increased in subjects displaying pathological apical GLUT2 location, whereas lean and obese subjects with low CD8 T cell densities displayed a similar absence of apical GLUT2 (Figure 7B).

Altogether, the results indicate that T cell attraction in jejunal epithelium correlates with local and systemic comorbidities in obesity.

## DISCUSSION

In the small intestine of morbidly obese humans, the most salient changes were mucosal hyperplasia, increased inflammation, and related impairment of local insulin sensitivity. Yet, jejunal immunity is already altered in subjects without apparent metabolic impairment other than excess weight (MHO). However, type 2 diabetes, regardless antidiabetic treatments, did not further increase jejunal immune cell densities. Although preserving macroscopic mucosa structure, obesity favors proinflammatory T cells attraction in the epithelium. T cells isolated from obese but not lean subjects reduce enterocyte insulin response via proinflammatory cytokines. Local T cell inflammation increases together with obesity comorbidities.

A prominent feature of obesity in the small intestine is the asymmetrical distribution of T cells in favor of an epithelial location independently of metabolic status. Attraction of T cells in epithelium is through CCL5 chemokine and CD103 integrin, increasing epithelial anchoring via E-cadherin (Gebhardt and Mackay, 2012). This is consistent with increased resident T cells driving epithelial inflammation in obesity. In the jejunum of obese subjects, CD8 T cells infiltration can reach up to 50% of epithelial cells through higher CD8 $\alpha\beta^+$  over CD8 $\alpha\alpha^+$

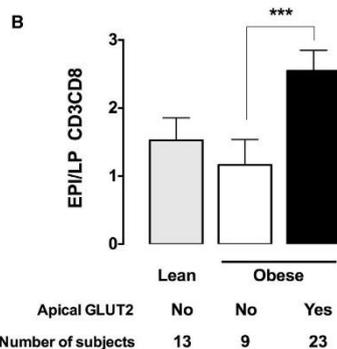
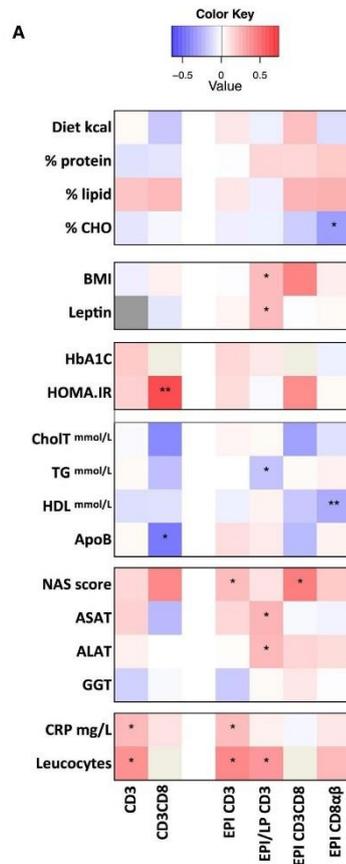


T cell infiltration, meaning oriented immune responses in obesity. In lean conditions, high CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> T cells in epithelium and lamina propria denote a lower capacity to secrete proinflammatory cytokines than CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T cells (Cheroutre et al., 2011). Thus, increased CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> and lower CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> T cells in obesity support local secretion of proinflammatory cytokines.

Increased CD8<sup>+</sup> T cell population is a feature of tissue inflammation in obesity. T cell abundance in adipose tissue is correlated with BMI (Duffaut et al., 2009; Kintscher et al., 2008). Our work shows that the small intestine is also a site of immune remodeling in human obesity, although phenotypic differences concerning cell cytotoxicity appear when compared to other tissues and diseases. GzmB<sup>+</sup> CD8 T cells increase in the epididymal fat of diet-induced obese mice (Yang et al., 2010). High CD8<sup>+</sup> T cell infiltration is found in acute inflammation in IBD, which is a condition of major deregulation of intestinal immune responses. Increased GzmB<sup>+</sup> CD8 T-cell-mediated cytotoxicity in active IBD contributes to decrease intestinal barrier integrity and inflammatory tonus (reviewed in Geremia et al., 2013). Here, the integrity of the jejunal mucosa is preserved despite high epithelial CD8 T cell infiltration, consistent with low and unaltered GzmB expression as reported in healthy subjects (Melgar et al., 2002). Therefore, obesity promotes the infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells without GzmB cytotoxicity in the jejunal epithelium.

In obesity, inflammation contributes to insulin resistance in adipose tissue, liver, muscle, pancreas, and brain. Obesity in-

creases CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell proinflammatory cytokine secretion in adipose tissue and activation of downstream signaling pathways that trigger insulin resistance as shown in rodents (Duffaut et al., 2009; Gregor and Hotamisligil, 2011; Kintscher et al., 2008; Samuel and Shulman, 2012; Yang et al., 2010). The jejunal epithelium (Ait-Omar et al., 2011; Haidari et al., 2002; Tobin et al., 2008) and the duodenum (Veilleux et al., 2014) are sites of insulin action. Here, soluble factors secreted by activated T cells isolated from obese but not lean subjects have the potency in vitro to decrease insulin response in enterocytes. The high density of T cells probably reinforces this phenomenon in obesity. In addition to the known effect of TNF- $\alpha$  on insulin signaling, we show a reduction of enterocyte insulin response by GM-CSF; IFN- $\gamma$ ; IL-9; IL-21; and, most potently, by IL-17 and IL-22. The increase of Th17/Th22 T cells in jejunum is consistent with previous observations in peripheral blood and adipose tissue in obesity (Dalmás et al., 2014; Zhao et al., 2014). In the intestine, IL-17 and IL-22 appear essential to maintain mucosal barrier function. Patients with colitis show Th17/Th22 cell depletion in the mucosa in link with local perturbation of tissue-biopsied microbiota (Leung et al., 2014). On the other hand, the invalidation of IL-22 receptor in mouse colon has deleterious effect on weight gain and blood glucose deregulation (Wang et al., 2014). One might thus speculate that some cytokines such as IL-22 have a “yin yang regulatory effect” in the intestine; a local rise could trigger the protection of mucosa function in human obesity while in the



**Figure 7. Epithelial T Cell Densities Correlate with Subject Comorbidities and Pathological Location of GLUT2 in Obesity**

(A) Heatmap of correlations between T cell densities and clinical variables. For quantitative variables, Pearson or Spearman correlations were used depending on the fulfillment of hypotheses required for parametric tests. Each colored square denotes a correlation at the intersection of columns and lines. Color intensity (color key) indicates the correlation coefficient magnitude using the red color for positive correlation (parameters increase together) and blue for negative correlation (one parameter increases when the other decreases). Significant correlations are identified by stars \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . Full correlation of innate and adaptive cell densities with clinical parameters, including sample sizes, correlation coefficients for each intersection, and p values, are given in Figure S6.

(B) Obese (Ob,  $n = 32$ ) and lean (L,  $n = 13$ ) subjects were sorted according to the location of GLUT2 in the apical membrane of enterocytes (Apical GLUT2). The epithelial to lamina propria (EPI/LP) density ratios of CD3CD8 T cells were calculated according to the presence (yes) or absence (no) of apical GLUT2 in L (no,  $n = 13/13$ ) and Ob subjects (yes,  $n = 23$ ; no,  $n = 9$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of Mann-Whitney test of means between lean and obese: \*\*\* $p < 0.001$ .

meantime it could contribute to local metabolic response impairment. Furthermore, we observed higher IL-10 secretion in jejunal lamina propria T cells in obesity, presumably adding to an already complex intestinal homeostasis (Shouval et al., 2014).

Local inflammation may contribute to jejunal insulin resistance and alter intestinal functions. Here, densities of immune cells increase together with corpulence, leptin, dyslipidemia, and liver dysfunction, suggesting organ crosstalk. Indeed, severe intestinal inflammation in Crohn's disease is associated with intestinal (mesenteric) fat hypertrophy (Peyrin-Biroulet et al., 2007). In rodents, the migration and proliferation of T cells in the intestine promote local inflammation in response to a high-fat diet (Veldhoen and Brucklacher-Waldert, 2012). In humans, lipid-rich diets are often characterized by low carbohydrate content. We show that epithelial T cell accumulation increases in obese subjects consuming a high-fat/low-carbohydrate diet, which display pathological apical GLUT2 in accordance with local insulin resistance from cytokine actions. This is congruent with the correlation between systemic insulin resistance (HOMA-IR) and mucosal T cell infiltration in non-diabetic obese subjects.

We also found a large increase of renin and proinflammatory Cox2 gene expressions in the jejunal epithelium in accordance with enhanced RAS in obesity. RAS activation results in proinflammatory and fibrotic actions in the adipose tissue as well as trophic effects via an unbalanced cell apoptosis/proliferation (Fändriks, 2010). Here, obesity-related RAS activation may have trophic effect on human small intestine via villi hyperplasia and decreased apoptosis.

Whereas observational by nature, this is a human comprehensive study underscoring the part played by the upper intestine in obesity-related inflammation. The innate and adaptive immune responses of the absorptive intestine may be an efficient protective mechanism against luminal challenges. The specific increase of Th17/Th22 T cells raises new hypothesis for targeted therapy. Modulating intestinal inflammation in relation to nutrient and jejunal microbiota might be a future goal to gain control on whole-body metabolic deterioration.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Human Subjects and Jejunal Tissue Sampling

Obese subjects (218 jejunal samples from 185 obese and 33 lean) were stratified according to their metabolic status based on the IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome (<http://www.idf.org/metabolic-syndrome>) adding insulinemia ( $<20$  mU/l) to take insulin sensitivity into account. Three groups were constituted (i) metabolically healthy obese subjects (MHO),  $n = 19$  exempt from cardio metabolic risk displaying a HOMA-IR  $< 3$ , (ii) non-diabetic obese subjects with at least one comorbidity (Ob,  $n = 97$ ), and (iii) type 2 diabetic obese subjects (ObD;  $n = 69$ ) either receiving antidiabetic treatment or untreated (ObD-ut,  $n = 16/69$ ).

A lean group (L;  $n = 33$ ; BMI =  $22$  kg/m<sup>2</sup> [range 19–25]) was constituted with either jejunal biopsy donors ( $n = 5$ ) (double balloon endoscopy; normal histopathology; absence of anti-inflammatory treatment) or jejunal samples taken at distance of pancreatic or gastric tumor during duodenal resection in absence of chemotherapy or apparent metabolic consequence ( $n = 28$ ). Available clinical descriptions are in Table S1. Since morphology and immune cell densities in lean subjects were similar whatever the origin of samples, it suggested a low level of confounding inflammation, and data were pooled.

Obese subjects, mainly females, were prospectively recruited between 2006 and 2013 while attending the Nutrition Department at Pitié-Salpêtrière Hospital in the Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN). Patients met the following criteria for obesity surgery: BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> or  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> with at least one comorbidity (hypertension, type 2 diabetes, dyslipidemia, or obstructive sleep-apnea syndrome) in agreement with international and national guidelines. Preoperative evaluation of subjects included detailed, long-term medical history of obesity and dietary evaluation of calorie and macronutrient intake by a registered dietician. Liver biopsies and staging of liver alterations were performed as in Bedossa et al. (2012). Informed written consent was obtained from all subjects, following French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet). The Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale Ile de France 1 approved the study, which was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and registered in a public trials registry (ID Number: CT 0476658; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00476658?term=poitou&rank=1>).

Proximal jejunal samples (60–70 cm distal to the ligament of Treitz) were collected from surgical waste (4 cm). Tissue was rapidly opened, washed in DMEM (1 g Glucose Glutamax + pyruvate + 10% SVF + 1% PS) and kept at 4°C before cell isolation, fixation and paraffin imbedding, or freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Immunohistology

Immunohistology of jejunum (5  $\mu\text{m}$  paraffin-embedded tissue sections) was performed in 28 lean (BMI: 19–25 kg/m<sup>2</sup>) and 122 obese (BMI: 35–68 kg/m<sup>2</sup>) patients, including 18 MHO, 55 Ob, 37 ObD, and 12 ObD-ut subjects. Primary antibodies were tryptase (AA1), CD68 (KP1), DC-LAMP (1010E1.01), CD20 (L26), Ki-67 (MIB-1), and CD3 rabbit polyclonal (A0452) (DAKO); chymase (422818) and Nkp46 (MAB1850) (R&D Systems); CD8 $\alpha$  (SP16) (Spring biosciences); CD4 (Ab8 clone 4B12) (Thermo Scientific); and CD8 $\beta$  (SC25277) (Santa-Cruz). Primary antibodies or corresponding isotype were incubated for 1 hr at RT and revealed with a streptavidin biotin peroxidase kit (BioSpa GMR4-61), DAB staining (DAKO), and nuclei hematoxylin counterstaining (Vector). Images were obtained by conventional microscopy or whole slide imaging for rare events (Nanozoomer, Hamamatsu). For immunofluorescence analysis, primary antibodies were revealed with secondary antibodies coupled to fluorophores (SouthernBiotech) and images acquired by confocal microscopy (LSM710 Zeiss) (Ait-Omar et al., 2011). Number of villi per mm mucosa, villus width, crypt to tip height, crypt depth ( $\mu\text{m}$ ), lamina propria, and epithelial immune cell densities (cell/mm<sup>2</sup>), excluding lymphoid structures, were analyzed in longitudinal sections of mucosa in two to four fields (ImageJ 1.46c).

### Cell Isolation

The jejunal mucosa was dissected and minced prior incubation in chelating buffer (5 mM EDTA, 2 mM DDT, PBS; 20 min; 37°C). Released epithelial cells were filtered through 70  $\mu\text{m}$  mesh cell strainers, centrifuged (600  $\times$  g at 4°C for 5 min), and recovered in complete DMEM (10% FCS, 1% PS). Sucrase activity, used as a witness of enterocyte contamination of lamina propria by epithelial cells, was below 2% of total mucosa activity. Epithelial immune cells were en-

riched at the interface of a 40%/70% Percoll gradient (GE Healthcare Life Sciences). Cells of the lamina propria, including lymphoid tissue, were isolated from fibrous matter by collagenase D digestion (1 mg/ml, Roche; 2 hr, 37°C). Red blood cells were removed in lysis buffer (154 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, and 0.1 mM EDTA). Freshly isolated cells were used for flow cytometry analysis of immune subsets.

### Cell Surface Markers and Intracellular Cytokine Staining

To characterize lamina propria and epithelial cells, freshly isolated cells were retrieved in FACS buffer (PBS, 2% FCS, 2 mM EDTA) and stained (30 min, 4°C, dark) with the following antibodies: FITC-anti-CD8 (SK1; BioLegend), APC-AlexaFluor750-anti-CD27 (CLB-27/1; Invitrogen), EDC-anti-CD45RA (2H4LDH11LDB9; Beckman Coulter), AlexaFluor700-anti-CD3 (UCHT1), BV421-anti-CD4 (RPA-T4), PE-anti-CD25 (M-A251), PE-anti-CD28 (CD28.2), PE-anti-CD56 (B159), APC-anti-CD62L (DREG-56), APC-H7-anti-CD69 (FN50), PE-anti-CD103 (Ber-ACT8), PE-Cy7-anti-CCR7 (3D12), and APC-anti- $\gamma\delta$ TCR (B1) (BD Biosciences). DC populations were identified using a lineage (Lin) mixture of VioGreen-conjugated mAb against CD56 (HCD56; BioLegend), CD20 (LT20), CD3 (BW264/56), and CD14 (TUK4) with CD45-APC-Vio770 (5B1), HLA-DR-PerCP (AC122), CD11c-APC (MJ4-27G12), CD11c-PE (AD5-8E7), CD303-FITC (AC144), CD141-VioBlue (AD5-14H12), and CD86-PE-Vio770 (FM95) (Mitenyi Biotec) plus a dead cell viability marker (eBioscience). For intracellular cytokine analysis, cells were stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate and ionomycin in the presence of GolgiStop (Dalmas et al., 2014). Cells were stained (30 min, 4°C, dark) with anti CD45, CD3, CD4, and CD8 surface markers plus a fixable viability marker; fixed; and made permeable with Foxp3 fixation/permeabilization kit (eBioscience) prior incubation with PE-anti-IL-17A (eBio64CAP14), PE-Cy7-anti-IL-22 (22URT1) (eBioscience), and FITC-anti-IFN- $\gamma$  (4S.B3, BD Biosciences) or isotype-control mAbs. Cells were analyzed on a LSRII flow cytometer (BD Biosciences) using FACS Diva software (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo 10.0.6 (Tree Star).

### Coculture of Caco-2/TC7 Enterocytes with Jejunal T Cells and Cytokine Assay

Lamina propria and epithelial T cells were immuno-selected from jejunal cell suspensions by CD3 positive selection (Mitenyi Biotec). Human Caco-2/TC7 enterocytes were grown on Transwell filters (Costar, Corning) (Tobin et al., 2008) until differentiation and placed for 48 hr on top CD3<sup>+</sup> T cells in wells coated with anti-CD3 (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; UCHT1, eBioscience) containing 15 mM glucose complete DMEM and anti-CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 37407; R&D Systems). After the 48 hr, cytokines were analyzed in basolateral supernatant by a 13 MILLIPLIX Human Th17 Panel (X-MAP technology, Millipore) (i.e., GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-31, and TNF- $\alpha$ ).

### Insulin Sensitivity Assay

Fresh jejunal mucosae from lean and obese subjects were pre-incubated in serum-free DMEM for 30 min prior insulin stimulation (15 mU/ml DMEM, 10 min, 37°C). Sample homogenization (Fast Prep MP24) was performed in ice-cold lysis buffer (Millipore) containing an anti-phosphatase and anti-protease inhibitor cocktail (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche diagnostics) (Ait-Omar et al., 2011)). The insulin stimulation of Caco-2/TC7 cells was performed at the end of 48 hr coculture with isolated T cells or after a 24 hr challenge with recombinant cytokines keeping in proportions found in coculture cytokine secretion assays or with a mix of 5 ng/ml cytokine to evaluate additive effects. Insulin action was assayed in half of filters, and the other half was kept as a control. Cell lysis in ice-cold buffer (1% Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20 mM Tris [pH 7.4], anti-phosphatase, and anti-protease inhibitors). Protein (50  $\mu\text{g}$ , BCA, Uptima) homogenates were denatured in 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, and 10%  $\beta$ -mercaptoethanol and were analyzed by western blot for P-ser<sup>473</sup>Akt and total Akt (Cell Signaling) using ECL (Pierce ECL2 Substrate). Quantification of immuno reactive bands was by a LAS 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) imaging densitometer and Multigauge software (Fujifilm corporation).

### RNA Analysis

Total RNA of lamina propria and epithelial fractions were extracted with the RNeasy Mini kit (QIAGEN). RNA concentration and quality were assessed

(2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) before reverse transcription of 1  $\mu$ g total RNA (Applied Biosystems) and qPCR. RNA quality, quantity, and RT efficiency were normalized to ribosomal 18S RNA.

#### Statistical Analyses

Results are presented as mean  $\pm$  SEM or scatter plots with bar at geometric mean, and means were compared by a Mann-Whitney test (Graphpad Prism, GraphpadSoftware). Correlations analyses were done using the R statistical software and the graphical gplots package. Data were transformed using the Boxcox algorithm when response variable transformation was improving the model linearity based on the log likelihood criterion. Correlations were performed with the Pearson parametrical test when the required hypotheses of normality (either Shapiro-Wilk or Kolmogorov-Smirnov test, depending on the sample size), linearity (95% CI on the Boxcox lambda parameter), and homoscedasticity (Breusch-Pagan test) were fulfilled. The Spearman's rho statistic was calculated otherwise. Heatmaps were produced from the correlation coefficients using "heatmap.2" in the gplots package. A p value less than 0.05 was considered statistically significant and coded as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.020>.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.M.-S., S.T., C.M.-S., A.C., L.G., E.-L.H. J.T., H.F.-T., K.G., C.O., and R.R. collected data and contributed to discussion. A.C. and O.A. were in charge of statistical analysis of the study. C.P. and K.C. contributed to patient recruitment and coordinated clinical investigation, patient phenotyping and sample collection. S.A., C.S.-F., K.C., A.L., and E.B.-L. contributed to study conceptualization and participated in writing and reviewing the manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank patient in the clinical investigation program for their participation. The authors acknowledge the contribution of gastroenterologist (D. Lamarque) and surgeons L. Hannoun, J.C. Vaillant, J.-L. Bouillot, and A. Torcivia at AP-HP Pitié Salpêtrière and Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France and A. Sepulveda AP-HP St Antoine hospital for the sampling of patient tissue during gastric surgery. F. Marchelli and V. Lemoine (Nutrition Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France) were in charge of patient database management. We thank the undergraduate students D. Santangelo, A. Rescurio, and L. Estevez for their contribution to immunohistochemistry analysis. Imaging and cytometry acquisitions were performed at the Centre d'Imagerie Cellulaire et de Cytométrie, Centre de Recherche des Cordeliers UMRS 1138, Paris, France as a core facility in Université Pierre et Marie Curie Flow Cytometry network and at the core facility of IHU ICAN with A. Gestin for additional DC FACS analysis. We thank J. Goc Centre de Recherche des Cordeliers UMRS 1138, Paris, France for advice in establishing flow cytometry antibody panels and P. Bedossa AP-HP, Beaujon Hospital, and Centre de Recherche Bichat-Beaujon, INSERM U773, University Paris-Diderot, Paris, France for scoring liver pathology in morbidly obese subjects.

ANR-ALIA 007-01 Nutra2sense, INSERM, Pierre & Marie Curie P6, René Descartes P5 universities and CNRS supported this work. This work has benefited from a French government grant managed by the National Agency for Research "Investments for the Future," reference ANR-10-IAHU, and by the EU-Metacardis FP7 program (grant agreement HEALTH-F4-2012-305312). PhD fellowships were allocated to M.M.-S. by University Pierre & Marie Curie P6, to R.R. by University Paris Descartes P5, and to S.T. by the EU-Metacardis FP7 program. A.C. held a post-doctoral fellowships from ANR-ALIA 007-01, and C.M.-S. was supported by a CORDDIM-IDF postdoctoral fellowship. We thank Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP) and Direction of Clinical research, which promoted and supported clinical investigations (via PHRC 02076).

Received: October 10, 2014

Revised: March 3, 2015

Accepted: May 22, 2015

Published: June 18, 2015

#### REFERENCES

- Ait-Omar, A., Monteiro-Sepulveda, M., Poitou, C., Le Gall, M., Cotillard, A., Gilet, J., Garbin, K., Houllier, A., Château, D., Lacombe, A., et al. (2011). GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes* 60, 2598–2607.
- Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Paradis, V., Tordjman, J., and Clement, K. (2012). Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 56, 1751–1759.
- Brandtzaeg, P., Halstensen, T.S., Kett, K., Krajci, P., Kvale, D., Rognum, T.O., Scott, H., and Sollid, L.M. (1989). Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97, 1562–1584.
- Calle, E.E., and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 4, 579–591.
- Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J.L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar Hen, A., Bedossa, P., et al. (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55, 1554–1561.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 445–456.
- Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., et al.; ANR MicroObes consortium (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585–588.
- Dalmas, E., Venteclef, N., Caer, C., Poitou, C., Cremer, I., Aron-Wisniewsky, J., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J., Kaveri, S.V., Clément, K., et al. (2014). T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 63, 1966–1977.
- Deiuliis, J., Shah, Z., Shah, N., Needleman, B., Mikami, D., Narula, V., Perry, K., Hazey, J., Kampfrath, T., Kollengode, M., et al. (2011). Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. *PLoS ONE* 6, e16376.
- Ding, S., and Lund, P.K. (2011). Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14, 328–333.
- Divoux, A., Moutel, S., Poitou, C., Lacasa, D., Veyrie, N., Aissat, A., Arock, M., Guerre-Millo, M., and Clément, K. (2012). Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1677–E1685.
- Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., Bourlier, V., Decaunes, P., Maumus, M., Chiotasso, P., Sengenès, C., Lafontan, M., Galitzky, J., and Bouloumié, A. (2009). Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1608–1614.
- Eiler, K., Kirsch, A., Wolf, A.M., Sopfer, S., Tagwerker, A., Stanzl, U., Wolf, D., Patsch, W., Rosenkranz, A.R., and Eiler, P. (2011). Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes* 60, 2954–2962.
- Fändriks, L. (2010). The angiotensin II type 2 receptor and the gastrointestinal tract. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 11, 43–48.
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., and Mathis, D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 15, 930–939.
- Ganeshan, K., and Chawla, A. (2014). Metabolic regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 609–634.

- Gebhardt, T., and Mackay, L.K. (2012). Local immunity by tissue-resident CD8(+) memory T cells. *Front. Immunol.* 3, 340.
- Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., and Di Sabatino, A. (2013). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* 13, 3–10.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.
- Haidari, M., Leung, N., Mahbub, F., Uffelman, K.D., Kohen-Avramoglu, R., Lewis, G.F., and Adeli, K. (2002). Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J. Biol. Chem.* 277, 31646–31655.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.
- Izcue, A., Coombes, J.L., and Powrie, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 313–338.
- Johnson, A.M., and Olefsky, J.M. (2013). The origins and drivers of insulin resistance. *Cell* 152, 673–684.
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F., Dragun, D., Skurk, T., et al. (2008). T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1304–1310.
- Leung, J.M., Davenport, M., Wolff, M.J., Wiens, K.E., Abidi, W.M., Poles, M.A., Cho, I., Ullman, T., Mayer, L., and Loke, P. (2014). IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal Immunol.* 7, 124–133.
- Lumeng, C.N. (2013). Innate immune activation in obesity. *Mol. Aspects Med.* 34, 12–29.
- Melgar, S., Bas, A., Hammarström, S., and Hammarström, M.L. (2002). Human small intestinal mucosa harbours a small population of cytolytically active CD8+  $\alpha$  T lymphocytes. *Immunology* 106, 476–485.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 15, 914–920.
- O'Rourke, R.W., Metcalf, M.D., White, A.E., Madala, A., Winters, B.R., Maizlin, I.I., Jobe, B.A., Roberts, C.T., Jr., Slifka, M.K., and Marks, D.L. (2009). Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN- $\gamma$  in inflammation in human adipose tissue. *Int. J. Obes. (Lond)* 33, 978–990.
- Peyrin-Biroulet, L., Chamailard, M., Gonzalez, F., Beclin, E., Decourcelle, C., Antunes, L., Gay, J., Neut, C., Colombel, J.F., and Desreumaux, P. (2007). Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander? *Gut* 56, 577–583.
- Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852–871.
- Schulz, O., and Pabst, O. (2013). Antigen sampling in the small intestine. *Trends Immunol.* 34, 155–161.
- Shouval, D.S., Ouahed, J., Biswas, A., Goettel, J.A., Horwitz, B.H., Klein, C., Muise, A.M., and Snapper, S.B. (2014). Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Adv. Immunol.* 122, 177–210.
- Tobin, V., Le Gall, M., Fioramonti, X., Stolarczyk, E., Blazquez, A.G., Klein, C., Prigent, M., Serradas, P., Cuif, M.H., Magnan, C., et al. (2008). Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 57, 555–562.
- Tran, A., and Gual, P. (2013). Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 37, 17–29.
- Vajro, P., Paoletta, G., and Fasano, A. (2013). Microbiota and gut-liver axis: their influences on obesity and obesity-related liver disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 56, 461–468.
- Veilleux, A., Grenier, E., Marceau, P., Carpentier, A.C., Richard, D., and Levy, E. (2014). Intestinal lipid handling: evidence and implication of insulin signaling abnormalities in human obese subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 644–653.
- Veldhoen, M., and Brucklacher-Waldert, V. (2012). Dietary influences on intestinal immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 696–708.
- Versini, M., Jeandel, P.Y., Rosenthal, E., and Shoenfeld, Y. (2014). Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmun. Rev.* 13, 981–1000.
- Wang, K., and Karin, M. (2013). Common flora and intestine: A carcinogenic marriage. *Cell. Logist.* 3, e24975.
- Wang, X., Ota, N., Manzanillo, P., Kates, L., Zavala-Solorio, J., Eidschinken, C., Zhang, J., Lesch, J., Lee, W.P., Ross, J., et al. (2014). Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* 514, 237–241.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808.
- Yang, H., Youm, Y.H., Vandanmagsar, B., Ravussin, A., Gimble, J.M., Greenway, F., Stephens, J.M., Mynatt, R.L., and Dixit, V.D. (2010). Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J. Immunol.* 185, 1836–1845.
- Zeyda, M., Farmer, D., Todoric, J., Aszmann, O., Speiser, M., Györi, G., Zlabinger, G.J., and Stulnig, T.M. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes. (Lond)* 31, 1420–1428.
- Zhao, R., Tang, D., Yi, S., Li, W., Wu, C., Lu, Y., Hou, X., Song, J., Lin, P., Chen, L., and Sun, L. (2014). Elevated peripheral frequencies of Th22 cells: a novel potent participant in obesity and type 2 diabetes. *PLoS ONE* 9, e85770.

Cell Metabolism, Volume 22

**Supplemental Information**

**Jejunal T Cell Inflammation in Human**

**Obesity Correlates with Decreased**

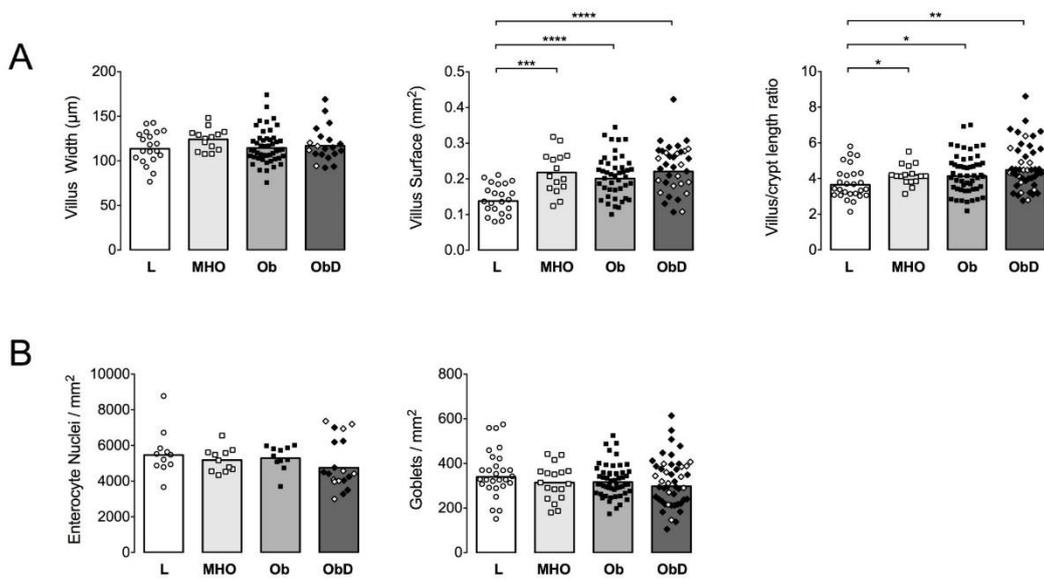
**Enterocyte Insulin Signaling**

Milena Monteiro-Sepulveda, Sothea Touch, Carla Mendes-Sá, Sébastien André, Christine Poitou, Omran Allatif, Aurélie Cotillard, Hélène Fohrer-Ting, Edwige Hubert, Romain Remark, Laurent Genser, Joan Tordjman, Kevin Garbin, Céline Osinski, Catherine Sautès-Fridman, Armelle Leturque, Karine Clément, and Edith Brot-Laroche

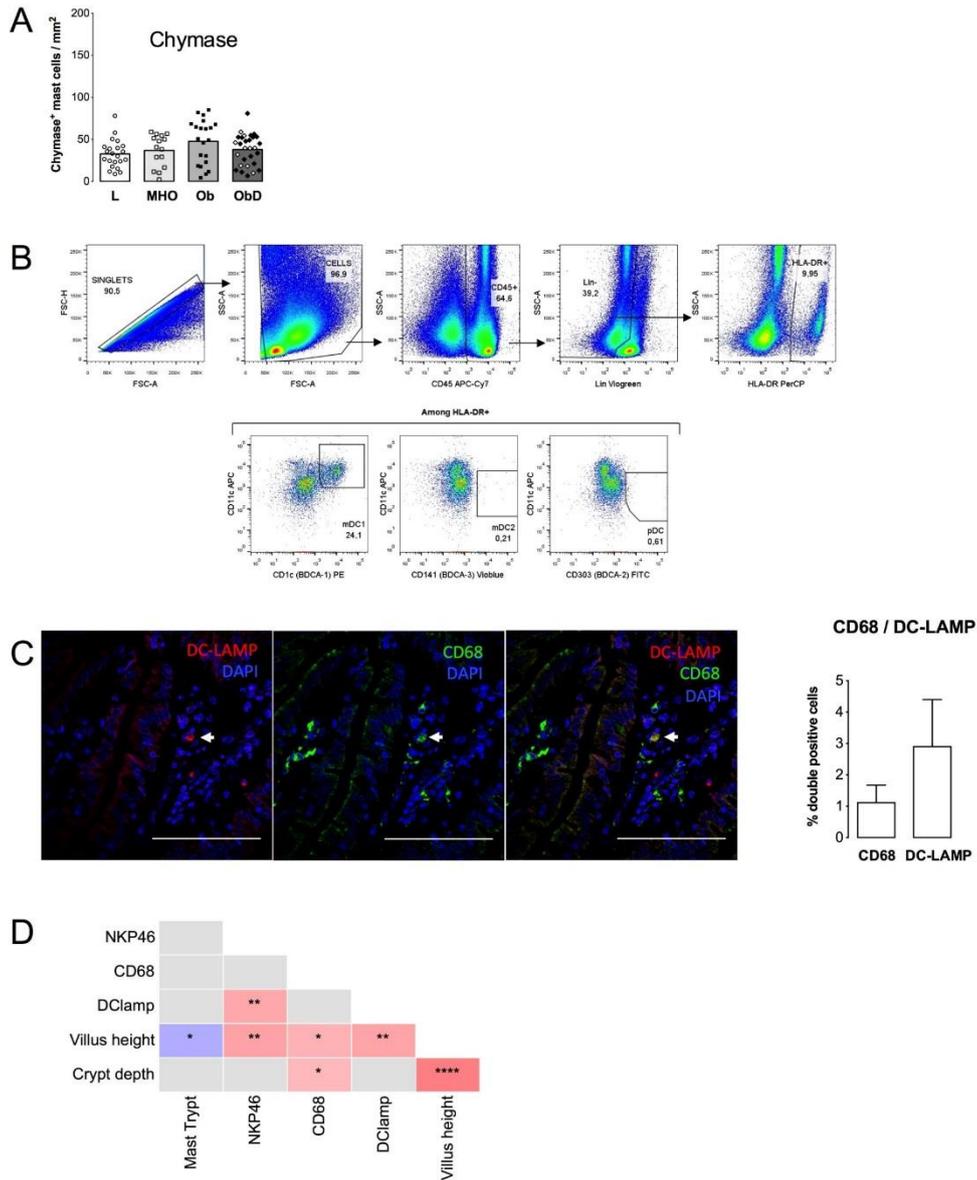
category	N	Lean			Non diabetic obese			Diabetic Obese								
		33			MHO	Ob		Obd TT	Obd UT							
		37			86			77			68			61		
	Sex (%F)	58 ± 3 28 \$\$\$\$			37 ± 2 19			39 ± 1 95 <sup>ns</sup>			50 ± 1 50 <sup>****</sup>			44 ± 3 16 *		
	Age (y)															
Diet	Diet (kcal)				2098.5714 29 ± 207 7			2400 ± 186 39 <sup>ns</sup>			2152 ± 198 30 <sup>ns</sup>			2428 ± 265 8 <sup>ns</sup>		
	Protein (% Cal)				19 ± 1 7			18 ± 1 39 <sup>ns</sup>			19 ± 1 29 <sup>ns</sup>			18 ± 2 8 <sup>ns</sup>		
	Lipid (% Cal)				35 ± 2 7			35 ± 1 39 <sup>ns</sup>			34 ± 2 29 <sup>ns</sup>			39 ± 3 8 <sup>ns</sup>		
	Carbohydrates (% Cal)				46 ± 3 7			46 ± 1 39 <sup>ns</sup>			46 ± 2 29 <sup>ns</sup>			40 ± 4 8 <sup>ns</sup>		
Corpulence	BMI (kg/cm <sup>2</sup> )	22 ± 1 21 \$\$\$\$			45 ± 1 19			48 ± 1 97 <sup>ns</sup>			49 ± 1 52 *			48 ± 2 16 <sup>ns</sup>		
	Leptin (ng/ml)				61.955555 56 ± 6 19			68 ± 3 88 <sup>ns</sup>			51 ± 3 52 <sup>ns</sup>			65 ± 11 13 <sup>ns</sup>		
	Adiponectin (µg/ml)				8 ± 1 19			6 ± 1 88 <sup>ns</sup>			6 ± 1 49 <sup>ns</sup>			6 ± 1 14 <sup>ns</sup>		
	Fatmass (%)				48 ± 1 19			47 ± 1 75 <sup>ns</sup>			45 ± 1 46 <sup>ns</sup>			45 ± 1 12 <sup>ns</sup>		
	Fat android (%)				59 ± 1 16			62 ± 1 61 <sup>ns</sup>			68 ± 1 43 <sup>****</sup>			68 ± 2 10 **		
Liver	NAS score				0.6 0.3 16			2.1 0.2 69 *			3.3 0.4 42 <sup>***</sup>			2.8 0.4 13 <sup>***</sup>		
	ASAT (U/l)	71 ± 12 20 \$\$			27.5 ± 3.3 19			27.3 ± 1.9 94 <sup>ns</sup>			28.0 ± 1.8 52 <sup>ns</sup>			31.4 4.0 16 <sup>ns</sup>		
	ALAT (U/l)	103 ± 20 20 \$			31.3 ± 6.0 19			33.2 ± 3.8 94 <sup>ns</sup>			35.5 ± 2.8 52 <sup>ns</sup>			47.6 8.5 16 <sup>ns</sup>		
	GGT (U/l)	496 ± 169 20 \$\$			35.0 ± 8.0 19			41.2 ± 3.7 95 *			58.6 ± 6.9 52 <sup>***</sup>			51.9 4.8 16 **		
Glucose homeostasis	Glycemia (mmol/L)	6.2 0.4 17 <sup>ns</sup>			4.8 ± 0.1 19			5.2 ± 0.1 95 *			8.4 ± 0.4 52 <sup>****</sup>			8.0 ± 0.6 16 <sup>****</sup>		
	Insulinemia (mU/L)				11.8 ± 1.5 19			16.7 ± 1.0 91 *			20.0 ± 2.5 32 **			19.0 ± 3.2 15 *		
	HOMA-IR				2.5 ± 0.3 19			3.9 ± 0.3 91 *			6.8 ± 1.0 32 **			7.5 ± 1.8 15 <sup>****</sup>		
	HbA1C (%)				5.4 ± 0.1 15			5.7 ± 0.1 64 **			7.8 ± 0.2 51 <sup>****</sup>			6.9 ± 0.3 15 <sup>****</sup>		
Lipid metabolism	HyperLDL (%)				5			29			58			56		
	HyperTG (%)				17			21			76			33		
	CholIT (mmol/L)				5.1 ± 0.2 19			5.0 ± 0.1 93 <sup>ns</sup>			4.7 ± 0.1 50 <sup>ns</sup>			5.0 ± 0.2 16 <sup>ns</sup>		
	TG (mmol/L)				1.1 ± 0.1 19			1.4 ± 0.1 94 <sup>ns</sup>			2.0 ± 0.1 50 **			1.8 ± 0.2 16 *		
	HDL (mmol/L)				1.5 ± 0.1 19			1.2 ± 0.1 94 <sup>****</sup>			1.2 ± 0.1 50 <sup>****</sup>			1.2 ± 0.1 16 <sup>***</sup>		
	ApoA1 (g/L)				1.5 ± 0.3 18			1.3 ± 0.3 91 <sup>ns</sup>			1.3 ± 0.1 46 <sup>ns</sup>			1.3 ± 0.1 15 <sup>ns</sup>		
	ApoB (g/L)				0.9 ± 0.1 18			0.9 ± 0.1 91 <sup>ns</sup>			1.0 ± 0.1 46 <sup>ns</sup>			1.0 ± 0.1 15 <sup>ns</sup>		
Blood pressure	SBP	129.5 ± 3.1 19 <sup>ns</sup>			119.15384 62 ± 2.8 14			129 ± 1.9 76 *			127 ± 2.1 43 <sup>ns</sup>			134 ± 4.9 8 <sup>ns</sup>		
	DBP	57 ± 3.1 19 <sup>ns</sup>			67 ± 2.0 14			72 ± 1.1 76 <sup>ns</sup>			69 ± 1.3 43 <sup>ns</sup>			69 ± 2.6 8 <sup>ns</sup>		
	HBP (%)	31			5			39			83			56		
Inflammation	CRP (mg/L)	24 ± 13 14 <sup>ns</sup>			7.4 ± 1.7 18			9.9 ± 0.9 89 *			8.0 ± 1.0 47 <sup>ns</sup>			11.1 ± 2.5 14 *		
	IL6 plasma (pg/ml)				5.2 ± 1.1 17			3.9 ± 0.3 85 <sup>ns</sup>			5.5 ± 0.7 49 <sup>ns</sup>			4.0 ± 0.5 13 <sup>ns</sup>		
	White Cells (%)				6.3 ± 0.7 9			7.4 ± 0.3 44 *			8.0 ± 0.4 19 <sup>ns</sup>			8.2 ± 0.3 5 <sup>ns</sup>		
	Neutro (%)	64 ± 4 13 <sup>ns</sup>			55 ± 4 9			57 ± 2 44 <sup>ns</sup>			59 ± 1 18 <sup>ns</sup>			59 ± 6 5 <sup>ns</sup>		
	Lympho (%)	24 ± 3 13 \$			34 ± 3 9			42 ± 2 44 <sup>ns</sup>			40 ± 4 18 <sup>ns</sup>			42 ± 10 5 <sup>ns</sup>		
	Monocyte (%)	9 ± 1 13 \$			7 ± 1 9			7 ± 1 44 <sup>ns</sup>			6 ± 1 18 <sup>ns</sup>			8 ± 1 5 <sup>ns</sup>		
Transporter location	GLUT2 apical (%)	0			62			75			72			91		
	GLUT2 endosomal (%)	0			25			29			33			27		

**Table S1 Bioclinical description of obese and lean subjects related to material and method section “Human subject and jejunal tissue sampling”**

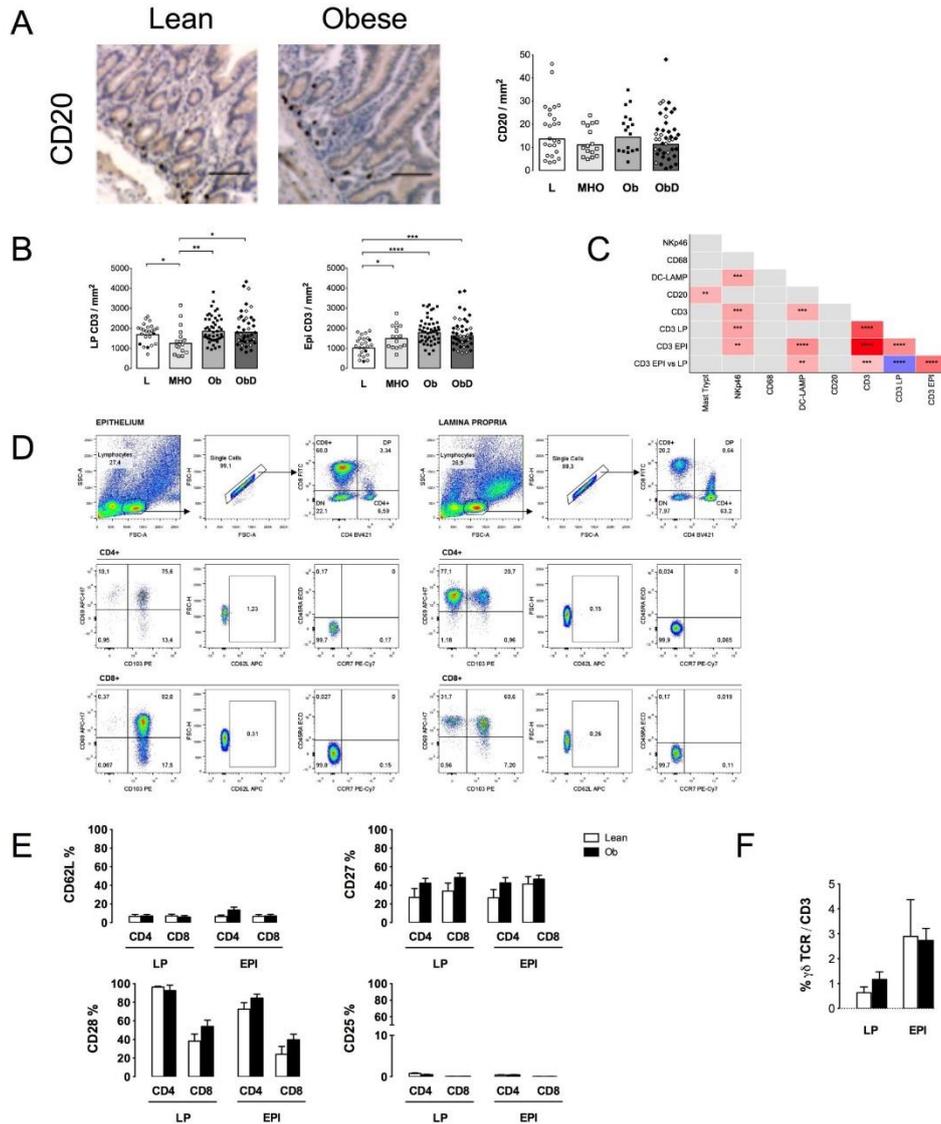
When available, data are provided as mean ±SEM in each subgroup of subjects. Subject groups were lean, metabolically healthy obese (MHO), obese with at least one comorbidity (Ob), obese diabetic (ObD) including obese diabetic without treatment at the time of surgery (ObD-ut). For HOMA-IR and insulinemia parameters (*italic characters*) the insulin-treated subjects were excluded. The NAS Score is calculated from evaluation of hepatic markers. Mann Whitney statistical test were performed between Lean and all obese subjects (\$) as well as within the obese groups with reference to the MHO group (\*). Statistical significance: \$ or \* p<0.05; \$\$ or \*\* p<0.01, \$\$\$ or \*\*\* p<0.001; \$\$\$\$ or \*\*\*\*p<0.0001



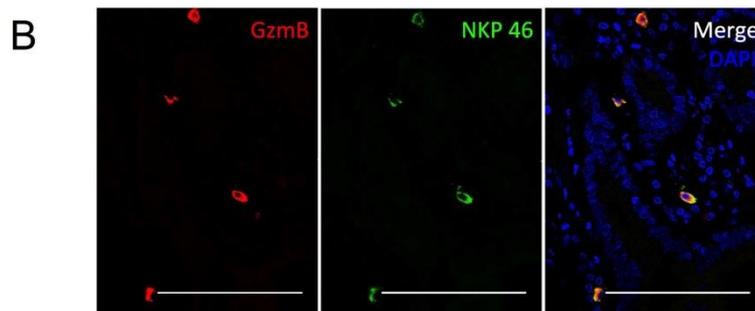
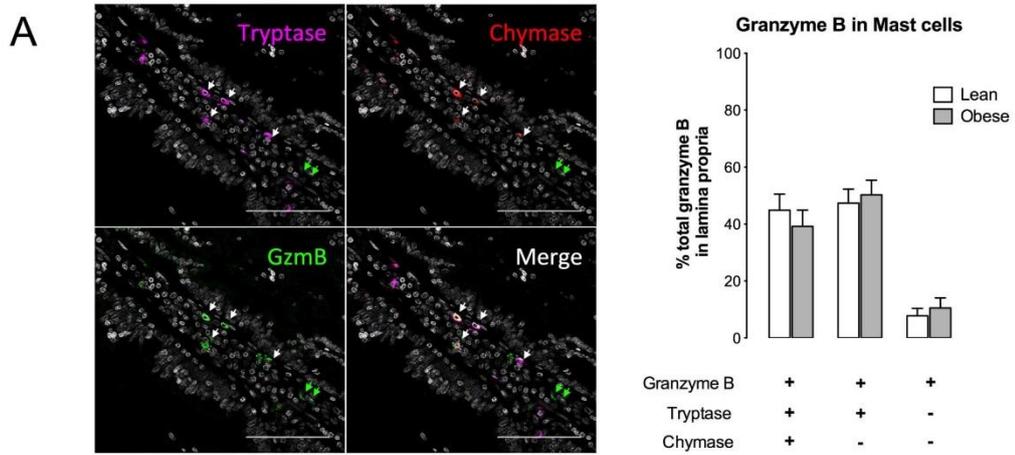
**Figure S1 related to Figure 1 Jejunal morphology.** Morphometric analysis of jejunal mucosa was performed on at least 4 images of the full crypt-villus axis in mucosa sections ( $5\mu\text{m}$ ) of lean (L, open circle  $n=11-28$ ), metabolically healthy obese (MHO, open square,  $n=11-18$ ), obese (Ob, black square,  $n=11-55$ ) and diabetic obese (ObD, black diamond, 19-49) and ObD-ut (open diamonds) subjects. A- Villus widths (left), villi surfaces (equivalent to cylinder surface) calculated using villus heights and widths (middle), villus/crypt length ratios (right). B- Densities of enterocytes and goblet cells were measured in the epithelium. Quantifications are presented as scatter plot with bar at geometric mean. Statistical significance of Mann Whitney test: \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$



**Figure S2 related to Figure 2 Innate cells in the jejunum in obesity.** A- Chymase<sup>+</sup> mast cell densities are unaltered in obesity B- Gating strategy and quantification of DC cell subsets showing the presence of mDC1 and absence of mDC2 or pDC cell subsets in the intestinal lamina propria. Epithelial DCs are rare (not shown). C- Representative image and quantification of the small amount of CD68<sup>+</sup>DC-LAMP<sup>+</sup> double positive cells in the jejunum of an obese subject. Nuclei are labeled with DAPI. Results are expressed as percentage of double-labeled cells among CD68<sup>+</sup> cells and DC-LAMP<sup>+</sup> cells respectively. D- Correlations between immune cell densities and mucosa size. Pearson or Spearman correlations were used depending on the fulfillment of the hypotheses required for parametric tests. Each colored square denotes a correlation at the intersection of columns and lines. Color intensity (color key) indicates the correlation coefficient magnitude using the red color for positive correlation and blue for negative correlation. The grey color denotes non-statistically significant correlation. Sample sizes, correlation coefficients and p values for each intersection are given in Figure S5. \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.



**Figure S3 related to Figure 3 Epithelial and lamina propria lymphocyte densities in jejunal mucosa.** A- Representative immunohistochemistry of B cells (CD20; scale bar 100 $\mu$ m) and quantification (n/mm<sup>2</sup>) in mucosa excluding Peyer's patches. B- Quantification of T cell (CD3) density (n/mm<sup>2</sup>) in lamina propria (LP) or epithelium (EPI) of jejunal samples of lean (L, n=25, open circle) and obese subjects i.e. MHO (n=17, open square), Ob (n=17, black square), and ObD (n=42, black diamond) including ObD-ut (n=12, open diamond). C- Heat map of correlations between innate and adaptive cell densities. Pearson or Spearman correlations were used depending on the fulfillment of the hypotheses required for parametric tests. Each colored square denotes a correlation at the intersection of columns and lines. Color intensity indicates the correlation coefficient magnitude using the red color for positive correlation and blue for negative correlation. The grey color denotes non-statistically significant correlation. Sample sizes, correlation coefficients and p values for each intersection are given in Figure S5. D- Flow cytometry gating strategy of T cell phenotype analysis. E- Flow cytometry analysis of T cells isolated from LP and EPI showing frequency of cells expressing CD62L, CD25, CD27 or CD28 in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T (left 4 panels) of lean (open bars) and obese (black bars) subjects. F- Frequency of  $\gamma\delta$  T cells in lean (n=15) and obese (n=27 pooled Ob and ObD) subjects. Results (mean  $\pm$  SEM) are from lean (n=12, open bar) and obese (n=20, Ob and ObD black bar) groups. Statistical significance of Mann Whitney tests: \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

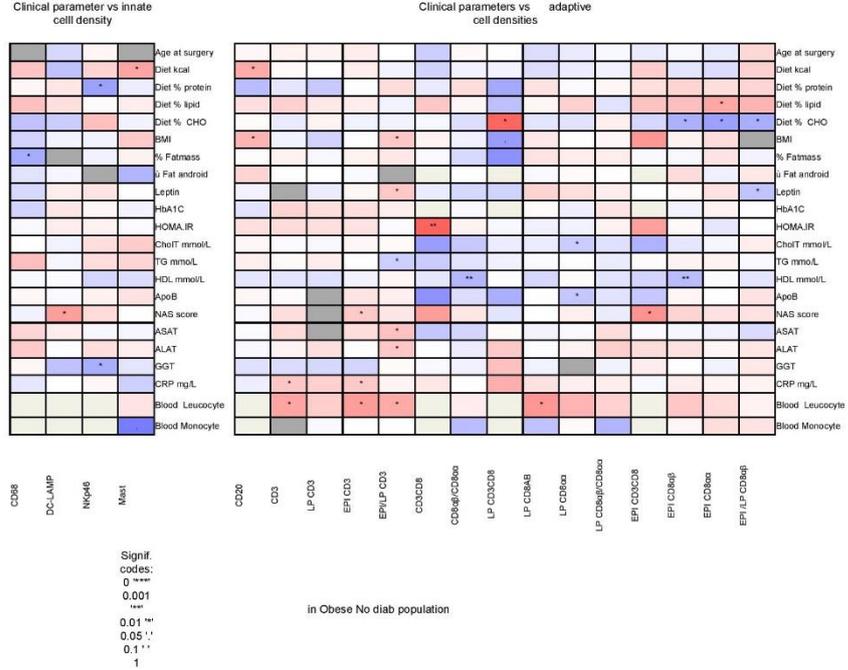


**Figure S4 related to Figure 4 Most GzmB<sup>+</sup> cells in the lamina propria are mast and NKP-46 cells.** A- Representative confocal image of the coexpression of mast cell markers (Tryptase, Chymase) with GzmB. Frequency of triple positive (tryptase, chymase and GzmB) and double positive (tryptase and GzmB). Mast cells are shown in histogram for 5 lean and 6 obese subjects. B- Representative confocal image of GzmB and NKP46, double positive cells in an obese subject with high CD8<sup>-</sup> GzmB<sup>+</sup> cell densities. Note that 100% of NKP46 cells are GzmB positive. Nuclei are labeled with DAPI. Scale Bar 100 $\mu$ m.

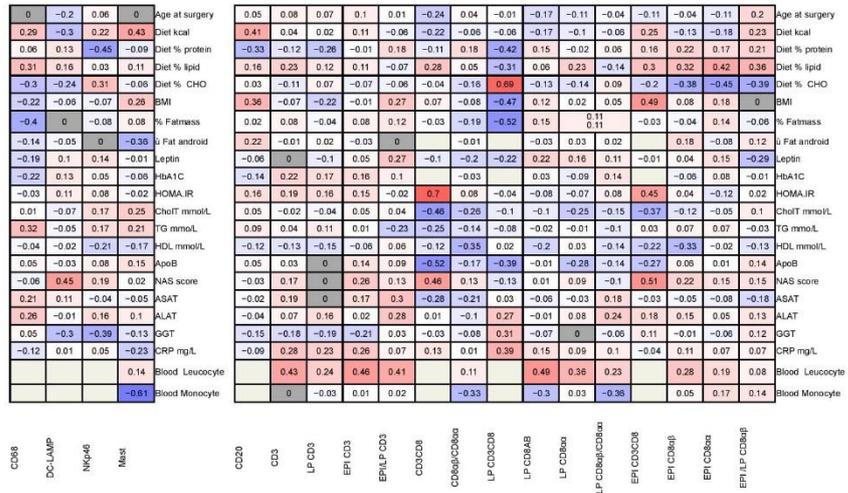


Supplemental Figure 6

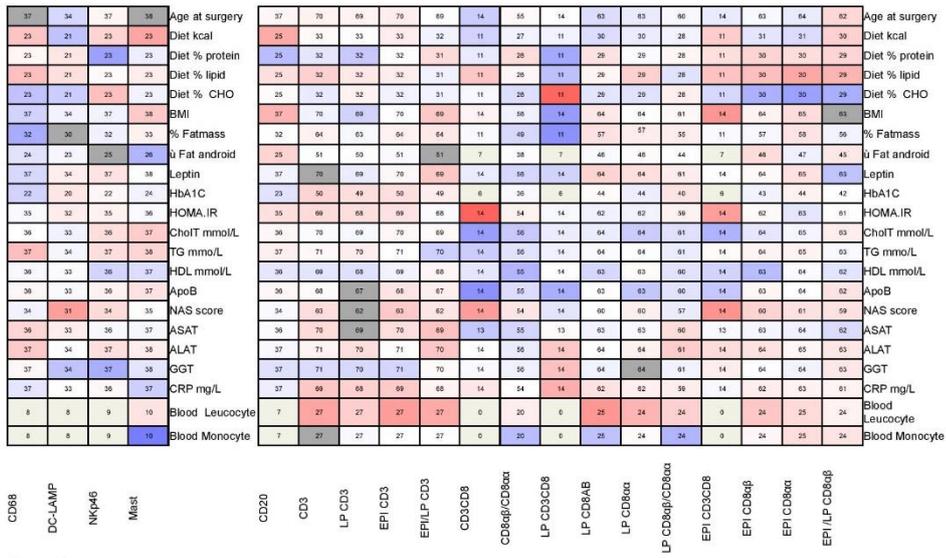
A- heat map



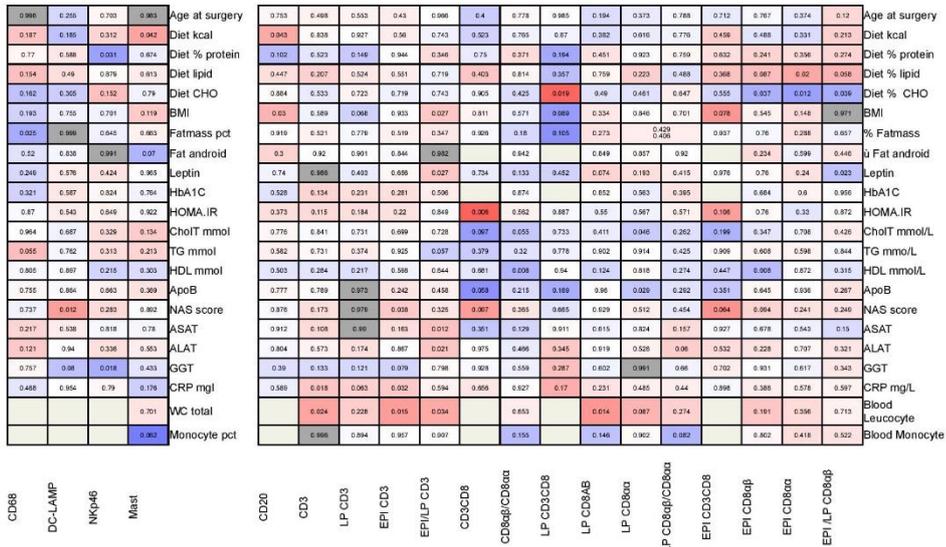
B- Slopes



**C- Sample Sizes**



**D- p values**



**Figure S6 related to Figure 7A Heat maps of all correlations between innate or adaptive cell densities with clinical parameters.** Heat map of all, correlations of immune cell densities with clinical parameter in obese non-diabetic obese subjects. Results are given in 4 panels showing for each intersection of immune cell density with bioclinical parameter A- the heat map of correlations with color code indicative of correlation parameter and statistical significance \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  B- the correlation slopes, C- the sample sizes, D- the p values.

### **3. Etude n°2 – Relations entre immunité systémique et immunité intestinale dans l'obésité humaine**

#### **3.1 Contexte et objectifs**

Cette deuxième étude s'inscrit dans le cadre du projet européen MetaCardis dont l'objectif global est d'étudier l'impact des changements qualitatifs et quantitatifs du microbiote intestinal sur la pathogenèse des maladies cardiométaboliques. Dans ce projet, 2152 sujets ont été recrutés entre fin 2012 et 2015 dans trois centres de recherche Européens : en France (Paris, ICAN), en Allemagne (Leipzig, IFB) et au Danemark (Copenhague, NNFCBMR). Ces sujets sont classés en 8 groupes selon les pathologies cardiométaboliques qu'ils présentent :

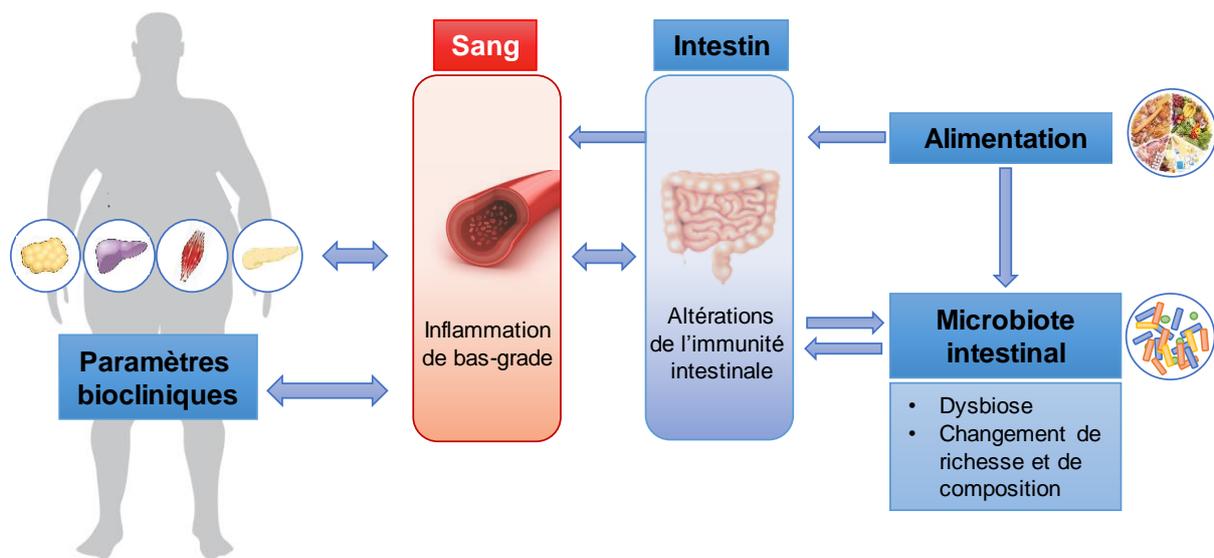
- ✓ Aucune pathologie métabolique ou cardiovasculaire (groupe contrôle)
- ✓ Le syndrome métabolique
- ✓ L'obésité sévère
- ✓ Le diabète de type-2
- ✓ La maladie coronarienne récente (< 2 semaines)
- ✓ La maladie coronarienne chronique sans insuffisance cardiaque
- ✓ La maladie coronarienne avec insuffisance cardiaque
- ✓ L'insuffisance cardiaque sans coronaropathie.

Un des objectifs de MetaCardis est d'établir une biobanque qui comprend sérum, plasma, fèces, urine et sang ainsi qu'une banque de données cliniques et phénotypiques incluant entre autres des mesures biologiques, des mesures de cytokines sériques, des données anthropométriques, des informations sur les traitements, des données socio-démographiques, des données alimentaires et des données sur l'activité physique. Pour l'ensemble des sujets de la cohorte, l'analyse des métabolites du sang et des urines a été réalisée (métabolomique), et une analyse métagénomique a également été effectuée (séquençage haut débit de l'ADN total des échantillons fécaux). Ces données vont permettre d'identifier des biomarqueurs des différents stades de maladies cardiométaboliques et d'affiner le phénotype de ces maladies.

Pour mon projet de thèse, j'ai choisi de m'intéresser spécifiquement à une pathologie : l'obésité. Les résultats de la première étude (Monteiro-Sepulveda et al., 2015) nous ont amenés à poser l'hypothèse que les modifications de l'immunité intestinale pouvaient être associées à des modifications de l'immunité systémique, de la composition du microbiote et du statut métabolique des sujets. J'ai donc dans un premier temps étudié l'altération des cellules

immunitaires circulantes, mais également intestinales, dans une sous-cohorte de la cohorte Française MetaCardis pour lesquels nous avons eu la chance d'obtenir des prélèvements de sang et de jéjunum. Pour ce manuscrit de thèse, je présenterai uniquement la caractérisation des cellules immunitaires dans les deux compartiments (sang et intestin) réalisée par cytométrie en flux dans une cohorte de sujets minces, obèses et obèses diabétiques. L'analyse de l'association entre ces phénotypes immunitaires et les données biocliniques, métabolomiques et métagénomiques des sujets est en cours d'analyse et ne sera donc pas présentée dans ce manuscrit.

Dans ce contexte, mes objectifs sont de mettre en relation le statut métabolique, les altérations du système immunitaire systémique et intestinal et les changements dans la composition du microbiote intestinal dans l'obésité humaine (**Figure 21**). Ces analyses auront pour but d'établir une stratification des patients en relation avec leurs comorbidités en fonction de paramètres immuno-inflammatoires.



**Figure 21.** Etudes des relations entre immunité systémique et immunité intestinale en relation avec les paramètres biocliniques des sujets, la composition du microbiote intestinal et l'alimentation.

## 3.2 Matériels et méthodes

### *Constitution de la cohorte*

Nous avons obtenu des échantillons de sang chez 155 sujets obèses (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>) non diabétiques candidats ou non pour la chirurgie bariatrique (groupe Ob) ; 36 sujets obèses diabétiques (groupe ObD), c'est-à-dire présentant un IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> et présentant au moins un des critères suivants du diabète (Association, 2014) : une glycémie à jeun < 6,9 mmol/l et/ou une HGPO G120 > 11 mmol/l et/ou un pourcentage d'hémoglobine glyquée (HBA1c) < 6,5% et/ou l'utilisation d'un traitement anti-diabétique. Enfin, un groupe constitué de 84 sujets minces non diabétiques recrutés par le Centre d'investigation Clinique (CIC) de la Pitié-Salpêtrière a été utilisé comme contrôle (groupe L, *lean*). Pour une sous-cohorte de sujets obèses et obèses diabétiques, nous avons obtenu les prélèvements d'intestin grêle (jéjunum) au cours d'un « bypass » gastrique Roux-en-Y (21 sujets Ob et 17 sujets ObD). Un second groupe contrôle a été constitué à partir d'échantillons de jéjunum obtenus au cours de gastrectomie totale ou d'ablation de la tête du pancréas chez 6 sujets minces. Les échantillons ont été prélevés à distance de la tumeur, en l'absence de chimiothérapie et de trouble métabolique apparent. Les prélèvements de sang et de jéjunum ont été obtenus avec le consentement éclairé des patients.

### *Préparation des cellules immunitaires intestinales*

Les cellules immunitaires de la lamina propria (LP) et de l'épithélium intestinal (EPI) ont été isolées selon le protocole suivant : *Epithélium* : après avoir retiré la musculature de la paroi intestinale, la muqueuse intestinale est découpée en petits morceaux puis incubée deux fois 20 minutes à 37°C sous agitation douce dans du Phosphate Buffered Saline 1X (PBS, Gibco) contenant 5 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA, Sigma Aldrich), chélateur d'ions divalents, et 2 mM de dithiothréitol (DTT, Sigma Aldrich), agent réducteur, afin de détacher les cellules de l'épithélium de la LP. Après filtration sur tamis cellulaire 70 µm et lavage dans du DMEM + GlutaMAX 1g/L de glucose supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, PAA) et 1% de pénicilline/streptomycine (P/S) les cellules épithéliales sont reprises dans une solution de Percoll (Percoll Plus, GE Healthcare, Life Sciences) à 40% final et déposées sur une solution de Percoll 70% avant d'être centrifugées pendant 30 min à 400 g à 20°C sans frein. La fraction des entérocytes est éliminée et les cellules immunitaires sont prélevées à l'interface entre les couches de Percoll de 40 et 70%. *Lamina propria* : après détachement des cellules épithéliales, le tissu est lavé dans du PBS 1X afin d'éliminer toutes les cellules épithéliales de la fraction LP, puis incubé pendant 2h30 à 37°C sous agitation forte

dans du milieu de digestion DMEM contenant 1 mg/ml de Collagénase D (Roche), 2% d'albumine (PAA Laboratories), 1% d'HEPES (Gibco) et 1% de P/S. Après incubation, les cellules sont filtrées sur tamis cellulaire 70 µm et lavées dans du DMEM complet avant de procéder à la lyse des globules rouges.

### *Marquage de surface et cytométrie en flux*

Afin de caractériser les cellules immunitaires du sang, 100 µl de sang total ont été incubés avec un inhibiteur des récepteurs Fc (Miltenyi Biotec) puis incubés pendant 20 min à 4°C à l'obscurité avec un marqueur de viabilité (Fixable viability dye eF506, eBioscience) et les anticorps décrits dans le **Tableau 3** (Miltenyi Biotec, sauf si indiqué autrement). Les globules rouges sont ensuite lysés et fixés avec la solution « VersaLyse lysing solution / IOTest 3 Fixative Solution » (Beckman Coulter). Le même protocole de marquage a été appliqué pour les cellules immunitaires de l'épithélium et de la LP, avec 2 millions de cellules dont les globules rouges ont déjà été lysés. Après marquage avec les anticorps de surface, les cellules de l'EPI et de la LP ont été fixées avec la solution BD Cytotfix (BD Biosciences). L'acquisition des données a été réalisée sur un cytomètre MacsQuant Analyzer à l'aide du logiciel MacsQuantify (Miltenyi Biotec). Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star).

<b>Cible</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>
<b>CD45</b>	APC-Vio770	5B1
<b>HLA-DR</b>	Vioblue	AC122
<b>CD14</b>	PE-Vio770	TÜK4
<b>CD16</b>	PerCP-Cy5.5	3G8 (BD)
<b>CD66b</b>	FITC	TET2
<b>CD3</b>	Viogreen	BW264/56
<b>CD20</b>	Viogreen	LT19
<b>HLA-DR</b>	PerCP	AC122
<b>CD11c</b>	APC	MJ4-27G12
<b>CD1c (BDCA-1)</b>	PE	AD5-8E7
<b>CD303a (BDCA-2)</b>	FITC	AC144
<b>CD141 (BDCA-3)</b>	Vioblue	AD5-14H12
<b>CD14</b>	Viogreen	TÜK4

<b>CD3</b>	Vioblue	BW264/56
<b>CD4</b>	PE-Vio770	VIT4
<b>CD8</b>	PerCP-Vio700	BW135/80
<b>CD25</b>	APC	4E3
<b>CD127</b>	FITC	MB15-18C9
<b>CD20</b>	PE	LT19
<b>CD56</b>	APC	AF12-7H3
<b>CD56</b>	BV510	HCD56 (Biolegend)

**Tableau 3.** Liste des anticorps de cytométrie en flux de surface utilisés pour la caractérisation des cellules immunitaires circulantes et intestinales de l'étude n°2.

### ***Ré-activation des lymphocytes T et marquages intracellulaires***

Afin d'analyser la production des cytokines par cytométrie en flux des LT, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été obtenues après centrifugation sur un gradient de Ficoll et lyse des globules rouges. Les PBMC ont ensuite été stimulés pendant 6h à 37°C 5% CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium 1640 + GlutaMax (Gibco) supplémenté avec 10 % de SVF, 1 % de P/S, 1 % de pyruvate de sodium (Sigma Aldrich), 1 % d'Hépès contenant 50 ng/ml de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma Aldrich), 1 µg/ml de ionomycine (Sigma) et 10 µg/ml de Brefeldine A (Sigma) à raison de 1.10<sup>6</sup> cellules/ml dans une plaque 12 puits à fond plat. Pour les cellules épithéliales et les cellules de la LP, le même protocole est appliqué avec une stimulation de 12h. Les cellules sont ensuite récoltées, lavées et marquées 30 minutes à 4°C avec les anticorps monoclonaux suivants : anti-CD19 V450, anti-CD56 V450, anti-HLA-DR V450, anti-CD8 V500 (BD Biosciences), anti-CD3 APC-Vio770 (Miltenyi Biotec), anti-CD4 BV605 (Biolegend) et le marqueur de viabilité FVS450 (BD Biosciences). Après un lavage, les cellules sont incubées dans du tampon de fixation (BD Cytofix, BD Biosciences) pendant 20 min puis lavées et incubées pendant 30 min à 4°C à l'abri de la lumière dans du tampon de perméabilisation (BD perm/wash, BD Biosciences) contenant les anticorps intracellulaires suivants : anti-IL-17 BV711, anti IL-4 PE-Cy7, anti-IL-2 PE-Cy7, anti-IFN-γ BV711 (Biolegend), anti-IL-22 APC, anti-IL-10 Alexa 488, anti-TNF-α APC (eBioscience), anti-IL-21 APC (Miltenyi Biotec), anti-IL-13APC et anti-granzyme B FITC (BD Biosciences). Des isotypes contrôles correspondants

sont utilisés afin d'évaluer le marquage spécifique. Après un lavage dans du tampon de perméabilisation, les cellules sont reprises dans du tampon FACS.

Les données de cytométrie en flux ont été acquises avec un cytomètre BD Fortessa (BD Biosciences) et le logiciel FACS Diva (BD Biosciences). Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel FlowJo.

### *Analyses statistiques*

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart standard à la moyenne (SEM) et n'ont pas été ajustés sur l'âge. Les différences statistiques des moyennes des trois groupes de sujets ont été déterminées par un test de Mann & Whitney (test non paramétrique, données non appariées) à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0. Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme significative.

## 3.3 Résultats

### 3.3.1 Description de la cohorte

Les principales caractéristiques des 84 sujets minces (L), 155 obèses non diabétiques (Ob) et 36 obèses diabétiques de type 2 (ObD) sont présentés dans le **Tableau 4**. Nous pouvons remarquer une différence significative dans la moyenne d'âge des trois groupes. Pour les analyses et résultats présentés dans ce manuscrit de thèse, les données n'ont pas été ajustées sur l'âge.

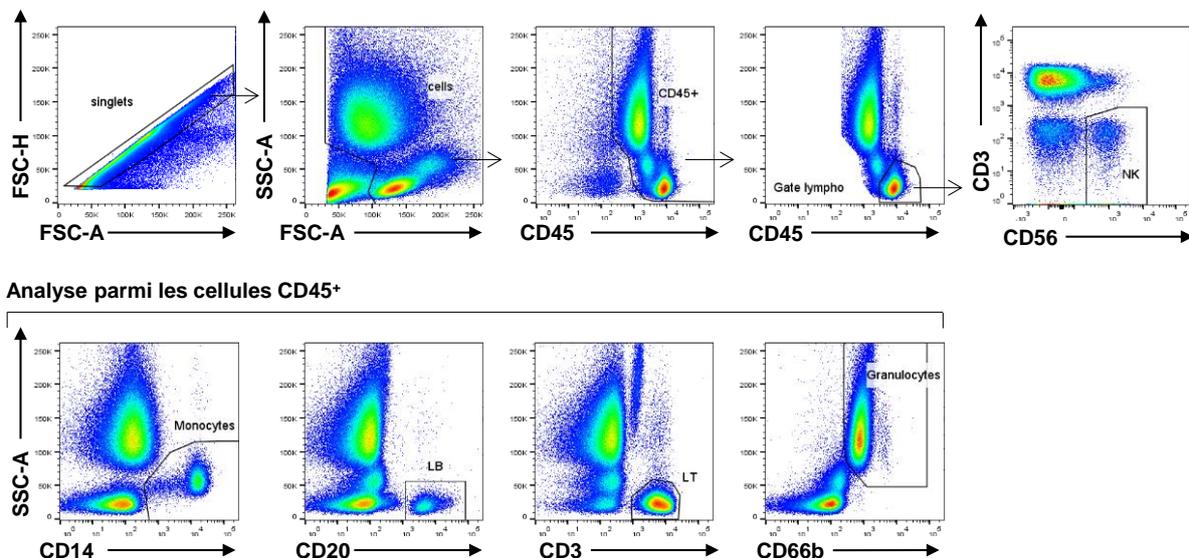
Groupe	Minces (L)	Obèses (Ob)	Obèses D2T (ObD)
Effectif	84	155	36
Sexe (F/H)	60/24	131/24	29/7
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,5 $\pm$ 0,3	42,6 $\pm$ 0,4****	45,3 $\pm$ 0,9****##
Age (ans)	51,2 $\pm$ 1,6	41,4 $\pm$ 1,1****	47,4 $\pm$ 2,0#
Glycémie à jeun (mmol/L)	4,7 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,1****	7,4 $\pm$ 0,4****###
HbA1c (%)	5,5 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 0,1****	7,3 $\pm$ 0,2****###

**Tableau 4.** Paramètres cliniques de la cohorte. Les résultats sont montrés en moyenne  $\pm$  écart standard à la moyenne. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  versus L, #  $p < 0,05$  versus Ob, ##  $p < 0,01$  versus Ob, ###  $p < 0,0001$  versus Ob.

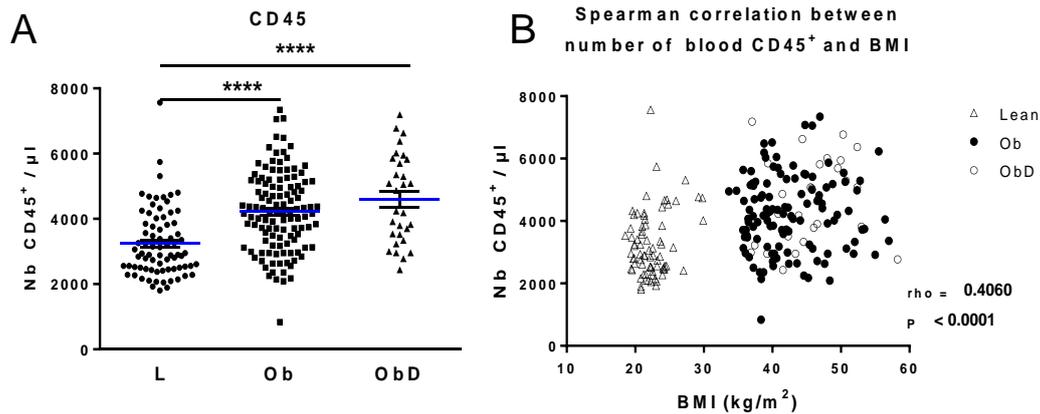
Dans un premier temps, je présenterai les résultats de cytométrie en flux obtenus dans le sang, puis dans un second temps les résultats observés dans l'intestin grêle.

### 3.3.2 L'obésité induit une augmentation du nombre de cellules immunitaires dans le sang circulant et un profil plus pro-inflammatoire des LT

La stratégie d'analyse par cytométrie en flux des cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> et des grandes sous-populations immunitaires dans le sang est présentée dans la **Figure 22**. Tout d'abord, l'analyse de l'expression de CD45 dans le sang circulant montre une augmentation globale du nombre absolu de cellules immunitaires chez les sujets Ob et ObD, sans association avec le diabète de type 2 (**Figure 23A**). Le nombre de leucocytes circulants est positivement corrélé avec l'IMC des sujets (**Figure 23B**), indiquant une association positive entre infiltrat immunitaire dans le sang et corpulence.



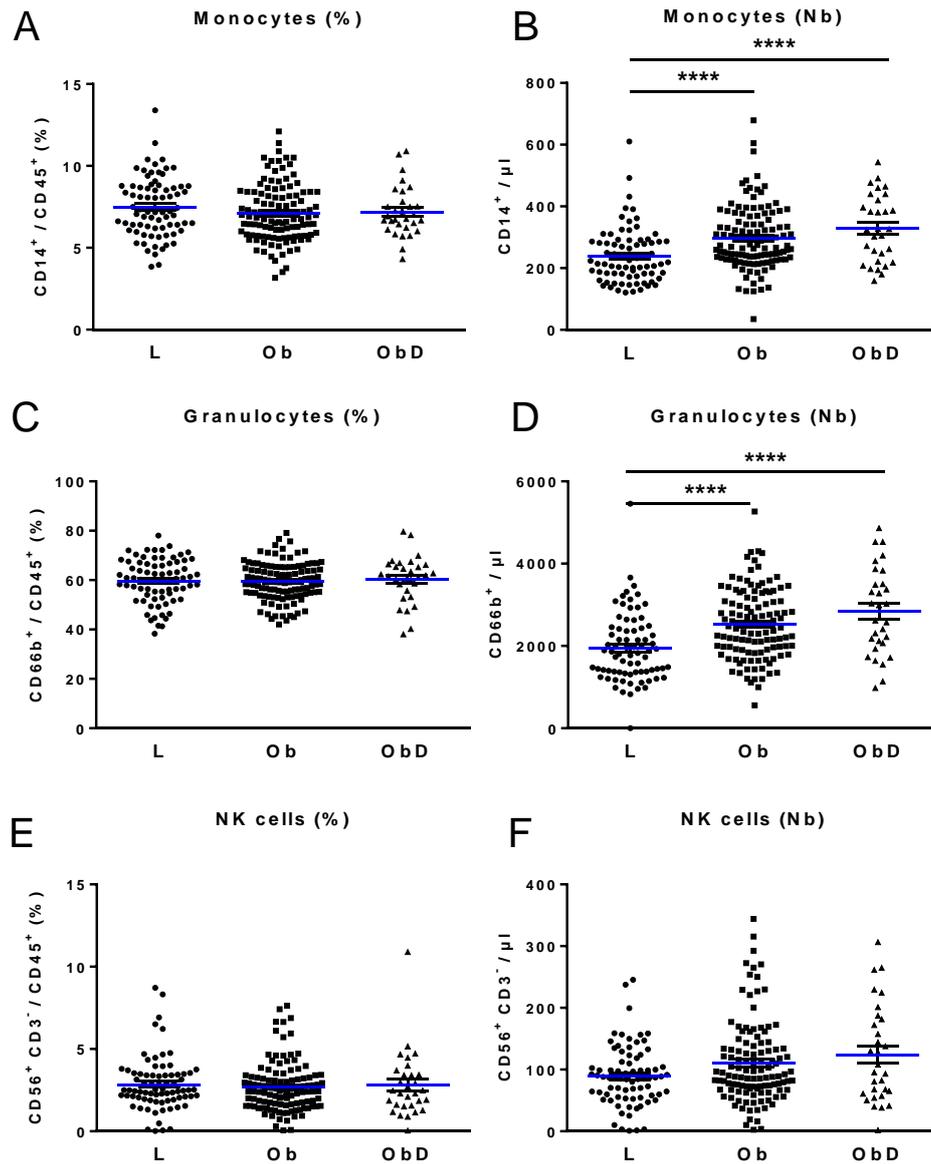
**Figure 22.** Stratégie d'analyse par cytométrie en flux des leucocytes circulants et des grandes sous-populations immunitaires. Après exclusion des doublets, les cellules sont sélectionnées en fonction de leur taille (SSC, side scatter) et de leur granularité (FSC, forward scatter) en excluant les débris. Les leucocytes sont identifiés avec le marqueur CD45<sup>+</sup>. Parmi les cellules CD45<sup>+</sup>, on peut identifier les monocytes CD14<sup>+</sup>, les granulocytes CD66b<sup>+</sup>, les lymphocytes B non plasmocytes CD20<sup>+</sup>, les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> et les cellules NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> parmi les cellules lymphoïdes CD45<sup>+</sup>.



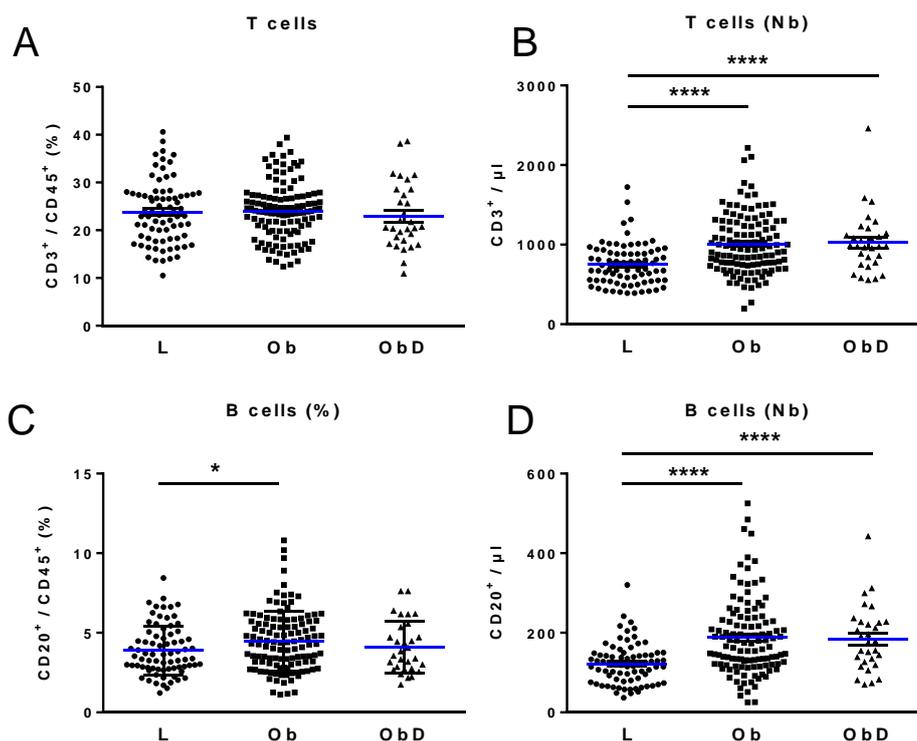
**Figure 23.** Augmentation du nombre de cellules immunitaires circulantes dans l'obésité et corrélation avec l'IMC. (A) Analyse par cytométrie en flux du nombre absolu (nombre /  $\mu\text{l}$  de sang) de cellules  $\text{CD45}^+$  circulantes chez 76 sujets minces (L), 116 sujets obèses non diabétiques (Ob) et 30 sujets obèses T2D (ObD) et (B) corrélation de Spearman avec l'indice de masse corporelle.

Parmi les leucocytes, j'ai ensuite caractérisé les grandes sous-populations immunitaires innées (**Figures 24 A-F**). Ces résultats n'indiquent aucune perturbation spécifique dans la fréquence des monocytes, des granulocytes et des cellules NK dans l'obésité humaine. En revanche, à l'exception des cellules NK dont le nombre n'augmente pas dans l'obésité, nous observons une augmentation du nombre absolu des monocytes et des granulocytes, qui suivent l'augmentation de l'infiltrat global de cellules immunitaires chez les sujets obèses et obèses diabétiques.

La même analyse a été réalisée pour les deux grandes populations de cellules immunitaires adaptatives : les lymphocytes T (LT) caractérisés par l'expression du marqueur CD3 (**Figure 25A**), et les lymphocytes B (LB) caractérisés par l'expression du marqueur CD20 (**Figure 25B**). La fréquence des LT n'est pas altérée dans l'obésité, mais nous observons une augmentation significative de la fréquence des LB chez les sujets obèses qui n'est pas retrouvée chez les sujets obèses diabétiques. De la même façon que les cellules immunitaires innées, les LT et les LB sont augmentées en nombre absolu dans le sang des sujets Ob et Obd par rapport aux sujets minces.

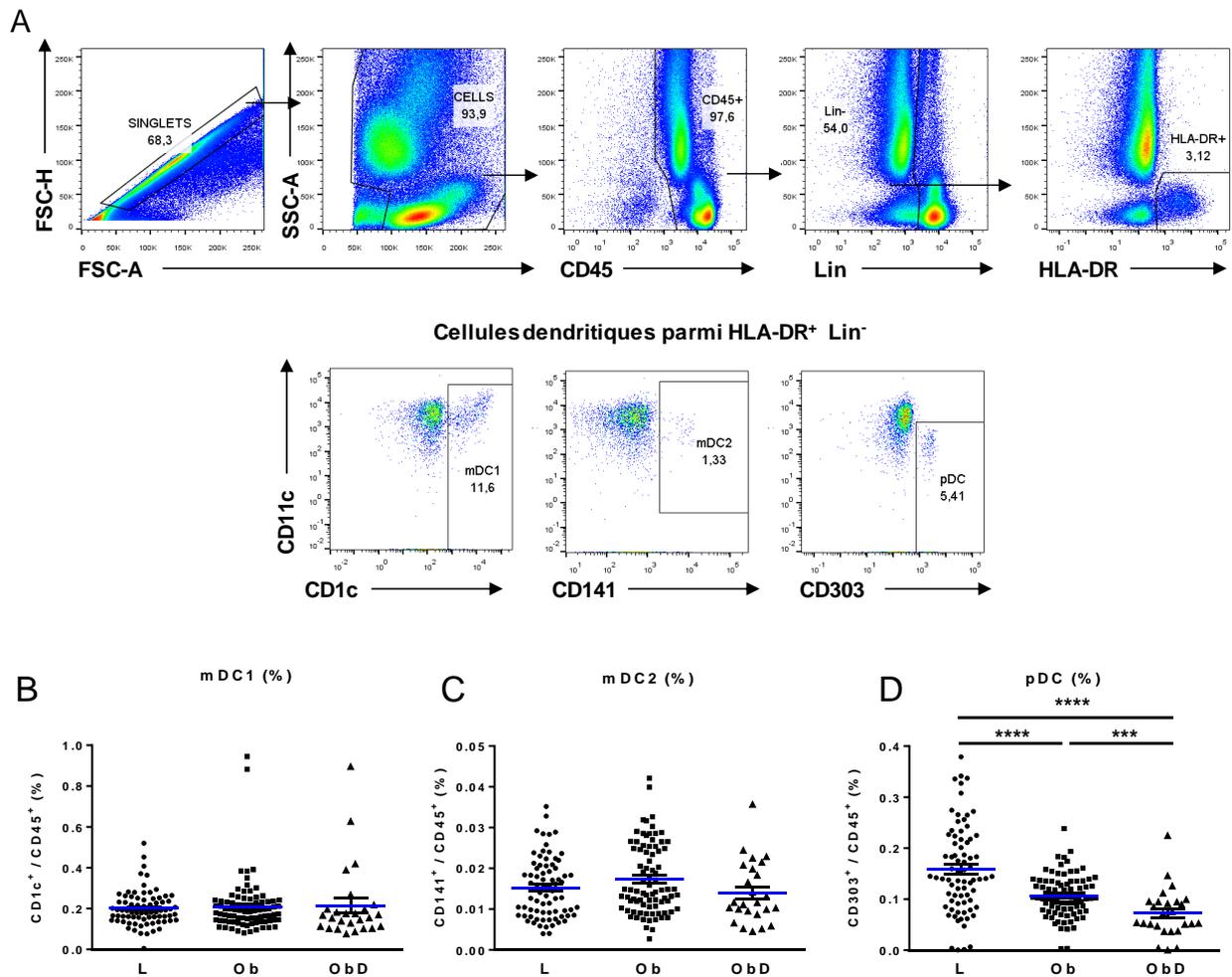


**Figure 24.** Pourcentage de cellules immunitaires innées dans le sang parmi les cellules CD45<sup>+</sup> (panel de gauche) et nombre absolu (panel de droite). (A et B) Monocytes CD14<sup>+</sup>, (C et D) granulocytes CD66b<sup>+</sup> et (E et F) cellules NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> chez 76 sujets minces (L), 116 sujets obèses non diabétiques (Ob) et 30 sujets obèses diabétiques (ObD).



**Figure 25.** Pourcentage de cellules immunitaires adaptatives dans le sang parmi les cellules CD45<sup>+</sup> (panel de gauche) et nombre absolu (panel de droite). (A et B) Lymphocytes T CD3<sup>+</sup> et (C et D) lymphocytes B CD20<sup>+</sup> chez 76 sujets minces (L), 116 sujets obèses non diabétiques (Ob) et 30 sujets obèses DT2 (ObD).

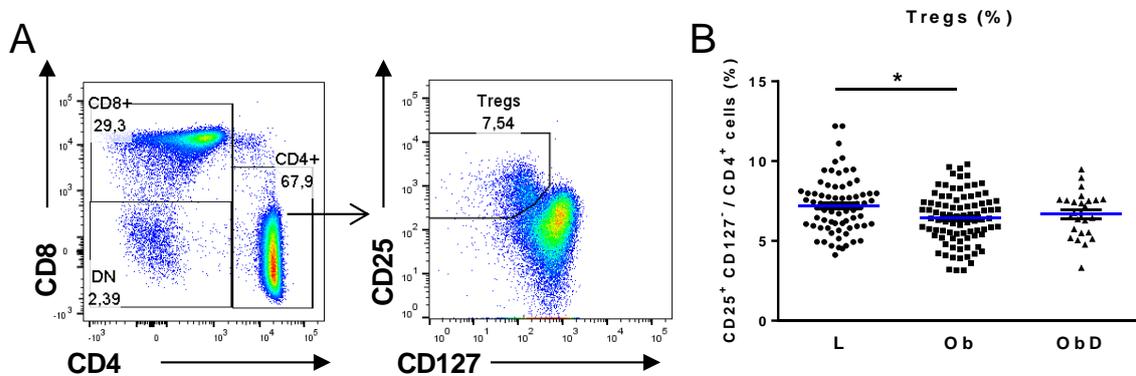
De manière plus spécifique, j'ai ensuite étudié les cellules dendritiques du sang qui distinguent 3 grandes sous-populations : les cellules myéloïdes mDC1 et mDC2 et les cellules dendritiques plasmacytoïdes pDC caractérisées à l'aide des marqueurs CD1c, CD141 et CD303 respectivement (**Figures 26A**). Dans l'obésité humaine, la fréquence des cellules dendritiques myéloïdes (mDC1 et mDC2) n'est pas altérée (**Figures 26 B, C**), en revanche nous observons une diminution significative de la fréquence des cellules pDC chez les sujets obèses qui est exacerbée chez les sujets obèses diabétiques (**Figure 26D**). Les pDC étant décrites pour jouer un rôle dans l'immunité anti-virale *via* la production d'IFN de type I, cette chute drastique des pDC pourrait être mise en relation avec l'altération des réponses anti-virales décrites dans l'obésité humaine (Morgan et al., 2010; Paich et al., 2013).



**Figure 26.** Caractérisation des sous-populations de cellules dendritiques (DCs) dans le sang. (A) Stratégie d'analyse par cytométrie en flux des cellules dendritiques circulantes. Après exclusion des doublets et des débris, les leucocytes sont caractérisés par l'expression du marqueur  $CD45^+$ . Les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules NK et les monocytes sont ensuite exclus de l'analyse ( $CD3^- CD20^- CD56^- CD14^-$  respectivement ou  $Lin^-$ ). Les trois sous-populations de DCs sont analysées parmi les cellules présentatrices d'antigène  $HLA-DR^+ Lin^-$ . (B) Pourcentage de cellules dendritiques myéloïdes de type 1 (mDC1)  $CD1c^+$ , (C) de cellules dendritiques myéloïdes de type 2 (mDC2)  $CD141^+$  et (D) cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)  $CD303^+$  parmi  $CD45^+$  chez 75 sujets minces (L), 83 sujets obèses non diabétiques (Ob) et 26 sujets obèses diabétiques (ObD).

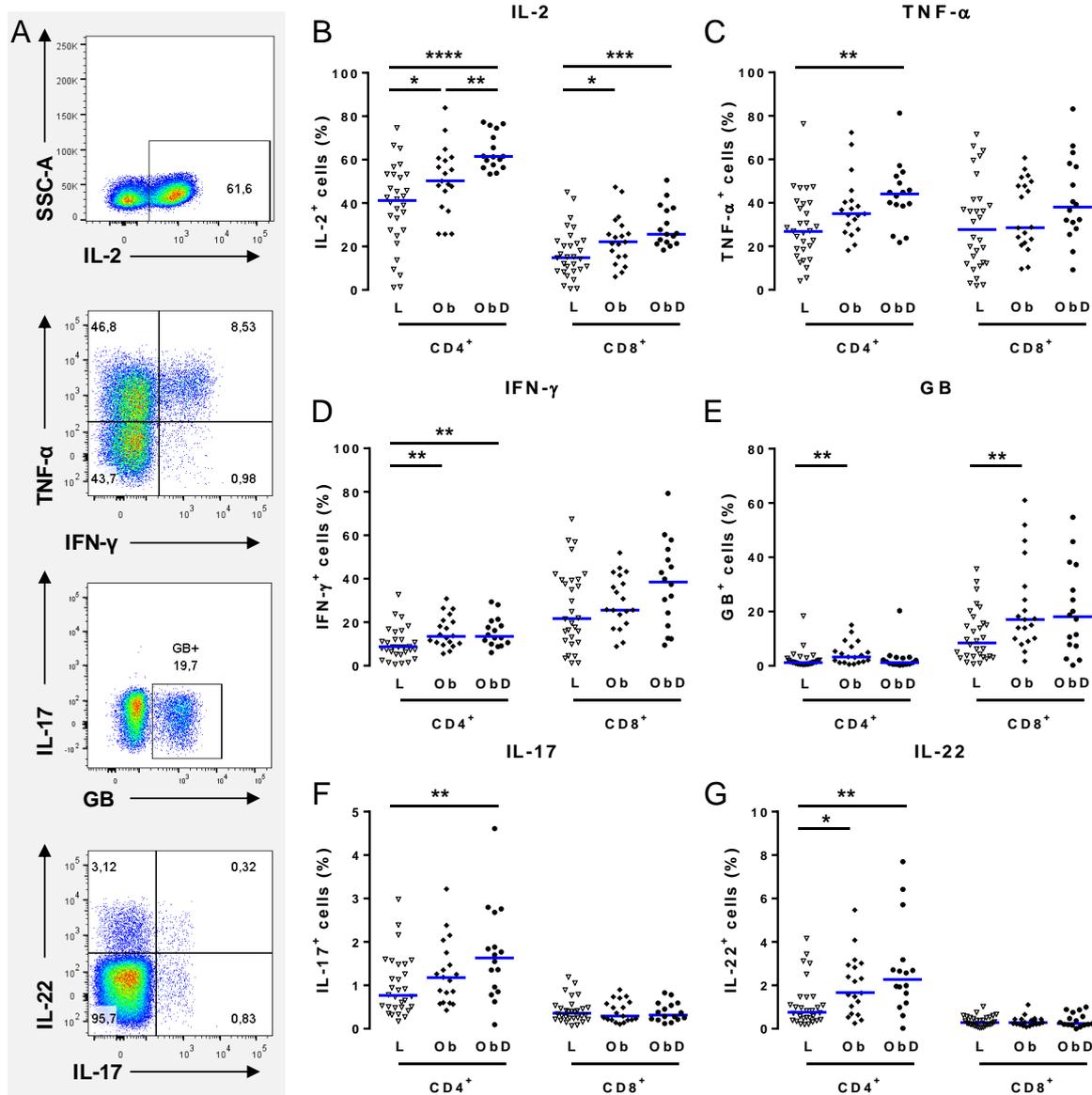
Parmi les lymphocytes T, j'ai ensuite caractérisé la sous-population de lymphocytes T régulateurs (Tregs) à l'aide des marqueurs de surface CD25 et CD127 (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006) (**Figure 27A**). Nos résultats indiquent une diminution de la fréquence des Tregs

dans le sang des sujets obèses non diabétiques (**Figure 27B**). Nous avons également étudié les sous-populations de LT auxiliaires ( $CD4^+$ ) et cytotoxiques ( $CD8^+$ ) et n'observons pas d'altération du ratio  $CD4/CD8$  parmi les LT circulants dans l'obésité humaine (non montré).



**Figure 27.** (A) Exemple d'analyse par cytométrie en flux des lymphocytes T régulateurs (Tregs)  $CD25^{hi} CD127^{lo}$  parmi les LT  $CD4^+$  et (B) fréquence des Tregs circulants chez 73 sujets minces (L), 88 sujets obèses non diabétiques (Ob) et 25 sujets obèses DT2 (ObD).

Pour aller plus loin dans la caractérisation des lymphocytes T circulants chez le sujet obèse, dans une sous-cohorte de 29 sujets minces (L), 22 sujets obèses (Ob) et 14 sujets obèses DT2 (ObD), nous avons isolé les PBMC et étudié par cytométrie en flux la production intracellulaire des cytokines IL-17A, IL-22, granzyme B, IL-21, IL-4, IL-10, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-13 par les cellules  $CD4^+$  et  $CD8^+$  du sang après 6h de stimulation non spécifique par la PMA et la ionomycine (**Figure 28**). Parmi les 10 cytokines étudiées, ne sont présentés que les cytokines pour lesquelles nous observons des différences significatives entre les sujets minces et les sujets obèses ou obèses diabétiques. Cette analyse révèle une augmentation globale de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-2, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T  $CD4$  et  $CD8$  des sujets obèses, avec un effet accru chez les sujets obèses diabétiques pour deux cytokines : IL-2 et TNF- $\alpha$  (**Figures 28 B-D**). Nous observons également une augmentation de la fréquence des LT produisant du Granzyme B (**Figure 28E**). Les pourcentages de cellules  $CD4^+$  produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 sont également augmentés chez les sujets obèses diabétiques et pour l'IL-22 uniquement chez les sujets obèses non diabétiques (**Figures 28 F, G**), ce qui est consistant avec d'autres données de la littérature indiquant une augmentation des cellules Th17 et Th22 dans l'obésité et le diabète chez l'homme (Zhao et al., 2014). Nos résultats indiquent un « *shift* » des réponses T vers un profil de type Th1/Th17 dans l'obésité et le diabète de type 2 associé à l'obésité.



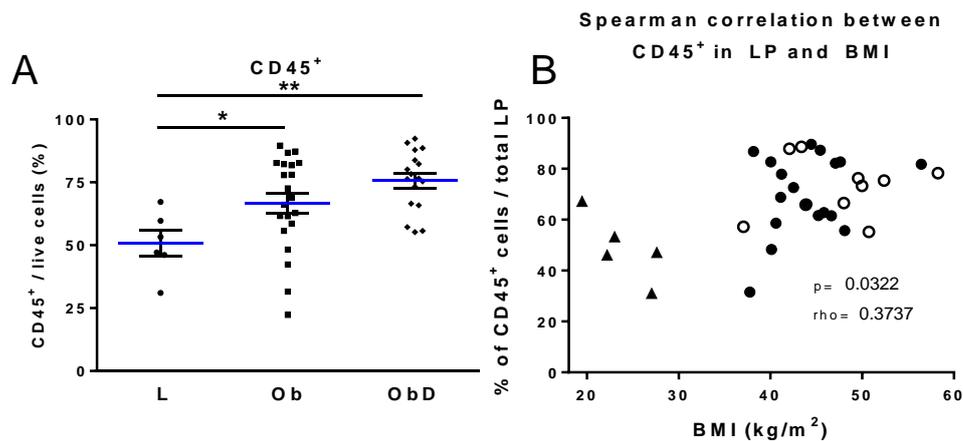
**Figure 28.** L'obésité induit une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires dans le sang. Analyse de production intracellulaire d'IL-2, de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$ , de granzyme B, d'IL-17A et d'IL-22 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> après 6h de stimulation par la PMA et la ionomycine chez 29 sujets minces (L), 22 obèses non diabétiques (Ob) et 14 sujets obèses diabétiques (ObD).

### 3.3.3 L'immunité intestinale est altérée dans l'obésité humaine

Afin de compléter les travaux initiés au laboratoire en collaboration avec le Dr Edith Brot-Laroche et de nous permettre de mettre en relation le profil immuno-inflammatoire intestinal et sanguin chez les mêmes sujets, j'ai également caractérisé plus amplement par cytométrie en

flux le phénotype des cellules immunitaires dans la muqueuse jéjunale dans la fraction épithéliale et dans la lamina propria. Cette étude a été réalisée dans une sous-cohorte de sujets dont les prélèvements de jéjunum ont été obtenus au cours d'un « bypass » gastrique Roux-en-Y (19 Ob et 9 ObD) avec le consentement éclairé du patient. Un groupe contrôle spécifique a été constitué pour cette sous-cohorte. Pour cette analyse, nous avons utilisé les mêmes stratégies d'analyses par cytométrie en flux utilisées pour caractériser les cellules du sang chez les mêmes patients.

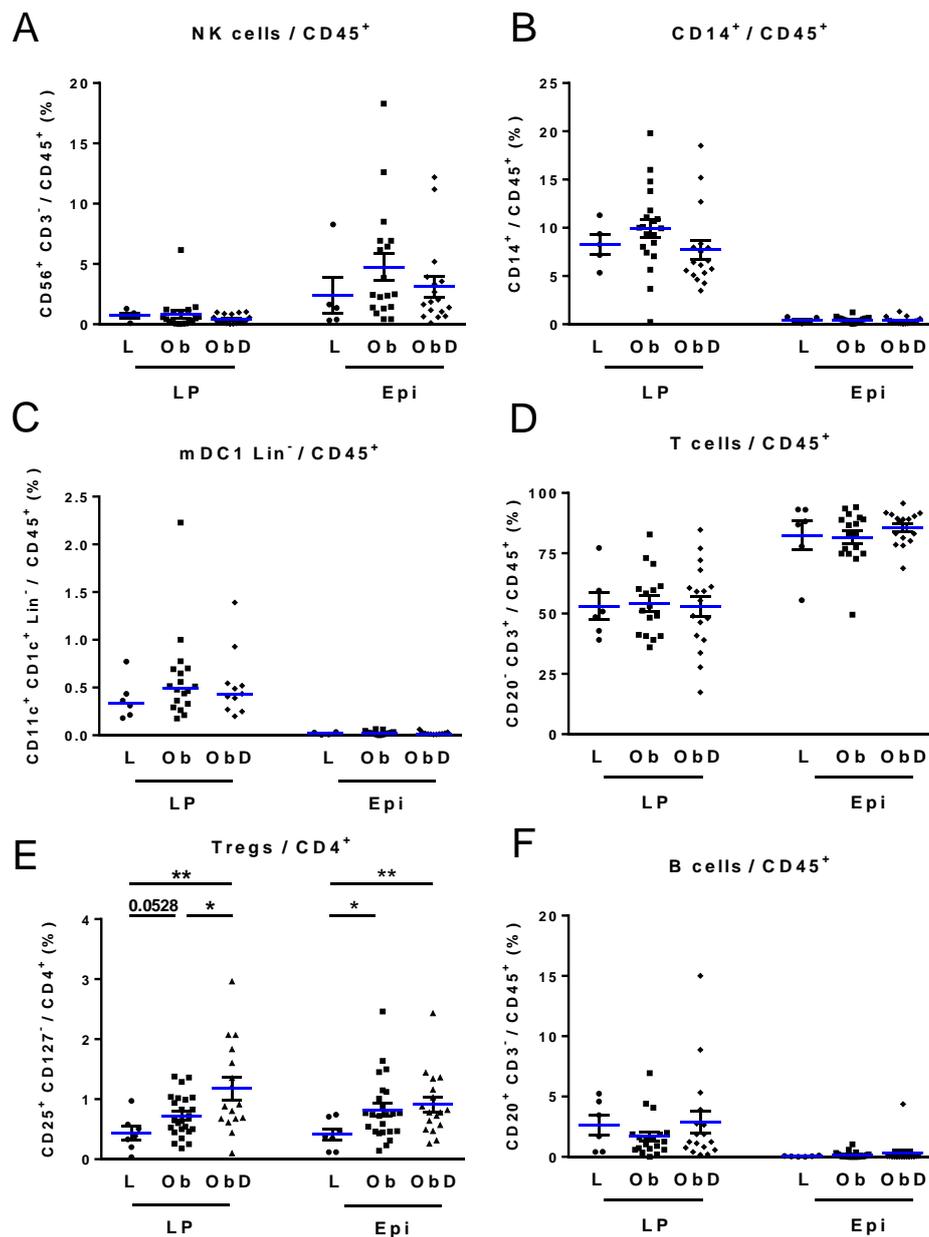
L'analyse du pourcentage de cellules CD45<sup>+</sup> parmi les cellules de la LP montre une augmentation significative du pourcentage de cellules immunitaires infiltrant la LP des sujets Ob et ObD par rapport aux sujets minces (**Figure 29A**). Cet infiltrat immunitaire global dans la LP est, de la même façon que dans le sang, positivement corrélé avec l'indice de masse corporelle (**Figure 29B**). En revanche, nous n'observons pas de corrélation entre la fréquence des cellules CD45<sup>+</sup> dans le sang et dans la muqueuse intestinale (non montré).



**Figure 29.** L'obésité altère le nombre de leucocytes dans la lamina propria de l'intestin grêle. (A) Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules CD45<sup>+</sup> parmi les cellules isolées de la lamina propria (LP) de sujets 6 sujets minces (L), 21 sujets obèses non diabétiques (Ob) et 17 sujets obèses diabétiques (ObD) et (B) corrélation de Spearman entre le pourcentage de cellules CD45<sup>+</sup> de la LP et l'indice de masse corporelle (BMI) en kg/m<sup>2</sup>.

Parmi les grandes populations de cellules immunitaires que nous avons étudiées dans l'intestin, la fréquence des cellules NK et des cellules CD14<sup>+</sup> (**Figures 30 A, B**) reste inchangée dans l'EPI et la LP des patients. Dans la première étude (Monteiro-Sepulveda et al., 2015), nous observons une augmentation du nombre de cellules NK caractérisées par le marqueur NKp46.

Dans la muqueuse intestinale, parmi les 3 populations de cellules dendritiques décrites dans le sang, seules les mDC1 sont détectées. Nous montrons que leur pourcentage parmi les CD45<sup>+</sup> dans la LP tend à l'augmentation chez les sujets obèses (**Figure 30C**), cependant ces résultats restent à confirmer dans une plus large cohorte comportant notamment davantage de sujets contrôles.



**Figure 30.** Caractérisation des grandes sous-populations immunitaires intestinales (fraction épithéliale et lamina propria) dans l'obésité humaine. (A) Pourcentage de cellules NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>, (B) de cellules CD14<sup>+</sup>, (C) des cellules mDC1 CD11c<sup>+</sup>, (D) de lymphocytes T totaux CD3<sup>+</sup> et de lymphocytes T régulateurs Tregs CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> et (F) des

*lymphocytes B CD20<sup>+</sup> dans la lamina propria et l'épithélium de 6 sujets minces (L), 17 sujets obèses non diabétiques (Ob) et 17 sujets obèses diabétiques (ObD).*

Dans l'épithélium et la LP, le pourcentage de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>, qui représentent la population majoritaire dans l'intestin, reste inchangé chez les sujets obèses par rapport aux sujets minces (**Figure 30D**). Cette observation suggère que l'état inflammatoire de l'intestin chez les sujets obèses résulte en partie d'une augmentation du nombre des lymphocytes T comme nous l'avons décrit précédemment avec l'augmentation de la densité de LT dans l'intestin grêle (Monteiro-Sepulveda et al., 2015). De manière intéressante, parmi les sous-populations de cellules CD3<sup>+</sup>, nous observons une augmentation significative du pourcentage de Tregs dans la LP et l'EPI des sujets Ob et ObD (**Figure 30E**). Dans la LP, cette augmentation est plus marquée chez les sujets obèses diabétiques, indiquant une possible dérégulation des LT dans l'obésité. Nos résultats vont à l'inverse des résultats décrits dans l'intestin des souris obèses où les Tregs se retrouvent diminués (Garidou et al., 2015; Luck et al., 2015). Cependant, les segments d'intestin étudiés diffèrent et pourraient expliquer ces différences (jéjunum pour notre étude, et côlon et iléon pour les études murines). Enfin, la fréquence des LB ne semble pas altérée dans l'obésité humaine (**Figure 30F**).

### **3.4 Discussion générale et conclusions**

Ces expériences révèlent qu'au niveau du sang circulant, l'ensemble des cellules du système immunitaire semble être impacté par l'obésité, nous observons en effet une augmentation globale du nombre de cellules immunitaires circulantes en relation avec l'IMC des sujets. Parmi ces leucocytes, peu de populations immunitaires sont altérées en termes de fréquence chez les sujets obèses et obèses diabétiques, il n'y a pas de modification de l'équilibre entre les différentes grandes populations immunitaires. Nous observons une augmentation du nombre absolu de cellules immunitaires innées et adaptatives qui suit l'augmentation de cellules immunitaire globale mais qui n'est pas spécifique. Cependant, les LT pourraient avoir un rôle clé dans l'inflammation systémique associée à l'obésité par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires de type Th1 et Th17 que l'on retrouvé augmenté dans l'obésité et le diabète. Cet effet pourrait être amplifié par l'augmentation significative du nombre absolu de lymphocytes T totaux dans le sang des sujets obèses. De manière intéressante, nous observons une forte diminution de la fréquence et du nombre absolu de cellules dendritiques plasmacytoïdes qui pourrait être liée à la diminution de la réponse vaccinale dans l'obésité, ces

cellules jouant un rôle spécifique dans l'immunité anti-virale (Frasca et al., 2016). Dans l'intestin des sujets obèses, le même constat est établi : nous démontrons l'augmentation de la fréquence de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> dans la lamina propria des sujets obèses mais peu de modifications dans les fréquences de cellules immunitaires parmi CD45<sup>+</sup>.

Ces résultats montrent pour la première fois dans l'obésité humaine, la caractérisation des cellules immunitaires à la fois dans le sang et dans l'intestin des mêmes sujets. Il est également important de noter la très forte hétérogénéité dans les résultats obtenus. Il sera donc intéressant, dans un deuxième temps, de mettre en relation les données immuno-inflammatoires obtenues avec les paramètres biocliniques des sujets et de comprendre s'il est possible de stratifier les patients.

De plus, pour une partie des sujets, un suivi post-opératoire est prévu à 3, 6 et 12 mois après chirurgie bariatrique. Pour ces patients, j'ai effectué les analyses des marquages de cytométrie en flux dans le sang, ce qui nous permettra de suivre l'évolution des paramètres immunitaires, et notamment de la production de cytokines T après perte de poids induite par la chirurgie bariatrique et rémission du diabète chez certains patients.

Enfin, dans le cadre du projet MetaCardis, les données immunitaires obtenues seront mises en relation avec les données métagénomiques des patients.

#### 4. Etude n°3 – Implication des cellules MAIT dans le développement des maladies cardiométaboliques

##### Article #2

Touch S\*, Assmann KE\*, Aron-Wisnewsky J, Marquet F, Rouault C, Fradet D, Mosbah H, Poitou C, MetaCardis Consortium, Isnard R, Helft G, Lehuen A, Clément K\*, André S\*. *MAIT cells are depleted and prone to apoptosis in cardiometabolic diseases. A soumettre à Circulation.*

##### Contexte et objectifs :

L'obésité s'accompagne généralement de complications cardiométaboliques qui sont caractérisées par une évolution en termes de symptômes. Un trait commun observé dans l'obésité et des comorbidités telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires est un état d'inflammation chronique de bas grade. Dans le contexte de l'obésité, nous avons observé des changements de l'immunité innée et adaptative dans le sang et dans le jéjunum absorptif. Dans le sang, nous montrons une augmentation globale de l'immunité (augmentation du nombre de cellules CD45<sup>+</sup>). Parmi ces leucocytes totaux, le nombre absolu des grandes sous-populations de cellules immunitaires est également augmenté. En revanche, peu de modifications sont observées en termes de fréquences et de phénotypes dans l'obésité et le diabète de type 2. Les cellules MAIT constituent une population de LT non conventionnels qui reconnaissent spécifiquement des dérivés bactériens issus du métabolisme de la vitamine B. La fréquence de ces cellules est diminuée dans plusieurs pathologies inflammatoires telles que les maladies autoimmunes et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Dans l'obésité et le diabète de type 2, la fréquence des cellules MAIT est diminuée et négativement corrélée avec l'indice de masse corporelle (Carolan et al., 2015; Magalhaes et al., 2015a). L'obésité et le diabète de type 2 étant des facteurs de risque pour le développement des maladies cardiovasculaires, nous avons donc émis l'hypothèse que la fréquence des cellules MAIT pouvait également être altérée dans d'autres maladies cardiométaboliques et notamment dans les maladies cardiovasculaires.

De la même façon que l'étude n°2, ce projet s'inscrit dans le cadre du projet Européen MetaCardis mais est cette fois-ci étendu à d'autres pathologies que l'obésité.

**Mes objectifs ont été de caractériser le nombre, la fréquence et le phénotype des cellules MAIT circulantes à différents stades de progression des maladies cardiométaboliques, de**

**relier ces altérations avec les paramètres biocliniques des sujets et enfin de proposer un mécanisme expliquant la diminution des cellules MAIT en circulation.**

Patients et méthodes :

Pour répondre à nos objectifs, nous avons étudié par cytométrie en flux la fréquence, le nombre absolu et le phénotype des cellules MAIT circulantes à différents stades de maladies cardiométaboliques chez 373 patients obèses (n = 66), syndrome métabolique (n = 43), diabétiques de type-2 (n = 138), coronariens avec (n = 27) ou sans (n = 76) insuffisance cardiaque ainsi que 66 témoins contrôles de la cohorte MetaCardis. Ces données ont été corrélées avec les paramètres biocliniques des sujets après ajustement sur l'âge.

Résultats :

Dans un premier temps, nous montrons pour la première fois une diminution de la fréquence et du nombre absolu de cellules MAIT dans le sang des sujets souffrant de syndrome métabolique et de maladie coronarienne avec ou sans insuffisance cardiaque par rapport à des sujets sains. Cette diminution, en fréquence et en nombre absolu, est particulièrement marquée chez les patients atteints de maladie coronarienne avec insuffisance cardiaque. Nous confirmons également la diminution de la fréquence des cellules MAIT dans le sang des sujets obèses et obèses diabétiques par rapport aux témoins minces non diabétiques.

Nous avons ensuite étudié les corrélations entre le pourcentage de cellules MAIT dans le sang avec différentes variables biocliniques. Parmi les paramètres étudiés, l'équilibre glycémique (% HbA1c) est l'un des seuls paramètres, avec la CRP et l'IP-10, négativement corrélés avec le pourcentage de MAIT à la fois dans les groupes métaboliques (obésité, syndrome métabolique et diabète de type 2) et cardiovasculaires (coronaropathies avec et sans insuffisance cardiaque).

Enfin, ce résultat nous a amené à tester l'hypothèse que la perte des MAIT pouvait être liée à une glucotoxicité. En exposant des cellules MAIT et des cellules T conventionnelles (TCONV) à des doses croissantes de glucose, nous montrons que les MAIT sont plus apoptotiques que les TCONV en conditions hyperglycémiques.

Conclusion :

Cette étude montre que la diminution des cellules MAIT dans le sang est un point commun dans les dérégulations métaboliques et cardiaques. Une hypothèse pouvant expliquer cette réduction est l'effet délétère du glucose sur la survie de ces cellules.

## **Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are depleted and prone to apoptosis in cardiometabolic diseases: findings from the European MetaCardis study**

### **Authors:**

Sothea Touch<sup>1,2,3,\$</sup>, Karen E. Assmann<sup>1,2,3,\$</sup>, Judith Aron-Wisnewsky<sup>1,2,3,4</sup>, Florian Marquet<sup>1,2,3</sup>, Christine Rouault<sup>1,2,3</sup>, Magali Fradet<sup>3</sup>, Héléna Mosbah<sup>1,2,3,4</sup>, Christine Poitou<sup>1,2,3,4</sup>, MetaCardis Consortium<sup>#</sup>, Richard Isnard<sup>4</sup>, Gérard Helft<sup>3,4</sup>, Agnès Lehuen<sup>5</sup>, Karine Clément<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Sébastien André<sup>1,2,3,\*</sup>

### **Collaborators:**

# MetaCardis Consortium : Clinical investigators; Jean-Michel Oppert, Jean Kh emis, Dominique Cassuto, Léa Martini, Cécile Ciangura, Camille Vatier, Fabrizio Andreelli, Frederic Bosquet, Sophie Jacqueminet, Agnès Hartemann, Chloé Amouyal, Olivier Bourron, Philippe Giral, Gilles Montalescot, Olivier Barthelemy, Johanne Sylvain, Françoise Pousset, Jean-Sébastien Hulot, Mathieu Kerneis, Lila Boubrit, Thibault Petroni, Jean-Philippe Bastard, Soraya Fellahi

### **Author information:**

<sup>1</sup> INSERM, UMR\_S 1166, Team 6 Nutriomics, F-75013, Paris, France;

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, UMR\_S 1166, F-75005, Paris, France;

<sup>3</sup> Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, F-75013, Paris, France;

<sup>4</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition, Endocrinology and Cardiology Departments, F-75013, Paris, France;

<sup>5</sup> INSERM U1016, Institut Cochin, and Laboratoire d'Excellence INFLAMEX, Université Paris Descartes, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>\$</sup> and \* These authors contributed equally to this work

### **Corresponding authors:**

\* Dr Sébastien André

UMR\_S 1166, Team 6 Nutriomics,

Institute of Cardiometabolism and Nutrition

91 boulevard de l'Hôpital, F-75013, Paris, France

Tel: +33 1 40 77 97 54

E-mail: [sebastien.andre@upmc.fr](mailto:sebastien.andre@upmc.fr)

\* Prof. Karine Clément

UMR\_S 1166, Team 6 Nutriomics,

Institute of Cardiometabolism and Nutrition

91 boulevard de l'Hôpital, F-75013, Paris, France

Tel: +33 1 40 77 97 30

## **Abstract:**

**Background and aims:** Cardiometabolic diseases (CMDs) represent a considerable burden for health care systems. Low-grade inflammation has been identified as an important mediator of cardiometabolic dysfunctions. Our team has recently demonstrated that the frequency of circulating mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, a subset of T cells that recognizes bacterial vitamin B metabolites, is decreased in obesity and type-2 diabetes (T2D). We hypothesized that reduction of MAIT cell worsens with CMDs severity. Thus, we aimed to quantify circulating MAIT cells in a large population of patients with various forms of CMDs and assess a potential mechanism underlying MAIT loss from the bloodstream.

**Methods:** Blood samples were collected from 66 healthy subjects and 373 patients recruited from the MetaCardis cohort. Patients were classified in 5 groups of CMDs clinically defined as metabolic syndrome, obesity, T2D, coronary artery disease with or without heart failure. We examined frequencies and absolute numbers of MAIT cells identified as CD3<sup>+</sup>CD161<sup>hi</sup>Vα7.2 TCR<sup>+</sup> cells by flow cytometry. Markers of activation and survival were also investigated. These parameters were put in relation with bioclinical variables.

**Results:** Despite a global increase of circulating leukocytes, MAIT cell frequency and absolute number in the blood were significantly decreased in all CMD groups as compared to healthy controls. A more drastic decrease was observed in patients with coronary artery disease and heart failure as compared to all other groups. Among a number of clinical parameters available in the MetaCardis participants, inflammation markers, including CRP and IP-10, and HbA1c reflecting long-term deterioration of glucose homeostasis were the factors that were consistently correlated with MAIT cell frequency in metabolic and cardiovascular patients. *In vitro* exposition of MAIT cells and classical T cells to increasing doses of glucose promoted MAIT cells apoptosis while conventional T cells were not altered.

**Conclusions:** A reduced proportion of MAIT cells appears to be a common cellular signature observed in CMD patients, with a particularly marked depletion in patients with coronary artery disease and heart failure. Our results indicate that MAIT cell loss may in part be related to inflammatory and metabolic stress, notably hyperglycemia.

## Introduction

Cardiometabolic diseases (CMDs) and their comorbidities currently represent a considerable burden for health care systems in terms of morbidity, mortality and costs. CMDs and more specifically obesity and type-2-diabetes (T2D), often remain resistant to changes of diet/lifestyle and progress despite treatments. Importantly, CMD and overt cardiovascular diseases (CVD) represent chronic diseases that can progress, exacerbate and/or relapse into acute forms through time. A common link between obesity and several comorbid conditions, including T2D and CVD, is a chronic low-grade inflammatory state defined by the moderate but chronic systemic elevation of components involved in the inflammatory process, such as white blood cells and cytokines (1,2). Numerous clinical and experimental studies have established a strong link between systemic inflammation and insulin resistance, pancreatic dysfunction and cardiovascular complications, including coronary artery disease (3–5)

Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells represent a recently characterized subset of non-conventional T cells (6). In humans, MAIT cells constitute a significant population of T cells in the peripheral blood, but are also one of the most enriched T cells in the liver (7) and are also very abundant in the intestinal mucosa. MAIT cells express an invariant T cell receptor  $\alpha$  (TCR $\alpha$ ) rearrangement (TCR V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33) that recognizes specific bacterial derived vitamin B metabolites presented by MR1, a monomorphic class-I-related MHC molecule (8–10). They can be activated by various species of gram positive and negative bacteria and yeast but not viruses and are therefore important for early protection against bacterial infections (11). In healthy individuals, MAIT cell frequency varies with age (12–15). Among young individuals, MAIT cell frequency appears to positively correlate with age, whereas it decreases afterwards as indicated by a recent study (15). Interestingly no effect of gender was observed to impact MAIT cells frequency (12). Importantly, metabolic alterations also impacts MAIT cells, since their frequency decreases during obesity (with a negative correlation with body mass index (BMI) (16), type-2-diabetes and even more in obese diabetic patients (16,17).

Since obesity is a well-documented risk factor for both T2D and coronary artery disease (18,19), one can speculate that patients at increasing severity stages of CMDs might present a decreased MAIT cell frequency as compared to lean individuals. Depletion of MAIT cells have been reported in a number of chronic diseases, unrelated to obesity, including autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease (20), respiratory diseases including asthma (20) and cystic fibrosis (21) and infectious diseases such as cholera and HIV

(21). These human observations suggest that a variety of different inflammatory, metabolic and /or disease-related stressors are implicated in MAIT cell loss.

Since more severe stages of CMD are related to an exacerbation of both metabolic dysfunction and inflammatory stress (3,4,22), we herein hypothesized that the decrease of MAIT cells worsens with the severity of CMDs. Our aim was to analyze MAIT abundance and phenotype in a large human population including healthy subjects and patients with different forms of CMDs, ranging from metabolic syndrome, obesity and T2D to overt coronary artery disease with heart failure. In this population, a number of anthropometric, bioclinical and inflammatory parameters allowed us to address associations with MAIT cell abundance and phenotype. We also aimed to assess a potential apoptosis-related mechanism of MAIT cell loss from the bloodstream in the context of cardiometabolic stress.

## **Methods**

### ***Study cohort***

Peripheral blood samples were collected from a cohort of 439 subjects aged 20-75 years old with various stages and severities of cardiometabolic diseases, prospectively recruited between 2013 and 2015 at Pitié-Salpêtrière Hospital (ICAN, Institute of Cardiometabolism And Nutrition) for the European project MetaCardis. Subjects were classified into 6 groups according to the following parameters: 1/ patients with metabolic syndrome (MS; n = 43) composed of non-diabetic patients presenting the metabolic syndrome based on the International Diabetes Federation 2005 Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome (<http://www.idf.org/metabolic-syndrome>) i.e. waist circumference  $\geq 94$  cm in men and  $\geq 80$  cm in women, and any two of the following four factors : i) triglycerides levels  $\geq 1.7$  mmol/L or treatment for lipid abnormality (statin or fibrate); ii) HDL cholesterol  $< 1.03$  mmol/L for European men and  $1.29$  mmol/L in European women and/or or treatment for lipid abnormality; iii) abnormal blood pressure (BP): systolic BP  $\geq 130$  mmHg or diastolic BP  $\geq 85$  mmHg or anti-hypertensive treatments and abnormal fasting plasma glucose  $\geq 5.6$  mmol/L. 2/ Severely obese subjects (i.e. BMI  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup>) (OB; n = 89) without type-2 diabetes nor coronary artery or any other cardiovascular diseases. 3/ Obese and non-obese patients with type-2 diabetes (T2D; n = 138) without symptomatic coronary artery disease or any previous cardiovascular event. Type-2 diabetes was defined using ADA definition: fasting glycemia  $> 6.9$  mmol/l and/or HGPO G120  $> 11$  mmol/l and/or HbA1c  $\geq 6.5\%$  and/or use of any anti-diabetic treatment (23). 4/ Patients with either a first recent ( $< 2$  weeks) event of coronary artery

disease or chronic coronary artery disease, both with normal cardiac function (CAD; n = 76) defined upon cardiac ultrasound with a left-ventricular ejection fraction (LVEF)  $\geq$  45%. 5/ Patients suffering from chronic coronary artery disease and heart failure (CAD-CHF); n = 27) defined upon ultrasound evaluated LVEF < 45%. 6/ A healthy control group (HC; n = 73) was composed of non-obese (BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>) volunteers without type-2 diabetes, cardiovascular diseases, chronic inflammatory or infectious disease. Clinical characteristics of the overall cohort are summarized in **Table 1** and in **Supplemental Table 1**.

The Ethics Committee (Comité de protection des personnes, CPP Ile-de-France) approved the clinical investigations. All subjects provided written informed consent and the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and is registered in clinical trial <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02059538>.

### ***Flow cytometry analysis***

To characterize and quantify immune cells, 100  $\mu$ l of whole blood were incubated with Fc receptor blocking reagent (Miltenyi Biotec) and stained at 4°C for 20 minutes in the dark with the following antibodies: APC-Vio770-anti-human CD45 (clone: 5B1), Vioblue-anti-human CD3 (BW264/56), PE-Vio770-anti-human CD4 (VIT4), PerCP-Vio700-anti-human CD8 (BW135/80), APC-anti-human CD25 (4E3), FITC-anti-human CD127 (MB15-18C9), PE-anti-human CD161 (191B8) from Miltenyi Biotec and APC-Cy7-anti-human TCR V $\alpha$ 7.2 (3C10) from Biolegend. Red blood cells lysis and cell fixation was obtained with incubation of VersaLyse lysing solution containing IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter). Data acquisition was performed on a MacsQuant Analyzer using MacsQuantify software (Miltenyi Biotec). Data were analyzed with FlowJo 10.1r5 software (Tree Star).

### ***Biochemical analyses***

Blood samples were collected after an overnight fast. Fasting glucose, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, triglycerides and haemoglobin A1c (HbA<sub>1c</sub> – glycated haemoglobin) were measured using enzymatic methods. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and  $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT) were measured via kinetic assays based on coupled enzyme systems. Fasting insulin and C-peptide were measured using a chemiluminescence assay (Insulin Architect, Abbott). Leptin was measured using the Human Leptin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc.) High-sensitivity c-reactive protein (hs-CRP) was measured using an IMAGE automatic immunoassay system (Beckman-Coulter,

Fullerton, CA) and high-sensitivity interleukine 6 (hs-IL-6) was measured using the Human IL-6 Quantikine HS ELISA Kit, (R&D Systems, Inc.). Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) and C-X-C motif chemokine 5 (CXCL5) were measured using a LUMINEX assay (ProcartaPlex Mix&Match Human 13-plex, eBioscience). Finally, circulating N-terminal pro-brain natriuretic peptide (pro-BNP) was measured using an ELISA assay.

### ***Collection of anthropometric and clinical data***

Weight and height were measured during the clinical inclusion visit according to standardized procedures. Body fat mass was measured via bioelectrical impedance analysis. The complete list of prescribed medications as well as the patient's medical history was gathered. Systolic and diastolic blood pressure was measured using a mercury sphygmomanometer (measures were taken three times on each arm, and the mean of the last 2 measurements in the right arm was used for analyses). Left-ventricular ejection fraction (LVEF), left-ventricular end-systolic dimension (LVESD) and left-ventricular end-diastolic dimension (LVEDD) were obtained via cardiac ultrasound performed on the day of the examination. .

### ***Apoptosis assay***

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from peripheral blood from 6 healthy non-obese donors. After a Ficoll gradient centrifugation (Stemcell) and collected in Phosphate-Buffered Saline 1X (Gibco). PBMC were depleted in CD14<sup>+</sup> monocytes using CD14 MicroBeads from Miltenyi Biotec. PBMC enriched in T cells were resuspended at  $1.10^6$ /ml and cultured for 20 hours in RPMI 1640 Medium 1X (Gibco) containing L-Glutamine and no D-Glucose, completed with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin and 1% sodium pyruvate (Gibco) with increasing doses of D-Glucose (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 and 20 g/L; Sigma). Staurosporine (0,5  $\mu$ M; Abcam) was used as a positive control for induction of cell death. After 20 hours of incubation, PBMC were stained with the following antibodies: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD161 and anti-TCR V $\alpha$ 7.2 for 20 min then washed in Annexin V buffer and stained for 15 min with Annexin V APC and fixable viability dye eF506 from eBioscience. Apoptosis was assessed by flow cytometry based on the percentage of Annexin V<sup>+</sup> cells among MAIT cells (CD161<sup>high</sup> V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> cells among CD3<sup>+</sup>) and conventional T cells. The percentage of glucose-induced apoptosis was calculated according to the formula:  $100 \times (\% \text{ of experimental apoptotic cells} - \% \text{ of spontaneously apoptotic cells}) / (100 - \% \text{ of spontaneously apoptotic cells})$  (24).

### *Statistical analysis*

Participant characteristics were presented as medians (1<sup>st</sup> quartile, 3<sup>rd</sup> quartile) and compared across study groups, using Kruskal-Wallis tests for continuous variables and Chi<sup>2</sup>-tests for categorical variables. Moreover, specific comparisons between the control group and each of the other groups were conducted via Mann-Whitney-U tests and Chi<sup>2</sup>-tests with Bonferroni-correction for multiple testing. The main variables of interest were the % and absolute number of MAIT cells.

The distributions of immunological indicators according to study group were displayed as group-specific dot plots. Differences between the control group and each of the other groups were tested via age-adjusted analysis of covariance (ANCOVA) models. For these ANCOVA models, relative and absolute abundances of MAIT cells, the percentage of T lymphocytes among CD45<sup>+</sup> leukocytes, and the percentage of double-negative (DN) T cells among CD3<sup>+</sup> T cells were normalized using logarithmic transformation (after addition of constants). The percentage of MAIT cells expressing the marker CD127 was normalized using normal scores as described by Blom (25). In some analyses, differences between group CAD-CHF and the different cardiometabolic disease groups were also tested, using the same methodology. We applied adjustment for multiple testing using Bonferroni- corrections (multiplication of p-values with the number of comparisons made per analysis).

The relation between the relative circulating abundance of MAIT cells and bioclinical participant characteristics was tested using age-adjusted (i.e. partial) Spearman correlations – within the whole study sample and within each study group. These results were presented as a heatmap for all bioclinical indicators except cardiac health- indicators, and as correlation plots for variables related to cardiac health.

Dot plots (including unadjusted comparisons of immunological parameters across study groups) were created with GraphPad Prism 6.01, the heatmap was created with the “gplots”-package in R 3.3.2, and all other analyses were conducted with the Statistical Analysis Systems, version 9.4, statistical software package (SAS Institute, Inc.). All statistical tests were two-tailed with a significance level of 0.05.

## Results

### *Blood MAIT cells frequencies and numbers, but not total T cells are significantly decreased in metabolic and cardiovascular diseases*

Circulating MAIT cell frequencies were quantified in 66 healthy subjects and 373 patients classified in 5 groups of subjects with distinct and overlapping clinically defined CMDs (**Table 1**). Of note, a significant number of obese subjects were found in metabolic syndrome (MS), type-2 diabetes (T2D), coronary artery disease without heart failure (CAD) and without heart failure (CAD-CHF) groups. Similarly, 27.6 and 48.1% of patients with CAD and CAD-CHF respectively were type-2 diabetic. In addition, significant differences between groups were observed with regards to age and sex ratio.

MAIT cells are characterized by a high expression of CD161 and the invariant TCR  $\alpha$  chain, Va7.2 (**Fig 1A**). A complete representative gating strategy is presented in **Suppl Fig 1**. Strikingly, as previously observed, MAIT cell frequencies among T cells displayed strong inter-individual variability (**Fig 1B**). To address the heterogeneity of MAIT cell frequencies, we looked for correlation with age and gender. We found that in this population, MAIT cell frequency decreased with age (Spearman correlation coefficient  $r = -0.22$ ,  $p < 0.0001$ ), while no statistical difference was found with gender. Thus, all further statistical analyses were age-adjusted.

MAIT cell frequency was significantly lower in OB, MS and T2D as compared with the healthy lean controls (**Fig 1B**). We also observed a decreased frequency of MAIT cells in CAD and CAD-CHF patients. Importantly, MAIT cells were further significantly reduced in patients with CAD-CHF as compared to all the other groups (all  $p < 0.05$ ).

All CMD groups displayed an increased number of total CD3<sup>+</sup> T cells with the exception of CAD-CHF (**Fig 1C**). Nevertheless, a significant decrease of MAIT cells absolute number in all CMDs groups as compared with healthy controls was found (**Fig 1D**). The more marked decrease was found in CAD-CHF group. As previously observed, MAIT cells are mostly CD8<sup>+</sup> and we observed no significant differences in the frequency of CD4 and CD8 among MAIT between CMD groups (**Suppl Fig 1A**). Furthermore, we analyzed the proportion of other T cell populations and did not observe any difference in the proportions of CD4<sup>+</sup> T-helper cells (**Suppl**

**Fig 2B**), CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells (**Suppl Fig 2C**), CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> double-negative T cells (**Suppl Fig 2D**) or of CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>low</sup> regulatory T cells (Tregs) (**Suppl Fig 2E**) between groups.

### *Age-adjusted correlation between MAIT cell frequencies and markers of heart function biomarkers*

We further aimed to better characterize the impact of cardiac dysfunction on MAIT cells frequency, therefore the subsequent analyses were solely performed in CAD and CAD-CHF patients. We observed a positive correlation between the frequency of MAIT cells and ultrasound evaluated left-ventricular ejection fraction (LVEF) representing cardiac systolic function (**Fig 2A**: partial Spearman  $r = 0.33$ ,  $p = 0.002$ ) and an inverse correlation between MAIT frequency and left-ventricular ejection diastolic dimension (LVEDD) (**Fig 2B**:  $r = -0.27$ ,  $p = 0.01$ ) and left-ventricular ejection systolic dimension (LVESD) (**Fig 2C**:  $r = -0.26$ ,  $p = 0.01$ ). Both parameters (LVEDD and LVESD), when increased, are markers of left ventricular enlargement and thus of diastolic dysfunction (26). Of note, there was no significant age-adjusted correlation between the frequency of MAIT cells and pro-BNP, a systemic biomarker of cardiac insufficiency (27) modeled as a continuous variable (**Fig 2D**:  $r = -0.17$ ,  $p = 0.08$ ). However, when splitting pro-BNP into two categories, high or low pro-BNP, i.e. <50 years and < 450 pg/ml/ 50-75 years and <900 pg/ml, >75 years and <1800 pg/ml (28), we observed that MAIT cell abundance was decreased in patients with high pro-BNP ( $p$  from age-adjusted ANCOVA=0.003), thus those with the most severe form of cardiac diseases.

### *Expression of activation and survival markers on MAIT cells*

We next aim to evaluate whether the phenotype of MAIT cells could be altered in CMDs. For this purpose, we chose to quantify the activation marker CD25 (IL-2R) and the survival marker CD127 (alpha chain of IL-7R). MAIT cells of OB and T2D patients expressed a higher frequency of CD25 cells as compared to controls (**Fig 3A**). By contrast, the frequency of CD25<sup>+</sup> MAIT cells was not significantly altered in the other groups, suggesting distinct level of MAIT activation across CMD forms. The frequency of CD127<sup>+</sup> cells among MAIT was increased in patients with MS and decreased in OB, CAD and CAD-CHF and remained unchanged in TD2 (**Fig 3B**). In the whole population, the frequency of CD127<sup>+</sup> MAIT cells was positively correlated with MAIT cell frequency (Spearman correlation coefficient  $r = 0.498$ ,  $p < 0.0001$ ) reflecting the role of CD127 as a survival marker (**Fig 3B**).

***MAIT cell frequencies correlates with body composition, glucose homeostasis, liver health and inflammatory markers in CMD***

In the whole study population, we observed inverse associations between the frequency of MAIT cells and BMI, increased adiposity and plasma leptin (**Fig 4**). We also found inverse association with blood-derived markers of glucose homeostasis (plasma glucose, HbA1c, plasma C-peptide, plasma insulin) as well as surrogates of non-alcoholic fatty liver diseases (ALT, AST, GGT) and inflammation (CRP, IL-6, IP-10). By contrast, there was a positive correlation between plasma HDL and the frequency of MAIT cells. In stratified analyses, according to study groups (controls; groups MS, OB and T2D combined; groups CAD and CAD-CHF combined), significant associations were observed for HbA1c, CRP and IP-10.

***Elevated glucose concentration promotes MAIT cells apoptosis***

The observed relation between MAIT cell frequency, T2D and HbA1c led us to investigate whether glucose toxicity induces MAIT cell loss in the blood. We then exposed T-cells enriched PBMC to increasing doses of D-glucose (1 to 20 g/L) for 20 hours and analyzed apoptosis of MAIT cells and conventional T cells by flow cytometry as measured by the surface expression of phosphatidylserine (Annexin-V positive staining). Staurosporine was used as a positive control for cell death induction (**Fig 5A**). Our results show that MAIT cells but not conventional T cells undergo apoptosis when exposed to high concentrations of glucose (**Fig 5B, 5C**).

## **Discussion**

We herein display new findings on the relation between the abundance of circulating MAIT cells and cardiac health, in a large study cohort composed of 439 French individuals, including healthy controls and patients presenting different forms of CMDs. Moreover, confirming previous findings about the decrease of MAIT cell abundance in obese individuals and T2D patients (16), we also demonstrate that MAIT cells are affected by glucose toxicity.

### ***Circulating MAIT cells as a marker of CMD progression***

We hypothesized that the worsening of CMDs stages, going from solely metabolic alteration to overt form of cardiovascular diseases with cardiac insufficiency would be mirrored by a progressive loss of circulating MAIT cells. Our results confirm that there is a marked decrease in relative MAIT cell frequency in the spectrum of CMD going from lean healthy individuals to individuals with solely metabolic alterations (metabolic syndrome, obesity or T2D) to finally those with overt coronary artery disease with cardiac insufficiency in whom levels of MAIT cells were substantially lower than in any other CMD groups. Importantly, on top of a substantial decrease in number in those patients we also observe a marked reduction of MAIT cells expressing the activation marker CD25 and the survival marker CD127, thus possibly suggesting an added qualitative dysfunction in those severely diseased patients. The differences in expression of CD25 across study groups are particularly intriguing, since a higher expression was observed among OB and T2D participants, while a lower expression was observed among participants with coronary artery disease and this will need further experiments to better understand the underlying physiopathological mechanisms.

### ***Patients with coronary artery disease – a group with a particularly marked loss of MAIT cells***

Interestingly, we went beyond group distribution, i.e with or without cardiac insufficiency, and showed that reduced MAIT cell frequency was indeed linked to adverse cardiac function markers. Our findings indicate a more pronounced loss of MAIT cells in patients with the most severe forms of cardiac dysfunction as seen with cardiac ultrasound evaluation, i.e. lower LVEF, higher LVEDD, higher LVESD, but also systemic biomarkers with increased circulating pro-BNP. Elevated pro-BNP is a known diagnostic tool of cardiac dysfunction but also of patient prognosis independently of other clinical or biological variable (29). We could hypothesize that a reduced level of MAIT cells could also be predictive of poor prognosis.

### ***Potential underlying mechanisms***

It is of high interest that we consistently found inverse associations between the frequency of MAIT cells and HbA1c in groups MS, OB and T2D combined, as well as in groups CAD and CAD-CHF combined – and among all participants. We believe that associations with this parameter were more consistent than associations with plasma glucose, C-peptide and insulin because HbA1c reflects long-term glucose homeostasis, and MAIT cells may be particularly sensitive to the effects of long-lasting high plasma glucose concentrations. Indeed, these results confirm previous findings from our group in an independent cohort comparing 30 T2D patients, 69 patients with severe obesity and 23 healthy controls (16). We observed a drastic reduction of the proportion of MAIT cells among circulating CD3<sup>+</sup> cells in obese and diabetic participants as compared to controls. The decrease was even more important in patients with both obesity and T2D. Another team also displayed that individuals with HbA1c levels higher than 41 showed a significantly lower MAIT cell frequency than those with lower HbA1c levels. A similar observation was made for participants with insulin resistance (defined by a homeostasis model assessment for insulin resistance) (17). Going further into mechanistic study, we hypothesized that glucotoxicity may be a key mechanism that mediates and increases MAIT cells apoptosis and thus a progressive loss of these immune cells from the blood stream. Our *in-vitro* glucose toxicity assay confirmed this hypothesis: a much larger proportion of MAIT cells underwent apoptosis in response to high concentrations of glucose as compared to conventional T lymphocytes. Hence, MAIT cells may be particularly sensitive to chronically elevated blood glucose levels, which could partly explain the lowered proportion of MAIT cells among all T lymphocytes in patients into the different CMD groups. Indeed, HbA1c reaches pathological levels in the T2D group but as observed in **Table 1**, the mean HbA1c in each group is beyond normal and reaches levels that characterize at least prediabetic states as defined by ADA (23). This concord with previous finding, where MAIT cells were demonstrated to have a higher propensity to apoptosis than conventional T cells (24). Gérard *et al.* have elucidated that both MAIT cells and invariant natural killer (iNKT) T cells present a particular pro-apoptotic propensity that is dependent on the transcription factor promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) (24).

#### **Other factors contributing to loss of circulating MAIT cells:**

In the context of CMDs, factors other than chronically elevated fasting blood glucose could trigger an increased MAIT cell apoptosis.

Obesity and increased adiposity could play a major role as suggested herein by the inverse correlation of MAIT cells with BMI and fat mass. These results are concordant with our previous findings where MAIT cells were reduced in the obese individuals (16) as well as in an Irish study comparing 35 obese and 30 non-obese individuals. The absolute numbers of MAIT cells were substantially lower among the obese participants as compared to the non-obese participants, however no significant correlation was observed between BMI and MAIT cells in this study (17). Interestingly, the proportion of MAIT cells that expressed PD-1, a marker of clonal exhaustion, was significantly higher in obese individuals than in non-obese individuals.

It is of interest that a significant correlation between MAIT cell frequencies and BMI was found in the French study published by Gérard *et al.*, but not in the Irish study published by Carolan *et al.* More interestingly than overall corpulence, in our study we show a strong correlation with increased adiposity and leptin level, thus probably suggesting a role of adipose tissue in MAIT cell frequency.

In our study, an age-adjusted inverse correlation between relative MAIT cell abundances and indicators of obesity severity (BMI, percentage body fat and circulating levels of leptin) was observed in non-stratified analyses, but not in analyses stratified according to CMD status. In addition, within the different study groups, representing different stages of CMDs, MAIT cell frequencies were similar among those with a BMI < 30 kg/m<sup>2</sup> and those with a BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>.

Hence, we believe that other underlying mechanisms than solely increased corpulence could be involved in MAIT cell loss, such as an increased metabolic and inflammatory stress – as indicated by our finding that HBA1c and different types of inflammation markers. During obesity and related metabolic alteration, adipose tissue becomes pro-inflammatory with immune cell infiltration and increased inflammatory secretion among which IP-10 (30). Indeed, long-term low-grade systemic inflammation may be a stressor that could enhance pro-apoptotic signaling, as suggested by our finding of consistent inverse correlations between frequency of MAIT cells and different inflammatory protein or cytokines (i.e. CRP as well as IP-10) in groups MS, OB and T2D combined, as well as in groups CAD and CAD-CHF combined.

Indeed, some data from the literature also seem to point at an effect of systemic inflammation in infectious and non-infectious diseases on MAIT cells (7,20,21,31,32). Hence, MAIT cell depletion appears to be a common feature of diverse types of pathological states. Interestingly, MAIT cells frequency is enriched in the liver, where they represent approximately 20 to 50% of T lymphocytes; and it has been suggested that they may have an important role in first line

of defense of the liver (7). Our finding that MAIT cell frequency was inversely correlated with GGT in the whole study sample as well as in the coronary artery disease- groups), ALT in the whole study sample and ASAT in the coronary artery disease- groups, is in line with a potential implication of MAIT cells in liver health.

Two main mechanisms have been suggested to explain the depletion of circulating MAIT cells in the context of disease and metabolic dysfunction: the recruitment of MAIT cells to tissues, including the liver (7) and adipose tissue (16), and activation-induced apoptosis (33). Our glucose toxicity assay indicates that MAIT cell loss may also be related to stress-induced apoptosis.

Lastly, the role of gut microbiota on MAIT cells cannot be excluded since they acquire their phenotype via their interaction with intestinal gut microbiota (11). Furthermore, MAIT cells are not detectable in germ free mice (34). It is now well demonstrated that during obesity and metabolic alterations, gut microbiota undergoes profound dysbiosis with a drastic gene richness reduction (35,36). Thus, we propose that gut microbiota dysbiosis could alter circulating MAIT cells frequency. Of course, this remains to be tested and evaluated in all the severity forms of CMD included in this study.

### ***Limitations and strengths***

The main limitation of the present study relies in its cross-sectional study design, which does not enable to establish causal relations. It would be of major interest to study the association between MAIT cell frequencies and CMDs in a prospective study design, in order to verify whether disease progression differs between those with initially low and high MAIT cell frequencies. For example, patients presenting the metabolic syndrome with initially lower MAIT cell frequencies may have a higher probability to evolve towards more severe stages of CMDs than their counterparts with initially higher MAIT cell frequencies. Of course, it could also be the other way around where the increasing severity of the disease alters circulating MAIT cells frequency via direct or indirect mechanism. A second limitation concerns the glucose toxicity assay: the tested glucose concentrations were quite high, which makes a direct comparison with *in vivo* conditions (i.e. biologically plausible blood glucose concentrations) difficult. However, *in-vitro*, 1-2 g/l is a usually applied concentration for the cultivation of blood cells.

An important strength of our investigation is the availability of data from both healthy individuals of the general population and patients at different forms of CMDs. Moreover, a large variety of clinical and biological data was available for participants, including very detailed information on immunological parameters.

## **Conclusion**

In conclusion, our findings indicate, for the first time, that the relative abundance of circulating MAIT cells may serve as an interesting indicator of cardiometabolic health, given its apparent sensitivity to metabolic and inflammatory stress and to other stress factors that may be particularly pronounced in chronic heart failure. Our results thus pave the way for future studies on the frequency and pathophysiology of MAIT cells in relation to cardiac remodeling. Further experimental studies are needed to elucidate the mechanisms behind these observations, and to explore whether there may be direct or indirect causal associations between MAIT cell abundance and MAIT cell activity with the progression of cardiometabolic diseases, and coronary artery disease in particular.

## **Author contributions**

KC is the coordinator of Metacardis consortium, KC, SA, CP and JAW have designed the study; KC, JAW, CP, RI, GH, and clinical investigators (from Metacardis Consortium) recruited the patients, KEA developed the analysis pipeline and performed statistical analysis. ST, KEA, JAW, KC and SA contributed to data interpretation; ST, FM, CR, MF and HM carried out experiments (cell sorting and phenotyping, blood measurements, cell studies), AL performed critical reading and is the coordinator of OB-MAIT project. All authors contributed to the preparation, writing, and approval of the manuscript.

## **Acknowledgements**

We thank the subjects for their participation in the Metacardis study and particularly patient association (Alliance du Coeur and CNAO). We also thank Dr Dominique Bonnefont-Rousselot and Randa Bittar (Department of Metabolic Biochemistry, Pitié-Salpêtrière hospital) the analysis of plasma lipid profiles. The authors wish to thank Aurélie Gestin who contributed to flow cytometry experiments. We thank the nurses, technicians, clinical research Assistant and data managers from the Clinical investigation platform at the Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN) for patient investigations and the Clinical Investigation Center (CIC) from Pitié-Salpêtrière Hospital for investigation of healthy controls.

Quantal medical supervised regulatory aspect of the clinical intervention and contributed to the processing and management of electronic data.

### **Availability of data and materials**

Correspondence and requests for data used in this study should be directed to Prof. Karine Clément (karine.clement@psl.aphp.fr) or Dr Sébastien André (sebastien.andre@upmc.fr).

### **Sources of funding**

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR OB-MAIT), and the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement HEALTH-F4-2012-305312 (METACARDIS). Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP) is the promoter of the clinical investigation.

### **Disclosures**

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):875–80.
2. Guarner V, Rubio-Ruiz ME. Low-grade systemic inflammation connects aging, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Interdiscip Top Gerontol*. 2015;40:99–106.
3. Golia E, Limongelli G, Natale F, Fimiani F, Maddaloni V, Pariggiano I, et al. Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. *Curr Atheroscler Rep*. 2014 Sep;16(9):435.
4. Tiong AY, Brieger D. Inflammation and coronary artery disease. *Am Heart J*. 2005 Jul;150(1):11–8.
5. Wu J, Xia S, Kalionis B, Wan W, Sun T. The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. *BioMed Res Int*. 2014;2014:615312.
6. Tilloy F, Treiner E, Park S-H, Garcia C, Lemonnier F, Salle H de la, et al. An Invariant T Cell Receptor  $\alpha$  Chain Defines a Novel TAP-independent Major Histocompatibility Complex Class Ib–restricted  $\alpha/\beta$  T Cell Subpopulation in Mammals. *J Exp Med*. 1999 Jun 21;189(12):1907–21.
7. Kurioka A, Walker LJ, Klenerman P, Willberg CB. MAIT cells: new guardians of the liver. *Clin Transl Immunol*. 2016 Aug 19;5(8):e98.
8. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012 Nov 29;491(7426):717–23.
9. Corbett AJ, Eckle SBG, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, et al. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature*. 2014 May 15;509(7500):361–5.
10. Franciszkiewicz K, Salou M, Legoux F, Zhou Q, Cui Y, Bessoles S, et al. MHC class I-related molecule, MR1, and mucosal-associated invariant T cells. *Immunol Rev*. 2016 Jul;272(1):120–38.
11. Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, Guihot A, Froux N, Coré M, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol*. 2010 Aug;11(8):701–8.
12. Lee O-J, Cho Y-N, Kee S-J, Kim M-J, Jin H-M, Lee S-J, et al. Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults. *Exp Gerontol*. 2014 Jan;49:47–54.
13. Novak J, Dobrovolny J, Novakova L, Kozak T. The decrease in number and change in phenotype of mucosal-associated invariant T cells in the elderly and differences in men and women of reproductive age. *Scand J Immunol*. 2014 Oct;80(4):271–5.
14. Hiejima E, Kawai T, Nakase H, Tsuruyama T, Morimoto T, Yasumi T, et al. Reduced Numbers and Proapoptotic Features of Mucosal-associated Invariant T Cells as a Characteristic Finding in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Jul;21(7):1529–40.

15. Walker LJ, Tharmalingam H, Klenerman P. The rise and fall of MAIT cells with age. *Scand J Immunol*. 2014 Dec;80(6):462–3.
16. Magalhaes I, Pingris K, Poitou C, Bessoles S, Venteclef N, Kief B, et al. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J Clin Invest*. 2015 Apr;125(4):1752–62.
17. Carolan E, Tobin LM, Mangan BA, Corrigan M, Gaoatswe G, Byrne G, et al. Altered distribution and increased IL-17 production by mucosal-associated invariant T cells in adult and childhood obesity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Jun 15;194(12):5775–80.
18. Wild SH, Byrne CD. Risk factors for diabetes and coronary heart disease. *BMJ*. 2006 Nov 11;333(7576):1009–11.
19. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006 Feb 14;113(6):898–918.
20. Hinks TSC. Mucosal-associated invariant T cells in autoimmunity, immune-mediated diseases and airways disease. *Immunology*. 2016 May;148(1):1–12.
21. Wong EB, Ndung'u T, Kasprovicz VO. The role of mucosal-associated invariant T cells in infectious diseases. *Immunology*. 2017 Jan;150(1):45–54.
22. Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, Eckel J. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 2012 Jun 1;302(11):H2148–65.
23. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2014 Jan;37 Suppl 1:S14-80.
24. Gérard S, Sibérel S, Martin E, Lenoir C, Aguilar C, Picard C, et al. Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood*. 2013 Jan 24;121(4):614–23.
25. Blom G. *Statistical Estimates and Transformed Beta-Variables*. New York: John Wiley & Sons; 1958.
26. Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, et al. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007 Oct;28(20):2539–50.
27. Waldo SW, Beede J, Isakson S, Villard-Saussine S, Fareh J, Clopton P, et al. Pro-B-type natriuretic peptide levels in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008 May 13;51(19):1874–82.
28. Maisel A, Mueller C, Adams K, Anker SD, Aspromonte N, Cleland JGF, et al. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail*. 2008 Sep;10(9):824–39.

29. Fonarow GC, Peacock WF, Phillips CO, Givertz MM, Lopatin M, ADHERE Scientific Advisory Committee and Investigators. Admission B-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007 May 15;49(19):1943–50.
30. Yu S, Cho HH, Joo HJ, Bae YC, Jung JS. Role of MyD88 in TLR agonist-induced functional alterations of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem.* 2008 Oct;317(1–2):143–50.
31. Reantragoon R, Boonpattanaporn N, Corbett AJ, McCluskey J. Mucosal-associated invariant T cells in clinical diseases. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2016 Mar;34(1):3–10.
32. Treiner E. Mucosal-associated invariant T cells in inflammatory bowel diseases: bystanders, defenders, or offenders? *Front Immunol.* 2015;6:27.
33. Cosgrove C, Ussher JE, Rauch A, Gärtner K, Kurioka A, Hühn MH, et al. Early and nonreversible decrease of CD161<sup>++</sup> /MAIT cells in HIV infection. *Blood.* 2013 Feb 7;121(6):951–61.
34. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature.* 2003 Mar 13;422(6928):164–9.
35. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013 Aug 29;500(7464):541–6.
36. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature.* 2013 Aug 29;500(7464):585–8.

## Figure legends

**Table 1. Presentation of participant characteristics by study group (N=439), MetaCardis study (2013-2015), France<sup>1</sup>.** Abbreviations: BNP, brain natriuretic peptide; HC, healthy controls; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LVEDD, left-ventricular end-diastolic dimension; LVEF, left-ventricular ejection fraction; LVESD, left-ventricular end-systolic dimension; CAD, participants suffering from coronary artery disease without heart failure; CAD-CHF, participants suffering from coronary artery disease with heart failure; MS, participants presenting the metabolic syndrome; OB, participants presenting severe obesity; T2D, participants suffering from type-2 diabetes. <sup>1</sup>Values are median (1<sup>st</sup> quartile, 3<sup>rd</sup> quartile) for continuous variables and n (%) for categorical variables. <sup>2</sup>P-value for overall differences across groups, obtained via Kruskal-Wallis tests for continuous variables and Chi<sup>2</sup>-tests for categorical variables. Differences between the HC-group and each of the other groups were tested *via* Mann-Whitney-U tests and Chi<sup>2</sup>-tests (Bonferroni-corrected statistical significance: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). The percentage of diabetic individuals was not compared between the HC-group and the other groups since the HC-group contained no diabetic participants by definition. Moreover, such comparisons were not made for those cardiac health-related variables that were not available in the HC-group. <sup>3</sup>Measured in blood plasma obtained under fasting conditions.

**Figure 1. Decreased frequency and number of circulating MAIT cells in CMD.** (A) Flow cytometry analysis of the frequency of V $\alpha$ 7.2 TCR<sup>+</sup> CD161<sup>hi</sup> MAIT cells among CD3<sup>+</sup> T cells and (B) the absolute number of CD3<sup>+</sup> T cells and (C) MAIT cells in the blood. Panel (A) and (C) were based on data from 439 individuals: healthy lean subjects (HC, n = 66), metabolic syndrome (MS, n = 43), obese non-diabetic (OB, n = 89), type-2-diabetic subjects (T2D, n = 138), patients with acute or chronic coronary artery disease (CAD, n = 76) and patients with coronary artery disease and congestive heart failure (CAD+CHF, n = 27). Panel (B) was based on data from 379 individuals. Bonferroni-corrected statistical significance obtained *via* age-adjusted analysis of covariance: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001. Straight blue lines represent medians and the dotted line represent the median in the HC group. Red dots represent type-2-diabetic patients.

**Figure 2. Correlation between additional markers of cardiac function and the logarithm of % MAIT among all circulating T-lymphocytes.** Correlations between the logarithm of MAIT cell frequency and (A) left ventricular ejection fraction (%) (n = 90), (B) left ventricular

end-diastolic dimension (mm, n = 90), (C) left ventricular end-systolic dimension (n = 89) and (D) the logarithm of pro-BNP (pg/ml, n = 101). Abbreviations: BNP, brain natriuretic peptide; r, age-adjusted Spearman correlation coefficient.

**Figure 3 Phenotype of circulating MAIT cells in CMD.** (A) Flow cytometry analysis of the frequency of CD25<sup>+</sup> and (B) CD127<sup>+</sup> among Va7.2 TCR<sup>+</sup> CD161<sup>hi</sup> MAIT cells in the MetaCardis cohort (n = 439). Bonferroni- corrected statistical significance obtained via age-adjusted negative binomial regression (A) and analysis of covariance (B): \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001. Straight lines represent medians. Red dots represent type-2-diabetic patients.

**Figure 4. Heatmap illustrating age-adjusted partial Spearman correlations between MAIT cell frequency and clinical and immunological parameters.** Abbreviations: ALT, alanine- aminotransferase; ASAT, aspartate-aminotransferase; CRP, high sensitivity c-reactive protein; CXCL5, C-X-C motif chemokine 5; GGT, gamma-glutamyltransferase; IL-6, high-sensitivity interleukin 6; IP-10, interferon gamma-induced protein 10. Number of observations available per variable: body mass index, n=434; percentage body fat, n=398; leptin, n=391; HbA1c, n=419; C-peptide, n=391; insulin, n=375; HDL, n=431; triglycerides, n=434; ASAT, n=424; GGT, n=420; ALT, n=424; systolic/ diastolic blood pressure, n=401; CRP, n=418; IL-6, n=391; IP-10, n=375; CXCL5, n=375. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

**Figure 5. MAIT cells are more prone to apoptosis under high glucose concentrations.** T-cells-enriched peripheral blood mononuclear cells (PBMC) enriched from 6 healthy donors were exposed to increasing concentrations of D-glucose or staurosporine (STS) for 20 hours. (A) Representative dot plots and (B) quantification of the frequency of annexin-V<sup>+</sup> staining among CD161<sup>hi</sup> Va7.2<sup>+</sup> MAIT cells and conventional T cells (TCONV) after exposure to 1, 10 g/L of D-glucose or 0.5 μM of staurosporine. (C) Percentage of glucose-induced cell death in MAIT and TCONV when exposed to 1 to 20 g/L of glucose. The percentage of glucose-induced apoptosis was calculated according to the formula: 100 x (% of experimental apoptotic cells – % of spontaneously apoptotic cells) / (100 – % of spontaneously apoptotic cells). % of spontaneously apoptotic cells was defined as the % of Annexin V<sup>+</sup> cells at 1 g/L of glucose.

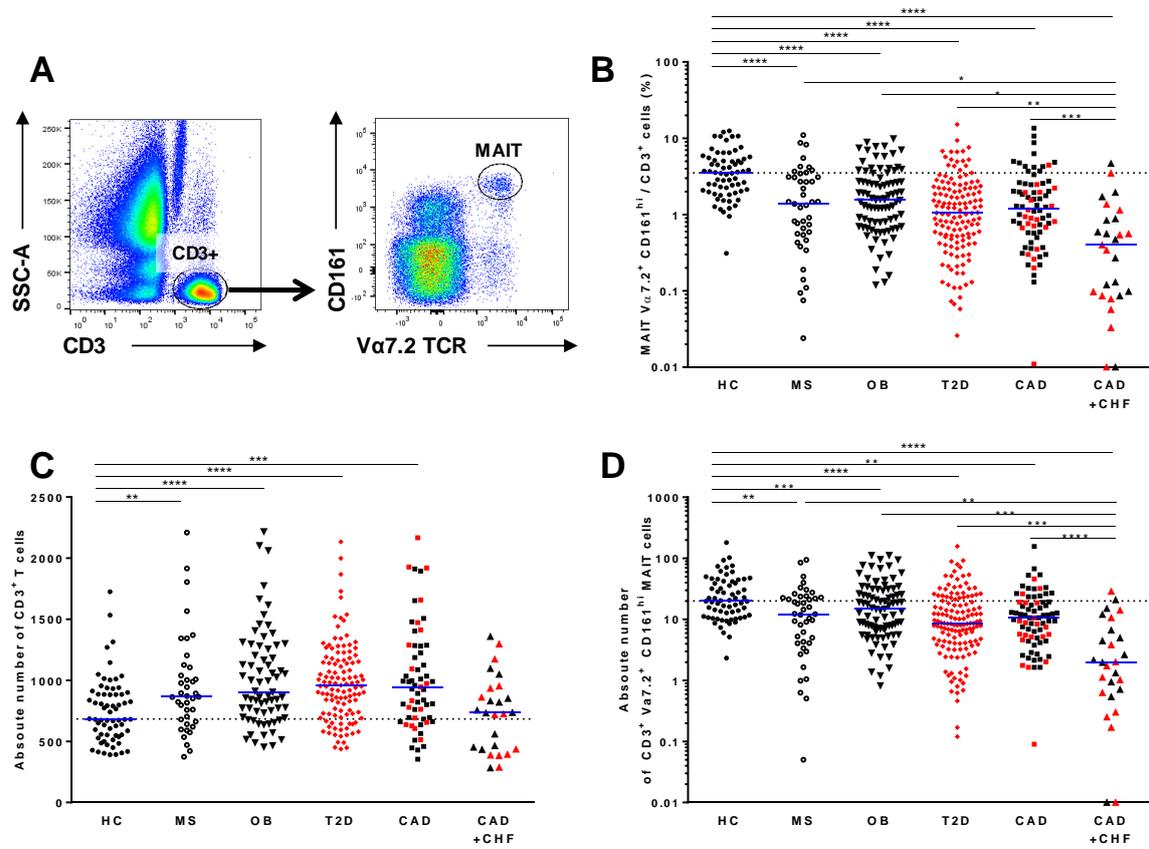
## Figures

### Table 1

**Table 1. Presentation of participant characteristics by study group (N=439), MetaCardis study (2013-2015), France<sup>1</sup>**

	N	HC (n=66)	MS (n=43)	OB (n=89)	T2D (n=138)	CAD (n=76)	CAD-CHF (n=27)
Age at inclusion (y)	439	54.5 (43.0, 63.0)	55.0 (45.0, 60.0)	42.0 (34.0, 49.0)***	58.5 (52.0, 63.0)	61.0 (56.0, 66.0)***	60.0 (56.0, 69.0)**
Men, n (%)	439	16 (24.2)	22 (51.2)	11 (12.4)	55 (39.9)	68 (89.5)	19 (70.4)
BMI at inclusion (kg/m <sup>2</sup> )	434	21.6 (20.7, 23.1)	33.7 (30.4, 37.2)***	42.2 (39.7, 46.2)***	32.1 (28.5, 37.9)***	27.2 (25.0, 30.4)***	26.5 (23.3, 30.1)***
Total fat mass (kg)	396	14.3 (12.4, 17.0)	35.1 (30.4, 47.6)***	55.9 (49.4, 63.3)***	33.8 (26.2, 44.1)***	23.8 (17.2, 31.8)***	19.9 (18.2, 31.3)
Percentage body fat (%)	398	25.0 (20.0, 29.0)	41.0 (30.6, 46.5)***	48.7 (46.6, 51.1)***	39.9 (30.5, 45.0)***	28.0 (23.9, 36.3)**	29.1 (24.6, 34.9)
Diabetic patients, n (%)	439	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	138 (100.0)	21 (27.6)	13 (48.1)
Fasting glycemia (mmol/l) <sup>3</sup>	430	4.6 (4.4, 4.9)	5.4 (4.9, 5.8)***	5.1 (4.7, 5.6)***	7.4 (6.1, 8.7)***	5.5 (4.9, 6.2)***	5.0 (4.7, 5.7)**
Glycated haemoglobin (%) <sup>3</sup>	419	5.4 (5.4, 5.6)	5.9 (5.5, 6.1)***	5.8 (5.4, 6.1)***	7.2 (6.6, 8.0)***	5.9 (5.6, 6.4)***	6.1 (5.9, 6.6)***
HDL-cholesterol (mmol/l) <sup>3</sup>	431	1.9 (1.5, 2.1)	1.0 (0.9, 1.3)***	1.2 (1.0, 1.4)***	1.1 (0.9, 1.4)***	1.0 (0.9, 1.3)***	1.0 (0.6, 1.3)***
Triglycerides (mmol/l) <sup>3</sup>	434	0.8 (0.6, 1.0)	1.6 (0.9, 1.9)***	1.2 (0.9, 1.5)***	1.6 (1.1, 2.1)***	1.4 (1.0, 1.8)***	1.0 (0.9, 1.3)***
Systolic blood pressure (mm hg)	401	117.5 (110.0, 127.5)	132.0 (122.5, 142.5)***	126.3 (117.5, 133.8)**	133.3 (123.5, 141.0)***	119.5 (109.0, 127.5)	113.0 (107.0, 125.5)
Diastolic blood pressure (mm hg)	401	69.5 (65.5, 75.0)	81.5 (72.5, 88.5)***	74.5 (66.0, 80.8)*	74.3 (70.0, 83.0)***	68.3 (61.5, 74.5)	66.3 (54.5, 74.0)
Alanine transaminase (U/l) <sup>3</sup>	424	19.0 (16.0, 22.0)	33.0 (27.0, 45.0)***	26.0 (20.0, 37.0)***	32.0 (22.0, 49.0)***	30.0 (23.0, 45.0)***	37.0 (24.0, 52.0)***
Aspartate transaminase (U/l) <sup>3</sup>	424	26.0 (22.0, 29.0)	31.0 (24.0, 35.0)	26.0 (21.0, 30.0)	28.0 (22.0, 35.0)	31.0 (25.0, 39.0)**	33.0 (27.0, 44.0)***
γ-glutamyl-transferase (U/l) <sup>3</sup>	420	20.0 (16.0, 29.0)	34.0 (27.0, 55.0)***	29.0 (22.0, 40.0)***	37.0 (26.0, 49.0)***	39.0 (25.0, 60.0)***	73.0 (26.0, 207.0)***
LVEF (%)	353	64.0 (60.0, 69.0)	65.5 (62.5, 69.0)	67.0 (64.0, 70.0)	66.0 (62.0, 71.0)	60.0 (55.0, 65.0)**	32.0 (25.0, 39.5)***
LVEDD (mm)	90	-	-	-	-	50.0 (46.0, 54.0)	60.0 (58.0, 67.0)
LVESD (mm)	89	-	-	-	-	31.0 (27.0, 35.0)	47.5 (43.5, 55.0)
Pro-BNP(pg/ml) <sup>3</sup>	101	-	-	-	-	162.0 (57.0, 398.0)	1618.0 (488.0, 3757.0)

**Figure 1**



**Figure 2**

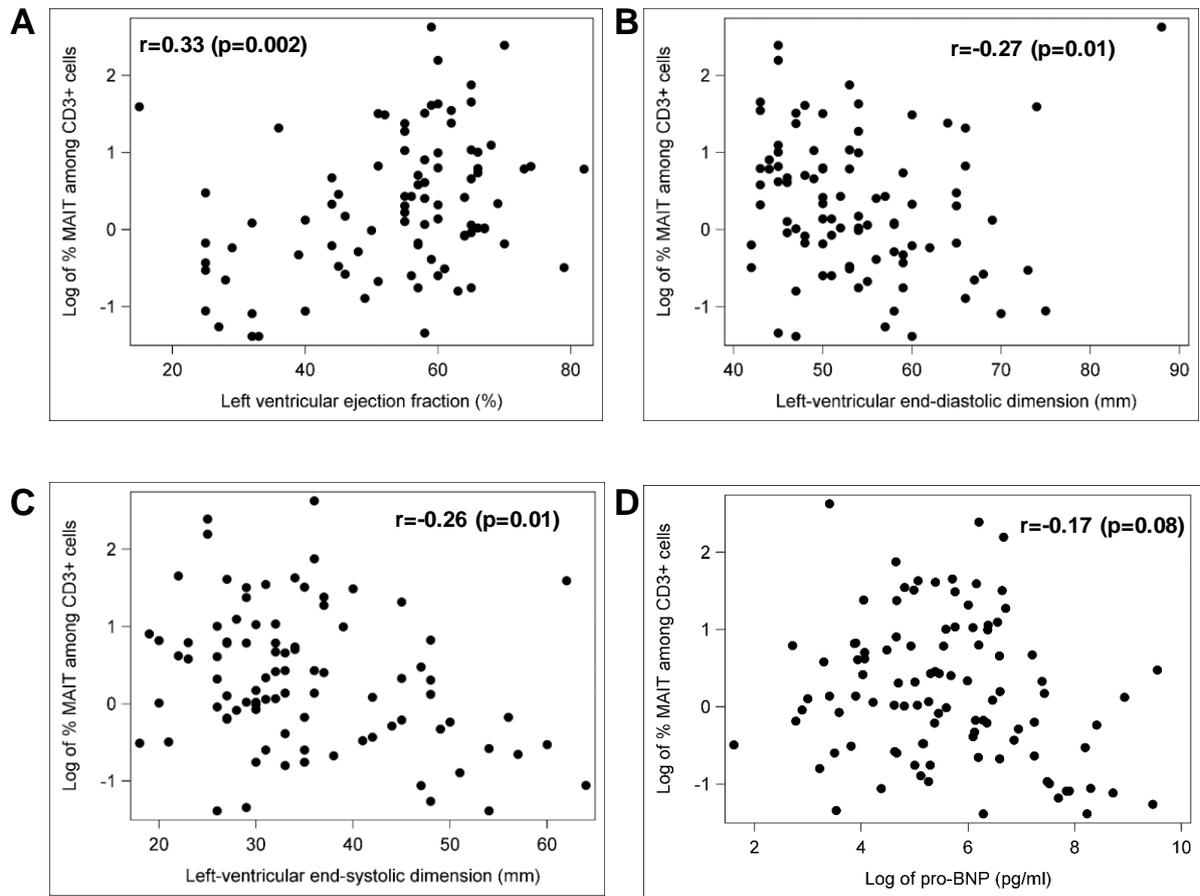
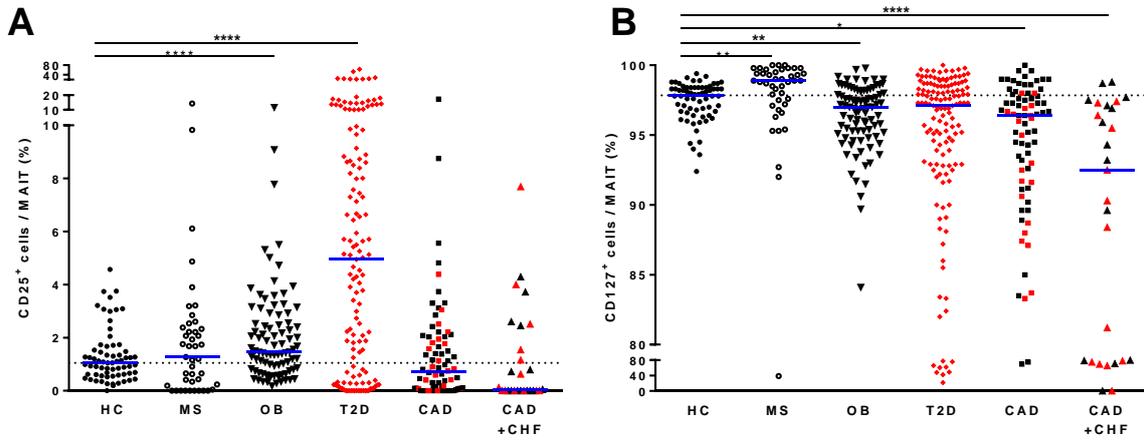


Figure 3



**Figure 4**

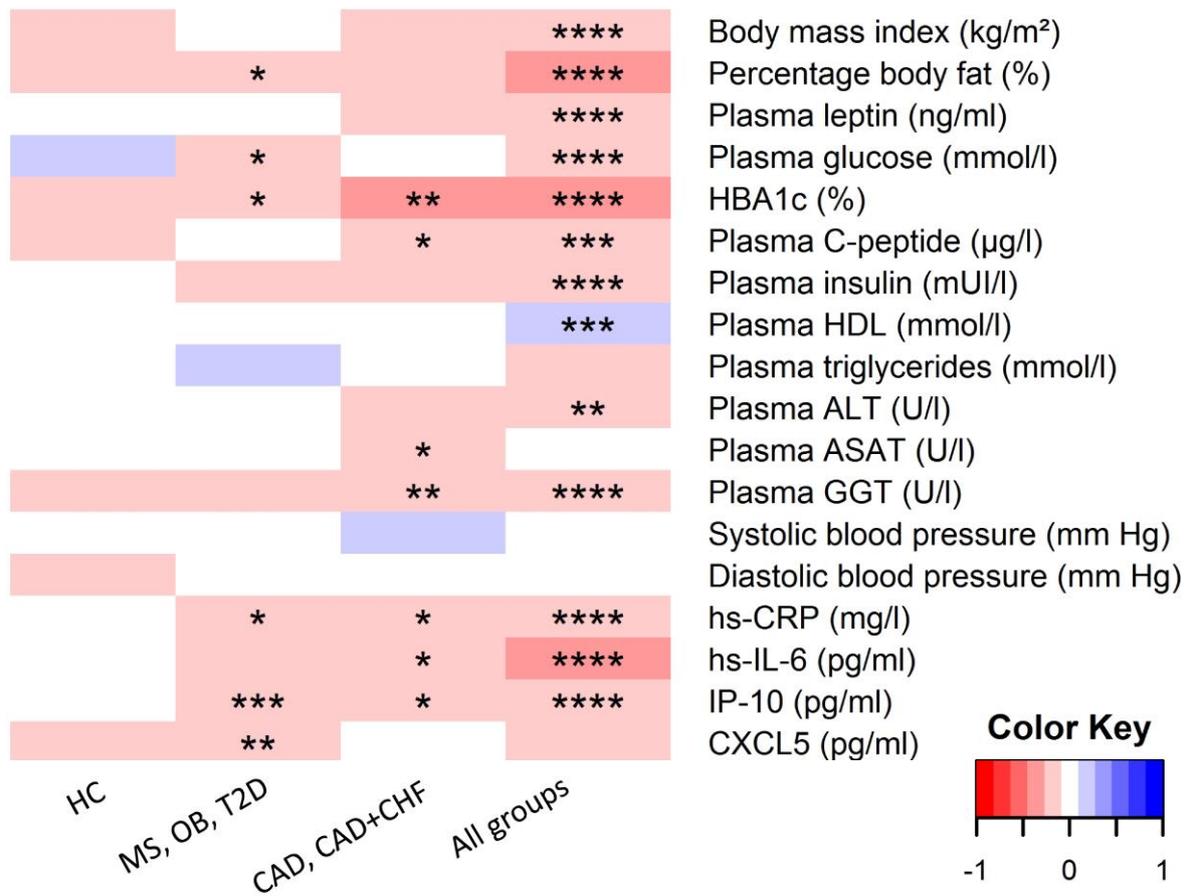
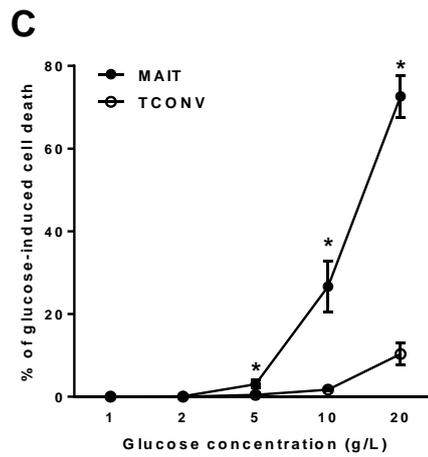
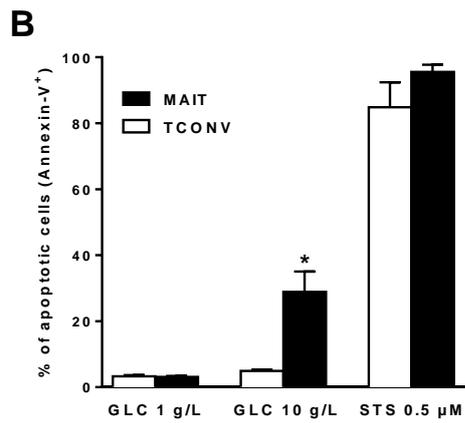
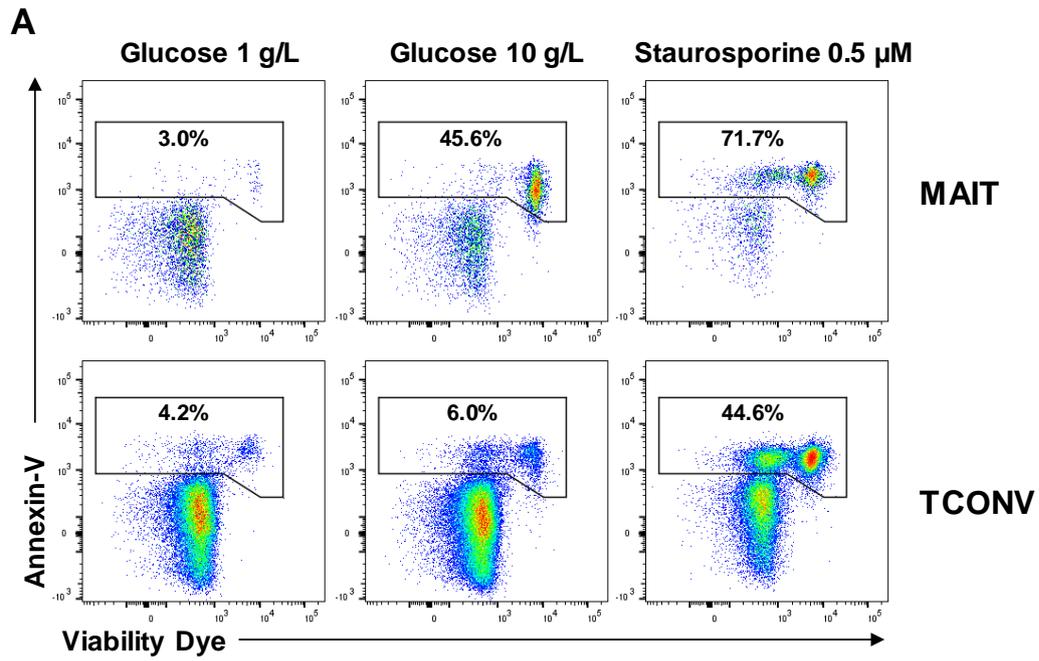


Figure 5



## Supplemental Table and Figures legends

**Supplemental Table 1. Treatments for diabetes, dyslipidemia, and hypertension by study group (N=439), MetaCardis study (2013-2016), France<sup>1</sup>.** Abbreviations: HC, healthy controls; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; CAD, participants suffering from coronary artery disease without heart failure; CAD-CHF, participants suffering from coronary artery disease with heart failure; MS, participants presenting the metabolic syndrome; OB, participants presenting severe obesity; T2D, participants suffering from type-2 diabetes. <sup>1</sup>Values are n (%). <sup>2</sup>p-value for overall differences across groups, obtained via Chi<sup>2</sup>-tests, except for the number of treatments, for which p-values were obtained via Kruskal-Wallis tests.

**Supplemental Figure 1. Flow cytometry gating strategy.** After doublet discrimination and exclusion of debris, MAIT cells were gated among CD3<sup>+</sup> T cells among CD45<sup>+</sup> leukocytes and defined as CD161<sup>hi</sup> TCR V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> cells. The expression of CD4 and CD8 among T cells and MAIT cells was analyzed. Tregs were analyzed among CD4<sup>+</sup> T cells and defined as CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>low</sup> cells.

**Supplemental Figure 2. Analysis of CD4 and CD8 among MAIT cells and T cell subsets in the MetaCardis study groups.** Flow cytometry analysis of (A) CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (DN) cells among MAIT cell shown as mean  $\pm$  SEM and (B) CD4<sup>+</sup> T cells, (C) CD8<sup>+</sup> T cells, (D) CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells and (E) CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>low</sup> cells (Tregs) among total CD3<sup>+</sup> T cells. All panels were based on data from 439 individuals. Bonferroni-corrected statistical significance obtained via age-adjusted analysis of covariance: \*p<0.05. Straight lines represent medians. Red dots represent type-2-diabetic patients.

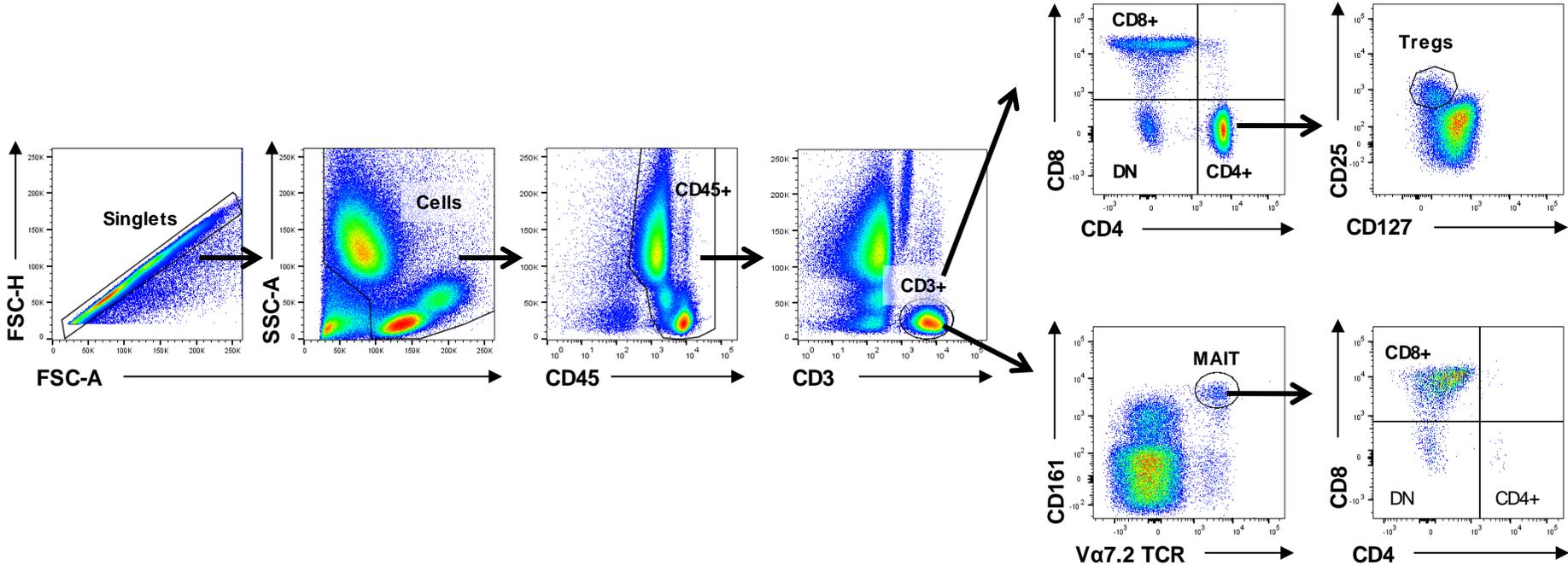
## Supplemental Table and Figures

### Supplemental Table 1

**Supplemental Table 1. Treatments for diabetes, dyslipidemia, and hypertension by study group (N=439), MetaCardis study (2013-2015), France<sup>1</sup>**

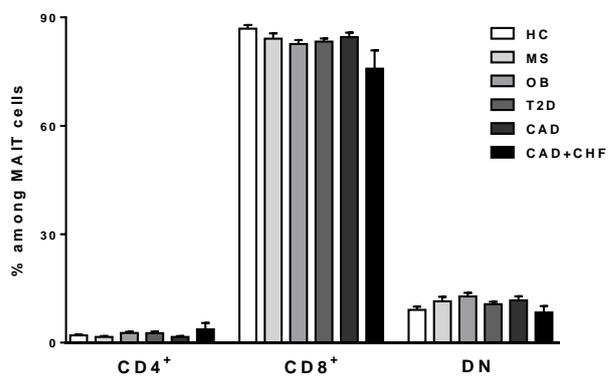
	N	HC (n=66)	MS (n=43)	OB (n=89)	T2D (n=138)	CAD (n=76)	CAD-CHF (n=27)	P <sup>2</sup>
<b>Patients with antidiabetic drugs (%)</b>	439	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	112 (81.2)	9 (11.8)	6 (22.2)	<0.001
<b>Number of antidiabetic drugs (n)</b>	397							<.0001
0		66 (100.0)	43 (100.0)	89 (100.0)	26 (18.8)	67 (88.2)	21 (77.8)	
1		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	42 (30.4)	5 (6.6)	1 (3.7)	
2		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	34 (24.6)	2 (2.6)	3 (11.1)	
3		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	20 (14.5)	1 (1.3)	1 (3.7)	
≥4		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	16 (11.6)	1 (1.3)	1 (3.7)	
<b>Patients with lipid-lowering drugs (%)</b>	426	0 (0.0)	21 (48.8)	6 (6.7)	65 (47.1)	63 (82.9)	19 (70.4)	<0.001
<b>Number of lipid lowering drugs (n)</b>	426							<.0001
0		53 (100.0)	22 (51.2)	83 (93.3)	73 (52.9)	13 (17.1)	8 (29.6)	
1		0 (0.0)	15 (34.9)	6 (6.7)	62 (44.9)	56 (73.7)	19 (70.4)	
≥2		0 (0.0)	6 (14.0)	0 (0.0)	3 (2.2)	7 (9.2)	0 (0.0)	
<b>Patients with antihypertensive drugs (%)</b>	439	1 (1.5)	31 (72.1)	24 (27.0)	75 (54.3)	63 (82.9)	23 (85.2)	<0.001

Supplemental Figure 1

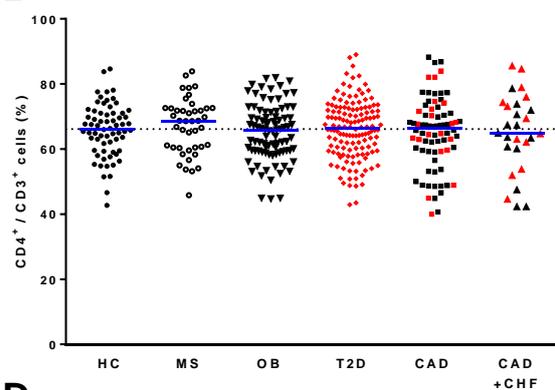


Supplemental Figure 2

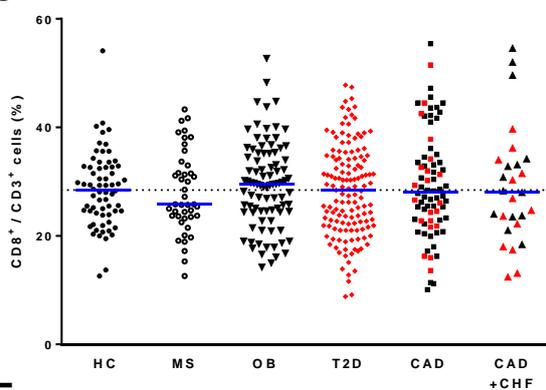
**A**



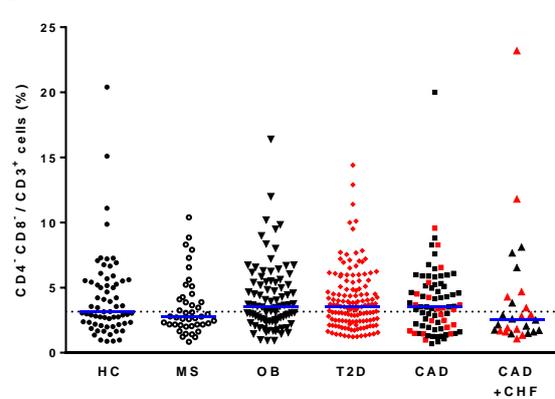
**B**



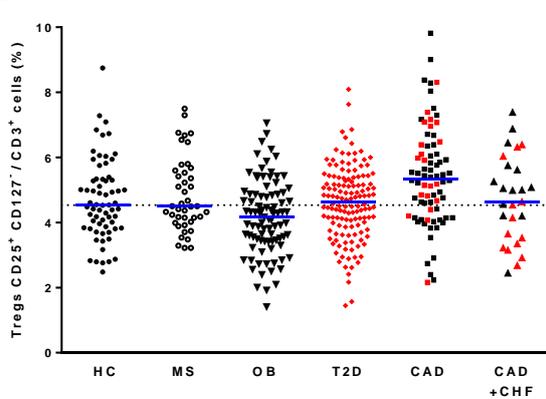
**C**



**D**

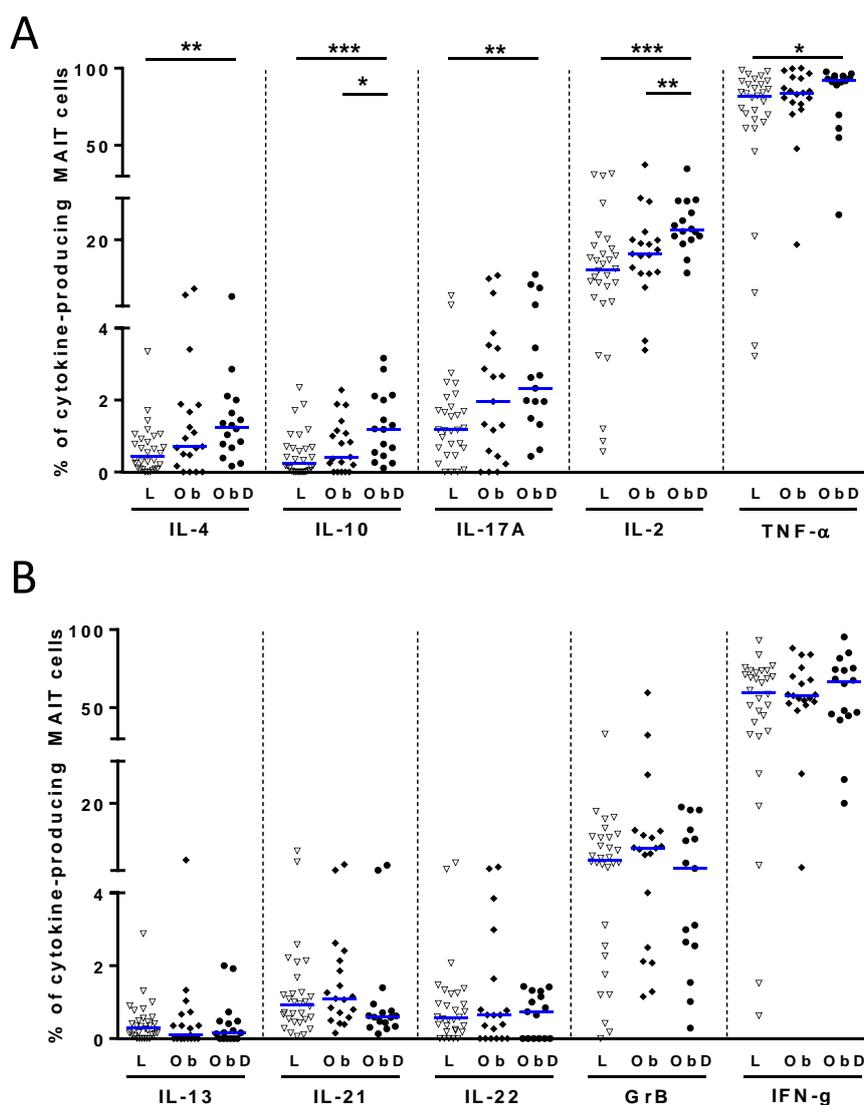


**E**



Résultats complémentaires de l'article #2 :

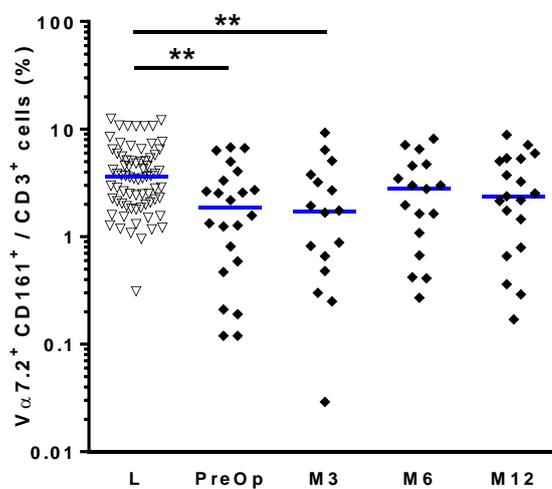
Pour aller plus loin dans la caractérisation des cellules MAIT, nous avons exploré leur profil cytokinique après stimulation *ex-vivo* dans une sous-cohorte de sujets contrôles, obèses et obèses diabétiques. Les cellules MAIT sont capables de sécréter un large éventail de cytokines et notamment de fortes quantités d'IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et de Granzyme B. Cette analyse révèle une augmentation de la production des cytokines IL-4, IL-10, IL-17A, IL-2 et TNF- $\alpha$  par les cellules MAIT dans le sang des sujets obèses diabétiques par rapport aux sujets contrôles minces (**Figure 31**). Ces résultats confirment dans une deuxième cohorte indépendante, les résultats déjà observés dans la littérature (Magalhaes et al., 2015a).



**Figure 31.** Production de cytokines intracellulaires par les cellules MAIT circulantes après 6h de stimulation PMA/ionomycine chez n = 30 sujets minces (L), 19 sujets obèses (Ob) et 16

*sujets obèses diabétiques (ObD). Tests de Mann Whitney: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . La ligne bleue représente la médiane.*

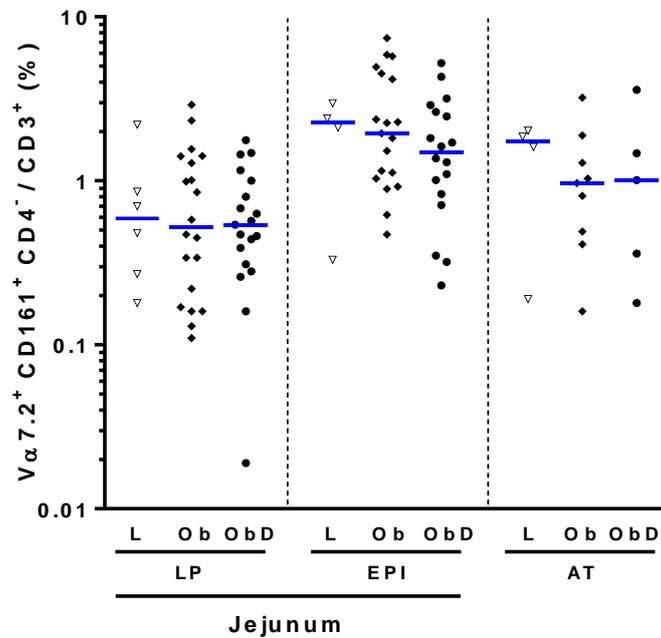
Nous avons également étudié la fréquence et le nombre absolu des cellules MAIT après perte de poids induite par la chirurgie bariatrique 3, 6 et 12 mois après opération (**Figure 32**). Nous n'observons pas de différence significative entre la fréquence de cellules MAIT avant opération et 3 mois après l'opération. Aucune différence n'est observée à 6 et 12 mois, en revanche, ces résultats ne sont plus significativement différents des résultats obtenus chez les sujets minces non obèses.



**Figure 32.** Analyse des cellules MAIT circulantes après bypass gastrique Roux-en-Y. Fréquence des cellules MAIT avant chirurgie bariatrique ( $n = 22$ ) et 3, 6 et 12 mois post-opération ( $n = 16, 17,$  and  $19,$  respectivement). (Individus contrôles,  $n = 73$ ).

Une hypothèse pouvant expliquer la perte de cellules MAIT dans la circulation serait un recrutement de ces cellules au niveau tissulaire. Pour les sujets obèses et obèses diabétiques candidats à la chirurgie bariatrique, nous avons collecté des biopsies de jéjunum et de TA omental afin d'analyser, de la même manière que dans le sang, par cytométrie en flux la fréquence des cellules MAIT dans la lamina propria (LP), l'épithélium jéjunal (EPI) ainsi que dans la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux omental (TA) (**Figure 33**). Cette étude complémentaire montre une accumulation préférentielle des cellules MAIT dans l'épithélium intestinal plutôt que dans la lamina propria, ce qui est concordant avec le phénotype même des cellules MAIT ( $CD4^+$ , plus abondantes dans l'EPI que dans la LP). En revanche nous n'observons pas de différence significative entre le pourcentage de cellules MAIT chez les

patients obèses ou obèses diabétiques par rapport aux sujets minces dans les 3 compartiments étudiés. Cependant, la difficulté à accéder à des prélèvements chirurgicaux de sujets minces, le faible nombre de sujets étudiés qui en résulte ainsi que la grande hétérogénéité des résultats ne permet pas de confirmer l'absence de modifications.



**Figure 33.** Analyse par cytométrie en flux de la fréquence des MAIT tissulaires ( $V\alpha 7.2 TCR^+ CD161^{hi} CD4^- MAIT$  parmi les  $LT CD3^+$ ) dans la lamina propria (LP), l'épithélium jéjunal (EPI) et le tissu adipeux omental (TA) de sujets L ( $n = 4 - 6$ ), Ob ( $n = 9 - 20$ ) et ObD ( $n = 5 - 19$ ).

## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse sont issus d'études entièrement réalisées chez l'homme. Ces travaux sont en effet basés sur l'utilisation de prélèvements de sang mais également de tissu adipeux omental et de jéjunum obtenus au cours de bypass gastriques Roux-en-Y. Ces bio-ressources ont été obtenues dans le cadre de protocoles d'investigation cliniques avec l'accord des patients et ont obtenu l'accord du Comité d'Ethique. Pour l'ensemble des sujets inclus dans ces études, nous avons accès à de nombreux paramètres cliniques.

### 1. Altérations de l'immunité intestinale dans l'obésité humaine

La résistance à l'insuline associée à l'obésité constitue un facteur de risque pour le développement du syndrome métabolique et du diabète de type 2, qui représentent eux-mêmes des facteurs de risque pour le développement de nombreuses complications cardiovasculaires. Dans l'obésité et le DT2, si plusieurs facteurs sont susceptibles de contribuer à l'état de résistance à l'insuline, l'inflammation chronique de bas grade au niveau systémique ainsi que dans différents tissus cibles tels que le tissu adipeux, le foie et le muscle semblent également jouer un rôle majeur dans ce processus (Olefsky and Glass, 2010). Dans l'intestin, les caractéristiques et les conséquences physiopathologiques de l'inflammation sont encore mal connues dans le contexte de l'obésité et des comorbidités associées.

Le premier objectif de ma thèse a tout d'abord été de compléter les travaux initiés par le Dr Edith Brot-Laroche en collaboration avec l'équipe du Pr Karine Clément, en cherchant à caractériser les cellules immunitaires de l'intestin grêle absorbif, et plus particulièrement les lymphocytes T présents dans la muqueuse intestinale (barrière épithéliale et lamina propria) de sujets obèses par rapport à des sujets minces.

Les travaux réalisés avant mon arrivée au laboratoire montrent par immunohistochimie une altération du nombre de cellules immunitaires innées et adaptatives (macrophages, cellules dendritiques, cellules NK et lymphocytes T) dans le jéjunum des sujets obèses et obèses diabétiques par rapport à des sujets minces. Parmi ces cellules immunitaires, les LT représentent la population immunitaire majoritaire et sont significativement augmentés dans l'obésité. Nous observons que cette augmentation est en fait due à un recrutement de lymphocytes T CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> au niveau de l'épithélium intestinal préférentiellement. En condition physiologique, il a été montré que les LT CD8 $\alpha\beta$  de l'épithélium et de la lamina propria avaient une plus forte capacité

de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par rapport aux LT CD8 $\alpha\alpha$  (Cheroutre et al., 2011). Dans le contexte de l'obésité, cette augmentation du nombre de LT CD8 $\alpha\beta$  au niveau épithélial pourrait donc être délétère. Ce recrutement massif de LT au niveau de la barrière épithéliale nous a amené à explorer le phénotype de ces LT, leur profil de sécrétion ainsi que leur impact sur la fonction des entérocytes environnants.

## **2. Rôle des cellules Th17 produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 dans l'inflammation intestinale**

Notre analyse de la production intracellulaire de cytokines par les lymphocytes T issus de la muqueuse jéjunale de sujets obèses ou de sujets minces montre une augmentation de la fréquence des LT CD4<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 dans la lamina propria ainsi qu'une augmentation du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN- $\gamma$  à la fois dans la LP et dans l'épithélium dans l'obésité humaine. Il est intéressant de noter que ces résultats sont cohérents avec d'autres observations réalisées dans 2 études chez l'homme dans le sang périphérique et le tissu adipeux omental de sujets obèses ou diabétiques (Dalmás et al., 2014; Zhao et al., 2014). Ces résultats semblent indiquer que le profil pro Th17 des cellules T CD4<sup>+</sup> pourrait être un point commun à plusieurs tissus dans le même contexte de pathologie métabolique. Il reste cependant à élucider quel est le rôle de ces cytokines sur l'intestin des sujets obèses et obèses diabétiques et si leur rôle est protecteur ou délétère.

Le **Tableau 5** résume les connaissances actuelles de l'état inflammatoire dans l'intestin grêle des sujets et des souris obèses par rapport à des contrôles minces et inclut les résultats de nos deux études (article #1 et étude #2). Les changements de l'immunité innée et adaptative observés dans l'obésité y sont rapportés. Il est intéressant de noter que si les résultats obtenus chez l'homme et la souris peuvent parfois différer, les résultats obtenus pour les cellules Th17 sont particulièrement divergents. Nos résultats vont en effet à l'inverse d'autres observations réalisées chez la souris obèse. En effet, trois études ont rapporté une diminution du nombre et/ou de la fréquence des cellules Th17 dans l'intestin grêle de souris rendues obèses par un régime gras (Cavallari et al., 2016; Cox et al., 2014; Garidou et al., 2015) et une autre étude ne montre aucune différence des cellules Th17 entre les souris sous HFD et les souris sous régime normal (Luck et al., 2015). En revanche, dans cette dernière étude, si les LT CD4<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 ne sont pas altérés chez les souris sous régime gras, les auteurs observent une augmentation de la production d'IL-17 par une autre sous-population de LT : les LT $\gamma\delta$ . La

diminution de ces cellules est associée avec une amélioration des paramètres métaboliques et de l'homéostasie glucidique. Finalement, les différences observées dans les proportions de cellules Th17 au sein des 4 différentes études dans des modèles murins peuvent s'expliquer d'une part par la variabilité dans la durée et dans la composition du régime gras, par les différences de colonisation du microbiote intestinal des souris, et notamment de la bactérie SFB qui est connue pour influencer les réponses Th17. Ainsi, plusieurs études ont montré l'importance du microbiote intestinal et de l'activation des TLR dans la différenciation des LT en Th17 (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008) ainsi que du rôle de ces Th17 dans de nombreux modèles associés à des pathologies inflammatoires voire autoimmunes (Stepankova et al., 2007).

Enfin, dans notre étude chez l'homme, nous observons une augmentation de la fréquence des cellules Th17 dans la LP des sujets obèses par rapport aux sujets minces. Cette augmentation est à mettre en parallèle avec l'augmentation de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-23 dans la lamina propria des sujets obèses, ces cytokines étant indispensables à la différenciation Th17.

Finalement, les différences que nous observons par rapport aux modèles murins peuvent également s'expliquer par la différence dans les populations cellulaires au niveau des différents segments d'intestin grêle : les résultats obtenus chez la souris sont observés dans la l'iléon alors que les résultats que nous observons sont au niveau de la partie distale de l'intestin grêle, le jéjunum. Notre étude, contrairement aux modèles murins d'obésité, est réalisée chez des sujets obèses non diabétiques. Nous pouvons nous demander quel est le profil des cellules Th17 chez des sujets obèses diabétiques.

Type cellulaire	Intestin grêle obèse	Référence
<b>Changements de l'immunité innée</b>		
LT $\gamma\delta$	↑ (souris) ↔ (humain)	(Luck et al., 2015) (Monteiro-Sepulveda et al., 2015)
MAIT	↔ (humain)	(Figure 25, page 71)
Eosinophiles	↓ (souris)	(Johnson et al., 2015)
Macrophages	↑ (humain) ↔ (souris)	(Monteiro-Sepulveda et al., 2015) (Garidou et al., 2015)
DCs	↑ (humain) ↔ (souris)	(Monteiro-Sepulveda et al., 2015) (Garidou et al., 2015)
Cellules NK	↑ (humain)	(Monteiro-Sepulveda et al., 2015)
Mastocytes	↔ (humain)	(Monteiro-Sepulveda et al., 2015)
<b>Changements de l'immunité adaptative</b>		
LT	↑ (humain)	(Monteiro-Sepulveda et al., 2015)
LT CD8 <sup>+</sup> $\alpha\beta$	↑ (souris, humain) ↑ (humain)	(Luck et al., 2015) (Monteiro-Sepulveda et al., 2015)
Th1	↑ (souris, humain) ↔ (humain)	(Luck et al., 2015) (Monteiro-Sepulveda et al., 2015)
Th17	↓ (souris) ↔ (souris) ↑ (humain)	(Garidou et al., 2015) (Luck et al., 2015) (Monteiro-Sepulveda et al., 2015)
Treg	↓ (souris) ↑ (humain)	(Luck et al., 2015) (Figure 23, page 66)
LB	↔ (humain)	(Monteiro-Sepulveda et al., 2015)

**Tableau 5.** Résumé des altérations immunitaires observées dans l'intestin grêle au cours de l'obésité par rapport au statut mince chez l'homme et la souris. Les flèches indiquent les changements en termes de fréquence et/ou de nombres dans l'obésité par rapport aux contrôles minces (↑ indique une augmentation, ↓ indique une diminution et ↔ indique qu'aucun changement n'est observé). Abréviations : DCs, cellules dendritiques ; NK, natural killer ; MAIT, mucosal-associated invariant T cells ; LT, lymphocyte T ; LTh, lymphocyte T helper (auxiliaire) ; Treg, lymphocyte T régulateur et LB, lymphocyte B. Adapté de (Winer et al., 2017).

### **3. Impact du microenvironnement pro-inflammatoire et des cytokines IL-17 et IL-22 sur la sensibilité à l'insuline des entérocytes**

Dans un système de co-culture utilisant la lignée entérocytaire Caco-2/TC7 et des LT isolés de sujets minces et obèses, j'ai observé que les facteurs solubles sécrétés par les lymphocytes T intestinaux de sujets obèses et non de sujets minces ont la capacité, *in vitro*, de diminuer la réponse à une stimulation par l'insuline des entérocytes. Parmi ces facteurs solubles, en plus de l'effet déjà connu du TNF- $\alpha$  sur la signalisation de l'insuline (Hotamisligil et al., 1993), nous montrons que le GM-CSF, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-9, l'IL-21, l'IL-17 et l'IL-22, peuvent également impacter directement la réponse à l'insuline locale au niveau de l'intestin grêle.

Les cytokines sécrétées par les T CD3<sup>+</sup> sont induites par la présence d'entérocytes humains. Le système de co-culture étant semi-perméable, il n'est pas possible de savoir si ces cytokines sont sécrétées par les lymphocytes T, les Caco-2/TC7 ou les deux types cellulaires. Ces résultats montrent cependant l'existence d'un dialogue entre les entérocytes et les cellules T intra-épithéliales. Les concentrations en GM-CSF, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  étant plus élevées chez les sujets obèses par rapport aux témoins minces, nous pourrions faire l'hypothèse qu'elles jouent un rôle dans la résistance à l'insuline des entérocytes. Cependant, l'effet du GM-CSF est nouveau et suggère l'implication de nouveaux acteurs proinflammatoires qui restent à explorer dans l'obésité.

Dans cette étude, nous avons montré que les sécrétions des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> intestinaux des sujets obèses diminuent l'effet de l'insuline dans les entérocytes. Cet effet est uniquement retrouvé lorsque les cellules T CD3<sup>+</sup> sont stimulées *in vitro*, montrant que l'effet observé est dû aux sécrétions des T CD3<sup>+</sup>, les cellules entérocytaires et lymphocytaires n'entrant pas en contact entre elles dans ce modèle. *In vivo*, ces interactions pourraient également se faire via des contacts directs entre lymphocytes T et entérocytes. En effet, notre étude du phénotype des LT dans la cohorte montre que les LT intestinaux expriment le CD103, une intégrine exprimée à la surface des LT qui se fixe à la E-cadhérine exprimée à la surface des entérocytes.

La forte densité de lymphocytes T dans le jéjunum renforce potentiellement l'effet des cytokines T sur la sensibilité à l'insuline entérocytaire dans l'obésité. L'augmentation des proportions de cellules Th17/Th22 observée dans le jéjunum des sujets obèses, est en accord avec de précédents résultats du laboratoire observés dans le tissu adipeux humain (Dalmas et al., 2014). Dans l'intestin, l'IL-17 et l'IL-22 semblent être des cytokines essentielles au maintien de la fonction barrière de la muqueuse (Lee et al., 2015; Maxwell et al., 2015;

Sonnenberg et al., 2011; Zheng et al., 2008). Dans l'obésité et contrairement aux maladies inflammatoires chroniques intestinales, il n'y a pas de destruction de la muqueuse. Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, il a été montré que les lymphocytes Th17 étaient augmentés dans la lamina propria, alors que chez des sujets atteints de colite ulcéreuse, les Th22 sont diminués dans ce compartiment, suggérant le rôle de ces cellules dans le maintien de la fonction de barrière intestinale (Leung et al., 2014).

Il est aujourd'hui connu que l'obésité est associée à des troubles métaboliques comme la résistance à l'insuline. Cette complication est retrouvée chez tous les sujets obèses à l'exception des MHO. Ces patients, considérés comme obèses sur la base de leur IMC ( $> 30 \text{ kg/m}^2$ ), ne présentent pas les facteurs de risques cardiovasculaires habituellement associés à l'obésité (diabète de type 2, dyslipidémie, hypertension). L'existence de ces sujets suggère qu'il existe des mécanismes de protection contre la résistance à l'insuline qui sont indépendants du pourcentage de masse grasse et qui restent à élucider. On pense aujourd'hui que l'inflammation chronique de bas grade retrouvée chez les patients obèses est un mécanisme clé dans le développement du diabète de type 2.

#### **4. Liens entre immunité systémique et intestinale**

Dans la muqueuse jéjunale des patients obèses, nous avons pu observer une augmentation du nombre de cellules immunitaires et notamment des LT. Ces LT intestinaux présentent un phénotype inflammatoire de type Th1 et Th17 et ont la capacité de diminuer la réponse à l'insuline intestinale. Pour aller plus loin, dans une étude complémentaire (Etude 2), nous avons comparé dans une cohorte de sujets minces, obèses et obèses diabétiques, la fréquence et/ou le nombre de cellules immunitaires à la fois dans le sang périphérique et dans le jéjunum (épithélium et lamina propria). Nous montrons que dans la lamina propria, de la même façon que dans le sang, la proportion de cellules immunitaires ( $\text{CD45}^+$ ) est augmentée dans l'obésité et cette fréquence est positivement corrélée avec l'indice de masse corporelle, supportant l'importance du rôle de l'immunité intestinale dans l'obésité humaine. Nous observons que dans la LP, la proportion de lymphocytes T régulateurs (Tregs) est également augmentée chez les sujets obèses, indiquant une possible dérégulation de la balance Th17/Tregs dans l'obésité.

Nos résultats suggèrent que l'augmentation globale de l'immunité observée dans le sang ainsi que le phénotype pro-inflammatoire des lymphocytes T, pourraient refléter certaines altérations

immunitaires observées au niveau intestinal. Ces altérations systémiques et tissulaires sont susceptibles de contribuer à l'inflammation de bas grade associée à l'obésité.

Pour l'ensemble de cette cohorte, nous avons accès à de nombreux paramètres biocliniques. L'analyse métagénomique du microbiote de ces sujets est également en cours. Dans le cadre du projet MetaCardis, l'analyse statistique de ces différents paramètres nous permettra d'identifier des liens entre les variables biocliniques, la composition du microbiote intestinal et les altérations immunitaires au niveau du sang circulant et de la muqueuse intestinale.

## **5. La diminution des cellules MAIT sanguines, un point commun dans les maladies métaboliques et cardiovasculaires ?**

Dans la dernière étude, nous avons choisi de nous intéresser à une sous-population spécifique de LT présents dans le sang et les tissus : les cellules MAIT. Avec l'âge (Lee et al., 2014; Novak et al., 2014), mais également dans de nombreuses pathologies, les cellules MAIT sont diminuées en fréquence et/ou en nombre absolu dans le sang. Cela a été observé dans le cas de maladies infectieuses (pneumopathies, tuberculose, VIH, choléra), mais de façon plus surprenante dans le cas de pathologies non infectieuses comme les pathologies autoimmunes (lupus érythémateux, polyarthrite rhumatoïde, sclérose multiple), les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn, colite ulcéreuse), l'asthme et la maladie cœliaque (Sugimoto et al., 2016). Dans les maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type-2, deux études ont montré que ces cellules étaient diminuées dans le sang, mais également que leur phénotype était altéré (Carolan et al., 2015; Magalhaes et al., 2015a). Dans les pathologies cardiovasculaires, la description des cellules MAIT sanguines n'a pas encore été faite. L'obésité et le DT2 étant des facteurs de risque pour le développement de complications cardiaques, nous avons fait l'hypothèse qu'avec la progression des maladies cardiométaboliques, le phénotype des cellules MAIT pouvait également être altéré, voire aggravé à des stades plus tardifs de la maladie. Nous avons donc étudié le nombre, la fréquence et le phénotype de ces cellules dans une cohorte de 439 sujets présentant le syndrome métabolique, de sujets obèses, diabétiques, et de sujets atteints de coronaropathies avec ou sans insuffisance cardiaque par rapport à des sujets contrôles sains. Les résultats de notre étude montrent que malgré une augmentation du nombre de cellules immunitaires totales, la fréquence, mais également le nombre absolu des cellules MAIT dans le sang sont diminués à la fois dans les pathologies métaboliques comme l'obésité, le diabète et le syndrome métabolique mais également dans la maladie coronarienne, avec et

sans insuffisance cardiaque. Nous observons d'une part que la diminution des cellules MAIT est présente à un stade précoce de la maladie métabolique telle que le syndrome métabolique, mais également que chez les sujets présentant une maladie coronarienne et une insuffisance cardiaque, les cellules MAIT sont particulièrement diminuées dans le sang par rapport aux sujets contrôles, mais également avec les sujets des autres groupes étudiés. Chez ces patients, la fréquence des cellules MAIT est positivement corrélée avec la fraction d'éjection ventriculaire gauche (LVEF), un indicateur de la dysfonction cardiaque. Cependant, cette observation ne permet pas d'expliquer si la diminution des cellules MAIT dans le sang est une conséquence de la dysfonction cardiaque, ou bien un indicateur de la sévérité de la maladie. La diminution des cellules MAIT semble être un point commun entre les maladies cardiométaboliques, mais également entre plusieurs pathologies inflammatoires.

De manière intéressante, les cellules MAIT sont particulièrement abondantes dans le foie, où elles représentent environ 20 à 50% des LT circulants (Kurioka et al., 2016). Dans notre étude, nous montrons une corrélation inverse entre la fréquence des MAIT et des enzymes du foie (GGT, ALAT et ASAT), indiquant une potentielle implication des cellules MAIT dans la fonction hépatique.

En plus de leur diminution dans le sang, nous observons des différences dans le phénotype des cellules MAIT. En effet, l'analyse de l'expression des marqueurs CD25 et CD127 (marqueur d'activation et marqueur de survie respectivement) montrent des résultats différents entre les groupes étudiés. De manière intéressante, nous observons une corrélation positive entre la fréquence des cellules MAIT et l'expression du marqueur CD127. Si la diminution des cellules MAIT est un point commun entre les différentes pathologies cardiométaboliques, leur phénotype d'activation (CD25) reste différent et spécifique selon les différents stades de progression de la maladie.

## **6. Quelles hypothèses pour la perte des cellules MAIT en circulation ?**

### **6.1 Vers un recrutement tissulaire**

Une hypothèse pouvant expliquer la perte des cellules MAIT dans la circulation sanguine est l'hypothèse d'un recrutement cellulaire au sein de tissus enflammés/ou cible de la pathologie. Par exemple, dans la tuberculose, il a été montré que les cellules MAIT étaient enrichies dans les poumons. Les deux études réalisées sur les MAIT dans l'obésité humaine montrent un

pourcentage de cellules MAIT plus élevé dans le tissu adipeux par rapport au sang, suggérant un possible recrutement de ces cellules dans les tissus inflammés (Carolan et al., 2015; Magalhaes et al., 2015a). Dans l'étude de Carolan *et al.* les auteurs trouvent cependant une diminution de la fréquence des cellules MAIT dans le tissu adipeux de 10 sujets obèses par rapport à 8 sujets non obèses. Les résultats complémentaires que nous obtenons (**Figure 25**) sont plus hétérogènes et ne comportent que 4 sujets minces, mais n'indiquent pas non plus d'augmentation de la fréquence des cellules MAIT dans le TA. Ces résultats n'excluent cependant pas complètement la possibilité d'un recrutement tissulaire, notamment dans d'autres tissus tels que le foie.

## 6.2 L'hypothèse du glucose

De manière intéressante, nous montrons une corrélation négative entre la présence des cellules MAIT dans le sang et l'hémoglobine glyquée qui reflète l'équilibre glycémique. Nous observons cette corrélation à la fois dans les groupes de sujets atteints de maladies métaboliques (syndrome métabolique, obésité et diabète) et dans les pathologies cardiaques étudiées (coronaropathie avec ou sans insuffisance cardiaque). Il est connu dans la littérature que les cellules MAIT peuvent être plus sensibles à des stress environnementaux ou à une activation du récepteur T. En effet, Gérard *et al.* montrent que les cellules MAIT, de la même façon que les cellules NKT, ont une plus grande tendance à l'apoptose qui dépend de l'expression du facteur de transcription PZLF (Gérard et al., 2013). En lien avec les corrélations que nous observons, nous avons testé l'hypothèse que la glucotoxicité pouvait expliquer la perte des cellules MAIT en circulation. *In vivo*, cela pourrait être relayé par l'environnement délétère présent dans le sang des patients atteints de pathologies cardiométaboliques. Après avoir exposé des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) en culture à des concentrations croissantes de glucose, nous avons comparé la mort cellulaire des cellules MAIT par rapport à des LT conventionnels par cytométrie en flux. Cette analyse montre qu'à des concentrations de glucose élevées (à partir de 5 g/L), la proportion de cellules MAIT apoptotiques est augmentée par rapport aux LT conventionnels qui sont moins sensibles au glucose.

Dans notre modèle *in vitro*, l'apoptose des cellules MAIT est observée à partir d'une concentration de 5 g/L de glucose. Physiologiquement, ces concentrations sont éloignées des concentrations de glucose plasmatique, même chez les sujets diabétiques. Cependant, ces concentrations sont cinq fois plus élevées que les taux de glucose habituellement trouvés dans les milieux de culture de cellules immunitaires (1 g/L dans le milieu RPMI). Une étude

complémentaire intéressante serait de mettre en culture des PBMC avec du milieu contenant des sérums de patients et de mesurer les taux d'apoptose induits.

## **7. Cellules MAIT et microbiote intestinal**

Les ligands des cellules MAIT sont des antigènes non protéiques qui incluent des précurseurs et des dérivés issus du métabolisme de biosynthèse de la riboflavine (vitamine B2) dans les bactéries. La diminution des cellules MAIT en circulation est observée dans des infections bactériennes, mais également dans des infections virales et des pathologies autoimmunes et cardiométaboliques. Cela sous-entend que d'autres mécanismes pourraient entrer en jeu dans l'activation des cellules MAIT. Dans le cadre du projet Européen MétaCardis, l'ensemble des patients de la cohorte bénéficie d'une analyse métabolomique (sang et urine) et métagénomique (séquençage haut débit de l'ADN total des échantillons fécaux). Il sera intéressant de mettre en relation nos données sur les cellules MAIT avec les métabolites bactériens issus de la synthèse de la riboflavine notamment, ainsi que la composition du microbiote intestinal (en particulier les bactéries produisant de la riboflavine) dans les différents groupes cardiométaboliques de la cohorte MetaCardis.

## **8. Limites et forces de l'étude**

Enfin, notre étude ne permet pas d'établir de relations causales entre la diminution des cellules MAIT dans le sang et le développement de pathologies cardiométaboliques. Cependant, il serait intéressant de réaliser une étude prospective afin de suivre les patients dans l'évolution de leur maladie et de vérifier, après ajustement sur l'âge, si en développant des complications cardiométaboliques, les mêmes patients présentent une diminution des cellules MAIT. Par exemple, chez les sujets souffrant de syndrome métabolique pour lesquels la fréquence de cellules MAIT est élevée, nous pourrions imaginer qu'avec l'aggravation du statut métabolique et glycémique, les patients pourraient voir leur pourcentage de cellules MAIT aggravé. Nous pouvons également nous demander si les patients de la cohorte pour lesquels les fréquences de cellules MAIT sont très bas, sont plus susceptibles de développer d'autres complications. La mesure de la fréquence des cellules MAIT pourrait dans ce cas être un marqueur de la santé cardiométabolique.

Dans une sous-cohorte de sujets obèses et obèses diabétiques, nous avons en partie tenté de répondre à cette question. Nous avons suivi avant et après chirurgie bariatrique la fréquence

des cellules MAIT dans le sang. Cependant, contrairement aux données publiées par Magalhaes *et al.*, nous ne retrouvons pas d'augmentation significative des cellules MAIT 3 mois après chirurgie bariatrique. Après chirurgie bariatrique, si les patients ont une perte de poids significative et résolvent pour certains leur diabète ou améliorent leurs paramètres glycémiques, ces patients, qui étaient massivement obèses, restent toujours obèses. Il faut rappeler que la fréquence des cellules MAIT circulantes est fortement corrélée avec l'indice de masse corporelle. Il est également intéressant de noter qu'à partir de 6 mois après bypass gastrique Roux-en-Y, nous n'observons plus de différence significative entre la fréquence des cellules MAIT chez les sujets minces par rapport aux sujets obèses. Un suivi à plus long terme est nécessaire afin de confirmer ces résultats.

Enfin, la force de cette étude réside dans le nombre de patients étudiés. En effet, nous montrons pour la première fois, dans une large cohorte de 439 sujets minces et atteints de diverses pathologies cardiométaboliques, que les cellules MAIT sont diminuées dans le sang. Pour chacun de ces patients, un large éventail de données cliniques et phénotypiques est disponible et nous permettra dans le futur d'étudier la relation entre ces données et d'autres paramètres, cliniques ou de composition du microbiote.

## CONCLUSION GENERALE

S'il est aujourd'hui bien établi que le tissu adipeux est une source importante de médiateurs de l'inflammation, il existe peu de données sur le rôle potentiel d'autres organes dans l'inflammation bas grade qui caractérise l'obésité humaine. Dans la première étude, nous avons montré que l'intestin grêle, et plus particulièrement le jéjunum absorptif était également la cible de dérégulations immunitaires, et particulièrement des lymphocytes T dont le phénotype est plus proinflammatoire dans l'intestin des sujets obèses par rapport aux sujets minces. De plus, notre étude révèle l'existence d'un dialogue délétère entre les lymphocytes T intestinaux et les entérocytes, qui est aggravé par l'obésité. Nos résultats suggèrent en effet que l'altération de la sensibilité à l'insuline intestinale dans l'obésité pourrait résulter de cytokines sécrétées par les LT jéjunaux telles que l'IL-17 et l'IL-22. Cela suggère que l'immunité intestinale pourrait participer aux perturbations locales et potentiellement systémiques caractérisant l'obésité humaine. Cependant, l'importance physiopathologique du dialogue entre LT et entérocytes dans l'inflammation et la détérioration de l'homéostasie glucidique chez le sujet obèse reste à élucider.

Dans la deuxième partie de mon projet de thèse, nous montrons que les cellules MAIT circulantes sont diminuées dans plusieurs pathologies cardiométaboliques allant du syndrome métabolique à l'insuffisance cardiaque. Cette diminution est associée avec l'équilibre glycémique et suggère un rôle délétère du glucose sur les cellules MAIT. Nous montrons en effet dans un système de culture *in vitro*, que les cellules MAIT sont plus apoptotiques que les LT conventionnels en présence de fortes concentrations de glucose. La diminution des cellules MAIT semble être un trait commun aux maladies cardiométaboliques et pourrait être un indicateur précoce des altérations métaboliques et cardiaques chez les patients. D'autres études plus mécanistiques restent cependant nécessaires pour expliquer la diminution des cellules MAIT dans le sang.

## VALORISATION DES RESULTATS DE LA THESE

### Publications scientifiques

Duval C, Teixeira-Clerc F, Leblanc AF, Touch S, Emond C, Guerre-Millo M, Lotersztajn S, Barouki R, Aggerbeck M, Coumoul X. Chronic exposure to low-doses of dioxin promotes liver fibrosis development in the C57BL6/J diet-induced obesity mouse model. *Environmental Health Perspectives*. 2016 Oct 7. [Epub ahead of print]. DOI: [10.1289/EHP316](https://doi.org/10.1289/EHP316)

Pini M, Touch S, Poirier H, Dalmas E, Niot I, Rouault C, Druart C, Delzenne N, Clément K, André S, Guerre-Millo M. Adipose tissue adaptive response to trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid engages alternatively activated M2 macrophages. *FASEB J*. 2016 Jan;30(1):241-51. DOI: [10.1096/fj.15-276675](https://doi.org/10.1096/fj.15-276675)

Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, Cotillard A, Fohrer-Ting H, Hubert EL, Remark R, Genser L, Tordjman J, Garbin K, Osinski C, Sautès-Fridman C, Leturque A, Clément K, Brot-Laroche E. Jejunal T-cell inflammation in human obesity correlates with decreased enterocyte insulin signaling. *Cell Metabolism*. 2015 Jul 7;22(1):113-24. DOI: [10.1016/j.cmet.2015.05.020](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.020)

### Awards

December 2016 – **Poster award** at ICAN Conference Series 2016 – Paris, France

May 2016 – **Poster award** at the 17<sup>th</sup> JED Physiology, Physiopathology and Therapeutics – Paris, France.

November 2014 – **Oral communication award** at the Annual Meeting of the French Society for Immunology (SFI) – Lille, France

### Communications orales

Touch S, Aron-Wisnewsky J, Assman K, Fradet M, Gestin A, Mosbah H, Helft G, Poitou C, Clément K, André S and MetaCardis Consortium. Glucose homeostasis: a major contributor to

MAIT cell decrease in cardiometabolic diseases? *4<sup>th</sup> MetaCardis Consortium Meeting*, October 27-28 2016, Gothenburg, Sweden.

Touch S, Aron-Wisnewsky J, Assman K, Fradet M, Gestin A, Mosbah H, Poitou C, Clément K, André S and MetaCardis Consortium. Obesity: a major contributor to MAIT cell decrease in cardiometabolic diseases? *Institute of Cardiometabolism And Nutrition (ICAN) Scientific Day*, June 30, 2016, Paris, France.

Touch S, Poitou C, Fradet M, Genser L, Gestin A, Aron-Wisnewsky J, Brot-Laroche E, Guerre-Millo M, Clément K, André S. Functional interactions between systemic and intestinal immunity in human obesity. *3rd MetaCardis Consortium Meeting*, October 20-21, 2015, Zagreb, Croatia.

Touch S, Gestin A, Fradet M, Genser L, Aron-Wisnewsky J, Poitou C, Brot-Laroche E, Clément K, Guerre-Millo M, André S. Interactions between intestinal immunity and gut microbiota in human obesity. *16èmes journées de l'Ecole Doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique*, May 6-7, 2015, Paris, France.

Touch S, Sá C, Garbin K, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, Genser L, Leturque A, Clément K, Brot-Laroche E, André S. IL-17 and IL-22 production by intestinal T cells in human obesity: potential role in the loss of enterocyte insulin sensitivity. *31st scientific meeting of the French Association of Study and Research on Obesity (AFERO)*, January 15-16, 2015, Nantes, France.

Touch S, Sá C, Garbin K, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, Genser L, Leturque A, Clément K, Brot-Laroche E, André S. IL-17 and IL-22 production by intestinal T cells in human obesity: potential role in the loss of enterocyte insulin sensitivity. *Annual Meeting of the French Society for Immunology (SFI)*, November 4-6, 2014, Lille, France.

Touch S, Sá C, Garbin K, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, Genser L, Leturque A, Clément K, Brot-Laroche E, André S. Intestinal IL-17 and IL-22 production by T cells in obesity: potential implication in the alteration of enterocyte insulin sensitivity. *Institute of Cardiometabolism And Nutrition (ICAN) Scientific Day*, September 22, 2014, Paris, France.

Touch S, Monteiro-Sepulveda M, André S, Sa C, Poitou C, Cotillard A, Remark R, Genser L, Leturque A, Sautès-Fridman C, Clément K, Brot-Laroche E. Perturbed innate and adaptive immunity in human obese intestine: impact on intestinal insulin sensitivity. *Annual Meeting of the French Society for Immunology (SFI)*, November 4-7, 2013, Paris, France.

## **Communications affichées**

Touch S, Aron-Wisnewsky J, Assman K, Fradet M, Gestin A, Mosbah H, Helft G, Poitou C, Clément K, André S and MetaCardis Consortium. Rôle de l'équilibre glycémique dans la perte des cellules MAIT dans les maladies cardiométaboliques. **33th scientific meeting of the French Association of Study and Research on Obesity (AFERO)**, January 18-19, 2017, Toulouse, France.

Touch S, Aron-Wisnewsky J, Assman K, Fradet M, Gestin A, Mosbah H, Helft G, Poitou C, Clément K, André S and MetaCardis Consortium. Glucose homeostasis: a major contributor to MAIT cell decrease in cardiometabolic diseases? **4<sup>th</sup> ICAN Conference Series on Precision Medicine in CMDs**, December 8-10 2016, Paris, France.

Touch S, Poitou C, Fradet M, Genser L, Gestin A, Mosbah H, Aron-Wisnewsky J, Brot-Laroche E, Guerre-Millo M, Clément K, André S. Functional interactions between systemic and intestinal immunity in human obesity. **17<sup>èmes</sup> journées de l'Ecole Doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique**, May 25-26, 2016, Paris, France.

Touch S, Poitou C, Fradet M, Genser L, Gestin A, Mosbah H, Aron-Wisnewsky J, Brot-Laroche E, Guerre-Millo M, Clément K, André S. Functional interactions between systemic and intestinal immunity in human obesity. **32nd scientific meeting of the French Association of Study and Research on Obesity (AFERO)**, January 14-15, 2016, Paris, France.

Touch S, Poitou C, Fradet M, Genser L, Gestin A, Mosbah H, Aron-Wisnewsky J, Brot-Laroche E, Guerre-Millo M, Clément K, André S. Functional interactions between systemic and intestinal immunity in human obesity. **3rd ICAN Conference Series on OMICS**, December 10-12, 2015, Paris, France.

Touch S, Gestin A, Fradet M, Genser L, Aron-Wisnewsky J, Poitou C, Brot-Laroche E, Clément K, Guerre-Millo M, André S. Functional interactions between systemic and intestinal immunity in human obesity. **European Congress of Immunology (ECI)**, September 6-9, 2015, Vienna, Austria.

Touch S, Sá C, Garbin K, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, Genser L, Leturque A, Clément K, Brot-Laroche E, André S. Intestinal IL-17 and IL-22 production by T cells in obesity: potential implication in the alteration of enterocyte insulin sensitivity. **Annual meeting of the CMDO/Quebec society of lipidology, nutrition and metabolism (SQLNM)**, February 18-20, 2015, Magog-Orford, Canada.

Touch S, Sá C, Garbin K, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, Genser L, Leturque A, Clément K, Brot-Laroche E, André S. Intestinal IL-17 and IL-22 production by T cells in obesity: potential implication in the alteration of enterocyte insulin sensitivity. *15èmes journées de l'Ecole Doctorale Physiologie et Physiopathologie*, May 22-23, 2014, Paris, France.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L.A.B., Koenders, M.I., Devesa, I., Roelofs, M.F., Radstake, T.R.D.J., Heuvelmans-Jacobs, M., Akira, S., Nicklin, M.J.H., Ribeiro-Dias, F., et al. (2008). Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J. Clin. Invest.* *118*, 205–216.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 131–144.
- Ait-Omar, A., Monteiro-Sepulveda, M., Poitou, C., Le Gall, M., Cotillard, A., Gilet, J., Garbin, K., Houllier, A., Château, D., Lacombe, A., et al. (2011). GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes* *60*, 2598–2607.
- Allison, D.B., Kaprio, J., Korkeila, M., Koskenvuo, M., Neale, M.C., and Hayakawa, K. (1996). The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *20*, 501–506.
- Anandacoomarasamy, A., Fransen, M., and March, L. (2009). Obesity and the musculoskeletal system. *Curr. Opin. Rheumatol.* *21*, 71–77.
- Aron-Wisnewsky, J., and Clément, K. (2016). The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nat. Rev. Nephrol.* *12*, 169–181.
- Aron-Wisnewsky, J., Doré, J., and Clement, K. (2012). The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 590–598.
- Arora, T., and Bäckhed, F. (2016). The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *J. Intern. Med.* *280*, 339–349.
- Association, A.D. (2014). Standards of Medical Care in Diabetes—2014. *Diabetes Care* *37*, S14–S80.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15718–15723.
- Basdevant, A. (2006). L'obésité : origines et conséquences d'une épidémie. *C. R. Biol.* *329*, 562–569.
- Berg, K.E., Ljungcrantz, I., Andersson, L., Bryngelsson, C., Hedblad, B., Fredrikson, G.N., Nilsson, J., and Björkbacka, H. (2012). Elevated CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes predict cardiovascular events. *Circ. Cardiovasc. Genet.* *5*, 122–131.
- Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., et al. (2012). Identification of Adipose Tissue Dendritic Cells Correlated With Obesity-Associated Insulin-Resistance and Inducing Th17 Responses in Mice and Patients. *Diabetes* *61*, 2238–2247.

- Bouchard, C., Tremblay, A., Després, J.-P., Nadeau, A., Lupien, P.J., Thériault, G., Dussault, J., Moorjani, S., Pinault, S., and Fournier, G. (1990). The Response to Long-Term Overfeeding in Identical Twins. *N. Engl. J. Med.* 322, 1477–1482.
- Boulangé, C.L., Neves, A.L., Chilloux, J., Nicholson, J.K., and Dumas, M.-E. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* 8, 42.
- Boulenouar, S., Michelet, X., Duquette, D., Alvarez, D., Hogan, A.E., Dold, C., O'Connor, D., Stutte, S., Tavakkoli, A., Winters, D., et al. (2017). Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. *Immunity* 46, 273–286.
- Bradley, D., Magkos, F., and Klein, S. (2012). Effects of Bariatric Surgery on Glucose Homeostasis and Type 2 Diabetes. *Gastroenterology* 143, 897–912.
- Brandtzaeg, P. (2010). Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immunol. Invest.* 39, 303–355.
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., and Russell, M.W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol.* 1, 31–37.
- Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., et al. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 519, 242–246.
- Canello, R., and Clément, K. (2006). Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 113, 1141–1147.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007a). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., and Delzenne, N.M. (2007b). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374–2383.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–1481.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., et al. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103.
- Carolan, E., Tobin, L.M., Mangan, B.A., Corrigan, M., Gaoatswe, G., Byrne, G., Geoghegan, J., Cody, D., O'Connell, J., Winter, D.C., et al. (2015). Altered distribution and increased IL-17 production by mucosal-associated invariant T cells in adult and childhood obesity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 5775–5780.

- Cătană, C.-S., Berindan Neagoe, I., Cozma, V., Magdaş, C., Tăbăran, F., and Dumitraşcu, D.L. (2015). Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *21*, 5823–5830.
- Cavallari, J.F., Denou, E., Foley, K.P., Khan, W.I., and Schertzer, J.D. (2016). Different Th17 immunity in gut, liver, and adipose tissues during obesity: the role of diet, genetics, and microbes. *Gut Microbes* *7*, 82–89.
- Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 735–744.
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., and Rousset, M. (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J. Cell Sci.* *107* ( Pt 1), 213–225.
- Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P.S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 738–749.
- Cheroutre, H., and Madakamutil, L. (2004). Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 290–300.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 445–456.
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., and Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* *148*, 1258–1270.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* *5*, 1219–1226.
- Cornes, J.S. (1965). Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine. *Gut* *6*, 225–229.
- Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., et al. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* *500*, 585–588.
- Cox, L.M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A.V., Leung, J.M., Cho, I., Kim, S.G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., et al. (2014). Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* *158*, 705–721.
- Dalmas, E., Rouault, C., Abdennour, M., Rovere, C., Rizkalla, S., Bar-Hen, A., Nahon, J.-L., Bouillot, J.-L., Guerre-Millo, M., Clément, K., et al. (2011). Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am. J. Clin. Nutr.* *94*, 450–458.
- Dalmas, E., Venteclef, N., Caer, C., Poitou, C., Cremer, I., Aron-Wisnewsky, J., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J., Kaveri, S.V., Clément, K., et al. (2014). T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* *63*, 1966–1977.

- Dao, M.C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E.O., Kayser, B.D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., et al. (2015). Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*.
- Després, J.-P. (2012). Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation* *126*, 1301–1313.
- Devêvre, E.F., Renovato-Martins, M., Clément, K., Sautès-Fridman, C., Cremer, I., and Poitou, C. (2015). Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 3917–3923.
- Dixon, J.B., and O'Brien, P.E. (2006). Obesity and the white blood cell count: changes with sustained weight loss. *Obes. Surg.* *16*, 251–257.
- Donath, M.Y., Böni-Schnetzler, M., Ellingsgaard, H., Halban, P.A., and Ehses, J.A. (2010). Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *21*, 261–267.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 11–22.
- Dubern, B., and Clément, K. (2007). [Genetic aspects of obesity]. *Presse Medicale Paris Fr.* *1983* *36*, 1598–1605.
- Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., Bourlier, V., Decaunes, P., Maumus, M., Chiotasso, P., Sengenès, C., Lafontan, M., Galitzky, J., and Bouloumié, A. (2009). Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 1608–1614.
- Dumoitier, N., Terrier, B., London, J., Lofek, S., and Mouthon, L. (2015). Implication of B lymphocytes in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Autoimmun. Rev.* *14*, 996–1004.
- Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Péguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Le Bourhis, L., Soudais, C., Treiner, E., et al. (2011). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* *117*, 1250–1259.
- Eberl, G., Di Santo, J.P., and Vivier, E. (2015). The brave new world of innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* *16*, 1–5.
- Eckle, S.B.G., Corbett, A.J., Keller, A.N., Chen, Z., Godfrey, D.I., Liu, L., Mak, J.Y.W., Fairlie, D.P., Rossjohn, J., and McCluskey, J. (2015). Recognition of Vitamin B Precursors and Byproducts by Mucosal Associated Invariant T Cells. *J. Biol. Chem.* *290*, 30204–30211.
- Ehses, J.A., Böni-Schnetzler, M., Faulenbach, M., and Donath, M.Y. (2008). Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 340–342.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A.J., and Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *105*, 141–150.

- Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S.H., Lank, E.J., Cheetham, T., and O’Rahilly, S. (2003). Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1085–1095.
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* *15*, 930–939.
- Franciszkiewicz, K., Salou, M., Legoux, F., Zhou, Q., Cui, Y., Bessoles, S., and Lantz, O. (2016). MHC class I-related molecule, MR1, and mucosal-associated invariant T cells. *Immunol. Rev.* *272*, 120–138.
- Frasca, D., Ferracci, F., Diaz, A., Romero, M., Lechner, S., and Blomberg, B.B. (2016). Obesity decreases B cell responses in young and elderly individuals. *Obesity* *24*, 615–625.
- Frühbeck, G. (2015). Bariatric and metabolic surgery: a shift in eligibility and success criteria. *Nat. Rev. Endocrinol.* *11*, 465–477.
- Furet, J.-P., Kong, L.-C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Mariat, D., Corthier, G., Doré, J., Henegar, C., et al. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* *59*, 3049–3057.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446–450.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., et al. (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* *31*, 677–689.
- Garidou, L., Pomié, C., Klopp, P., Waget, A., Charpentier, J., Aloulou, M., Giry, A., Serino, M., Stenman, L., Lahtinen, S., et al. (2015). The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR $\gamma$ t and Controls Metabolic Disease. *Cell Metab.* *22*, 100–112.
- Garland, C.D., Lee, A., and Dickson, M.R. (1982). Segmented filamentous bacteria in the rodent small intestine: Their colonization of growing animals and possible role in host resistance to *Salmonella*. *Microb. Ecol.* *8*, 181–190.
- Gérart, S., Sibénil, S., Martin, E., Lenoir, C., Aguilar, C., Picard, C., Lantz, O., Fischer, A., and Latour, S. (2013). Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood* *121*, 614–623.
- Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and Immunoregulation by  $\gamma\delta$  T Cells. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 25–31.
- Godfrey, D.I., Uldrich, A.P., McCluskey, J., Rossjohn, J., and Moody, D.B. (2015). The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat. Immunol.* *16*, 1114–1123.
- Gold, M.C., Cerri, S., Smyk-Pearson, S., Cansler, M.E., Vogt, T.M., Delepine, J., Winata, E., Swarbrick, G.M., Chua, W.-J., Yu, Y.Y.L., et al. (2010). Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol.* *8*, e1000407.

- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 953–964.
- Goto, Y., and Kiyono, H. (2012). Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol. Rev.* *245*, 147–163.
- Gray, S., and Kim, J.K. (2011). New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM 22*, 394–403.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 415–445.
- Hiejima, E., Kawai, T., Nakase, H., Tsuruyama, T., Morimoto, T., Yasumi, T., Taga, T., Kanegane, H., Hori, M., Ohmori, K., et al. (2015). Reduced Numbers and Proapoptotic Features of Mucosal-associated Invariant T Cells as a Characteristic Finding in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 1529–1540.
- Hinks, T.S.C. (2016). Mucosal-associated invariant T cells in autoimmunity, immune-mediated diseases and airways disease. *Immunology* *148*, 1–12.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 159–169.
- Hooper, L.V., Littman, D.R., and Macpherson, A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* *336*, 1268–1273.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* *444*, 860–867.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* *259*, 87–91.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *95*, 2409–2415.
- Howson, L.J., Salio, M., and Cerundolo, V. (2015). MR1-Restricted Mucosal-Associated Invariant T Cells and Their Activation during Infectious Diseases. *Front. Immunol.* *6*, 303.
- Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J.J., Scott, D.K., and O’Doherty, R.M. (2010). Depletion of Liver Kupffer Cells Prevents the Development of Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Diabetes* *59*, 347–357.
- Ivanov, I.I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* *4*, 337–349.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* *139*, 485–498.
- Jagannathan-Bogdan, M., McDonnell, M.E., Shin, H., Rehman, Q., Hasturk, H., Apovian, C.M., and Nikolajczyk, B.S. (2011). Elevated proinflammatory cytokine production by a

- skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 1162–1172.
- Jetten, A.M. (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* *7*.
- Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 639–649.
- Johnson, A.M.F., Costanzo, A., Gareau, M.G., Armando, A.M., Quehenberger, O., Jameson, J.M., and Olefsky, J.M. (2015). High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS One* *10*, e0122195.
- Kaoutari, A.E., Armougom, F., Raoult, D., and Henrissat, B. (2014). Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *médecine/sciences* *30*, 259–265.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 984–993.
- Kim, J.K. (2012). Endothelial Nuclear Factor  $\kappa$ B in Obesity and Aging. *Circulation* *125*, 1081–1083.
- Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A.J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., et al. (2012). MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* *491*, 717–723.
- van der Klaauw, A.A., and Farooqi, I.S. (2015). The hunger genes: pathways to obesity. *Cell* *161*, 119–132.
- Kolls, J.K., McCray, P.B., and Chan, Y.R. (2008). Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 829–835.
- Kong, L.-C., Tap, J., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Zucker, J.-D., Doré, J., and Clément, K. (2013). Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am. J. Clin. Nutr.* *98*, 16–24.
- Kucharzik, T., Lügering, N., Rautenberg, K., Lügering, A., Schmidt, M.A., Stoll, R., and Domschke, W. (2000). Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *915*, 171–183.
- Kurioka, A., Walker, L.J., Klenerman, P., and Willberg, C.B. (2016). MAIT cells: new guardians of the liver. *Clin. Transl. Immunol.* *5*, e98.
- Landman, C., and Quévrain, E. (2016). [Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]. *Rev. Med. Interne* *37*, 418–423.
- Laurson, K.R., McCann, D.A., and Senchina, D.S. (2011). Age, sex, and ethnicity may modify the influence of obesity on inflammation. *J. Invest. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* *59*, 27–31.
- Laydon, D.J., Bangham, C.R.M., and Asquith, B. (2015). Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *370*.

- Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., et al. (2010). Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 701–708.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* *500*, 541–546.
- Lee, J.S., Tato, C.M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M.F., Gulan, F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Judo, M., Ayanoglu, G., et al. (2015). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* *43*, 727–738.
- Lee, O.-J., Cho, Y.-N., Kee, S.-J., Kim, M.-J., Jin, H.-M., Lee, S.-J., Park, K.-J., Kim, T.-J., Lee, S.-S., Kwon, Y.-S., et al. (2014). Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults. *Exp. Gerontol.* *49*, 47–54.
- Leung, J.M., Davenport, M., Wolff, M.J., Wiens, K.E., Abidi, W.M., Poles, M.A., Cho, I., Ullman, T., Mayer, L., and Loke, P. (2014). IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal Immunol.* *7*, 124–133.
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11070–11075.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* *444*, 1022–1023.
- Liu, Y.-J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275–306.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1701–1711.
- Luck, H., Tsai, S., Chung, J., Clemente-Casares, X., Ghazarian, M., Revelo, X.S., Lei, H., Luk, C.T., Shi, S.Y., Surendra, A., et al. (2015). Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metab.* *21*, 527–542.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* *117*, 175–184.
- Lynch, L., O’Shea, D., Winter, D.C., Geoghegan, J., Doherty, D.G., and O’Farrelly, C. (2009). Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1893–1901.
- Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O’Shea, D., O’Farrelly, C., and Exley, M.A. (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* *37*, 574–587.

- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., and Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* *6*, 666–677.
- Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 478–485.
- Magalhaes, I., Pingris, K., Poitou, C., Bessoles, S., Venteclef, N., Kiaf, B., Beaudoin, L., Da Silva, J., Allatif, O., Rossjohn, J., et al. (2015a). Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J. Clin. Invest.* *125*, 1752–1762.
- Magalhaes, I., Kiaf, B., and Lehuen, A. (2015b). iNKT and MAIT Cell Alterations in Diabetes. *Front. Immunol.* *6*, 341.
- Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Laude, H., Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I.C., Tilloy, F., et al. (2009). Stepwise Development of MAIT Cells in Mouse and Human. *PLOS Biol.* *7*, e1000054.
- Mathis, D. (2013). Immunological Goings-on in Visceral Adipose Tissue. *Cell Metab.* *17*, 851–859.
- Mathis, D., and Shoelson, S.E. (2011). Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 81.
- Maxwell, J.R., Zhang, Y., Brown, W.A., Smith, C.L., Byrne, F.R., Fiorino, M., Stevens, E., Bigler, J., Davis, J.A., Rottman, J.B., et al. (2015). Differential Roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in Intestinal Immunoregulation. *Immunity* *43*, 739–750.
- McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* *483*, 345–349.
- McWilliam, H.E., Birkinshaw, R.W., Villadangos, J.A., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2015). MR1 presentation of vitamin B-based metabolite ligands. *Curr. Opin. Immunol.* *34*, 28–34.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* *454*, 428–435.
- Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity* *40*, 642–656.
- Mingrone, G., Panunzi, S., De Gaetano, A., Guidone, C., Iaconelli, A., Leccesi, L., Nanni, G., Pomp, A., Castagneto, M., Ghirlanda, G., et al. (2012). Bariatric Surgery versus Conventional Medical Therapy for Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* *366*, 1577–1585.
- Monteiro-Sepulveda, M., Touch, S., Mendes-Sá, C., André, S., Poitou, C., Allatif, O., Cotillard, A., Fohrer-Ting, H., Hubert, E.-L., Remark, R., et al. (2015). Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab.* *22*, 113–124.
- Morgan, O.W., Bramley, A., Fowlkes, A., Freedman, D.S., Taylor, T.H., Gargiullo, P., Belay, B., Jain, S., Cox, C., Kamimoto, L., et al. (2010). Morbid Obesity as a Risk Factor for

- Hospitalization and Death Due to 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Disease. *PLOS ONE* 5, e9694.
- Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L., and Reddi, A.H. (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 155–174.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341.
- Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667–685.
- Mutch, D.M., and Clément, K. (2006). Unraveling the Genetics of Human Obesity. *PLOS Genet.* 2, e188.
- Napier, R.J., Adams, E.J., Gold, M.C., and Lewinsohn, D.M. (2015). The Role of Mucosal Associated Invariant T Cells in Antimicrobial Immunity. *Front. Immunol.* 6, 344.
- Nguyen, M.T.A., Faveyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 35279–35292.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K., and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 123–132.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 15, 914–920.
- Novak, J., Dobrovolny, J., Novakova, L., and Kozak, T. (2014). The decrease in number and change in phenotype of mucosal-associated invariant T cells in the elderly and differences in men and women of reproductive age. *Scand. J. Immunol.* 80, 271–275.
- Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246.
- O'Neill, S., and O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes. Rev.* 16, 1–12.
- O'Neill, L.A.J., Kishton, R.J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 553–565.
- Paich, H.A., Sheridan, P.A., Handy, J., Karlsson, E.A., Schultz-Cherry, S., Hudgens, M.G., Noah, T.L., Weir, S.S., and Beck, M.A. (2013). Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 influenza A virus. *Obes. Silver Spring Md* 21, 2377–2386.
- Palmer, C.S., Ostrowski, M., Balderson, B., Christian, N., and Crowe, S.M. (2015). Glucose Metabolism Regulates T Cell Activation, Differentiation, and Functions. *Front. Immunol.* 6.

- van de Pavert, S.A., and Mebius, R.E. (2010). New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 664–674.
- Pecht, T., Gutman-Tirosh, A., Bashan, N., and Rudich, A. (2014). Peripheral blood leucocyte subclasses as potential biomarkers of adipose tissue inflammation and obesity subphenotypes in humans. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *15*, 322–337.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 141–153.
- Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L., and Gordon, J.I. (2007). IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* *2*, 328–339.
- Poitou, C., Viguerie, N., Canello, R., De Matteis, R., Cinti, S., Stich, V., Coussieu, C., Gauthier, E., Courtine, M., Zucker, J.D., et al. (2005). Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia* *48*, 519–528.
- Poitou, C., Dalmas, E., Renovato, M., Benhamo, V., Hajduch, F., Abdenmour, M., Kahn, J.-F., Veyrie, N., Rizkalla, S., Fridman, W.-H., et al. (2011). CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 2322–2330.
- Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., et al. (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E1003-1012.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* *490*, 55–60.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* *2*, 361–367.
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., et al. (2013). Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* *341*, 1241214.
- Robker, R.L., Collins, R.G., Beaudet, A.L., Mersmann, H.J., and Smith, C.W. (2004). Leukocyte migration in adipose tissue of mice null for ICAM-1 and Mac-1 adhesion receptors. *Obes. Res.* *12*, 936–940.
- Rogacev, K.S., Cremers, B., Zawada, A.M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Große-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., et al. (2012). CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 1512–1520.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., et al. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1693–1700.

- Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Bergé, M., Cenac, C., Waget, A., Klopp, P., Iacovoni, J., Klopp, C., et al. (2012). Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* 61, 543–553.
- Serriari, N.-E., Eoche, M., Lamotte, L., Lion, J., Fumery, M., Marcelo, P., Chatelain, D., Barre, A., Nguyen-Khac, E., Lantz, O., et al. (2014). Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 176, 266–274.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–1837.
- Sjöström, L., Peltonen, M., Jacobson, P., Sjöström, C.D., Karason, K., Wedel, H., Ahlin, S., Anveden, Å., Bengtsson, C., Bergmark, G., et al. (2012). Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA* 307, 56–65.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341, 569–573.
- Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* 12, 383–390.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142–1162.
- Stepankova, R., Powrie, F., Kofronova, O., Kozakova, H., Hudcovic, T., Hrnčir, T., Uhlig, H., Read, S., Rehakova, Z., Benada, O., et al. (2007). Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 1202–1211.
- Stunkard, A.J., Foch, T.T., and Hrubec, Z. (1986a). A twin study of human obesity. *JAMA* 256, 51–54.
- Stunkard, A.J., Sørensen, T.I., Hanis, C., Teasdale, T.W., Chakraborty, R., Schull, W.J., and Schulsinger, F. (1986b). An adoption study of human obesity. *N. Engl. J. Med.* 314, 193–198.
- Stunkard, A.J., Harris, J.R., Pedersen, N.L., and McClearn, G.E. (1990). The Body-Mass Index of Twins Who Have Been Reared Apart. *N. Engl. J. Med.* 322, 1483–1487.
- Sugimoto, C., Fujita, H., and Wakao, H. (2016). Mucosal-associated invariant T cells from induced pluripotent stem cells: A novel approach for modeling human diseases. *World J. Stem Cells* 8, 158–169.
- Tang, X.-Z., Jo, J., Tan, A.T., Sandalova, E., Chia, A., Tan, K.C., Lee, K.H., Gehring, A.J., De Libero, G., and Bertolotti, A. (2013). IL-7 licenses activation of human liver intrasinusoidal mucosal-associated invariant T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 3142–3152.

- Tard, C., Rouxel, O., and Lehuen, A. (2015). Regulatory role of natural killer T cells in diabetes. *Biomed. J.* 38, 484–495.
- Tilloy, F., Treiner, E., Park, S.-H., Garcia, C., Lemonnier, F., Salle, H. de la, Bendelac, A., Bonneville, M., and Lantz, O. (1999). An Invariant T Cell Receptor  $\alpha$  Chain Defines a Novel TAP-independent Major Histocompatibility Complex Class Ib–restricted  $\alpha/\beta$  T Cell Subpopulation in Mammals. *J. Exp. Med.* 189, 1907–1921.
- Tobin, V., Le Gall, M., Fioramonti, X., Stolarczyk, E., Blazquez, A.G., Klein, C., Prigent, M., Serradas, P., Cuif, M.-H., Magnan, C., et al. (2008). Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 57, 555–562.
- Treiner, E. (2015). Mucosal-associated invariant T cells in inflammatory bowel diseases: bystanders, defenders, or offenders? *Front. Immunol.* 6, 27.
- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., and Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422, 164–169.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1131.
- Vague, J. (1947). [Not Available]. *Presse Med.* 55, 339.
- Vaughan, A.T., Roghanian, A., and Cragg, M.S. (2011). B cells—Masters of the immunoverse. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 280–285.
- Vogt, M.C., and Brüning, J.C. (2013). CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism – from embryo to old age. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 76–84.
- Waterhouse, D.F., Cahill, R.A., Sheehan, F., and McCreery, C. (2008). Prediction of calculated future cardiovascular disease by monocyte count in an asymptomatic population. *Vasc. Health Risk Manag.* 4, 177–187.
- van der Weerd, K., Dik, W.A., Schrijver, B., Schweitzer, D.H., Langerak, A.W., Drexhage, H.A., Kiewiet, R.M., van Aken, M.O., van Huisstede, A., van Dongen, J.J.M., et al. (2012). Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* 61, 401–408.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808.
- Wentworth, J.M., Naselli, G., Brown, W.A., Doyle, L., Phipson, B., Smyth, G.K., Wabitsch, M., O’Brien, P.E., and Harrison, L.C. (2010). Pro-inflammatory CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 59, 1648–1656.
- Winer, D.A., Luck, H., Tsai, S., and Winer, S. (2016). The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab.* 23, 413–426.

- Winer, D.A., Winer, S., Dranse, H.J., and Lam, T.K.T. (2017). Immunologic impact of the intestine in metabolic disease. *J. Clin. Invest.* *127*, 33–42.
- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., et al. (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.* *15*, 921–929.
- Wu, H., Perrard, X.D., Wang, Q., Perrard, J.L., Polsani, V.R., Jones, P.H., Smith, C.W., and Ballantyne, C.M. (2010). CD11c expression in adipose tissue and blood and its role in diet-induced obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 186–192.
- Wu, W., Sun, M., Chen, F., Cao, A.T., Liu, H., Zhao, Y., Huang, X., Xiao, Y., Yao, S., Zhao, Q., et al. (2016). Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunol.*
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *112*, 1821–1830.
- Yang, D., Yang, W., Tian, Z., van Velkinburgh, J.C., Song, J., Wu, Y., and Ni, B. (2016). Innate lymphoid cells as novel regulators of obesity and its-associated metabolic dysfunction. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *17*, 485–498.
- Zeng, C., Shi, X., Zhang, B., Liu, H., Zhang, L., Ding, W., and Zhao, Y. (2012). The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *90*, 175–186.
- Zhao, R., Tang, D., Yi, S., Li, W., Wu, C., Lu, Y., Hou, X., Song, J., Lin, P., Chen, L., et al. (2014). Elevated peripheral frequencies of Th22 cells: a novel potent participant in obesity and type 2 diabetes. *PloS One* *9*, e85770.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., et al. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* *14*, 282–289.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74–e80.

## **Cellules immunitaires dans les maladies cardiométaboliques : altérations phénotypiques et fonctionnelles**

L'inflammation de bas grade est un trait commun aux maladies cardiométaboliques (CMDs). Dans l'obésité et le diabète de type-2 (DT2) en particulier, l'insulino-résistance a été associée à une inflammation dans plusieurs tissus. L'objectif de ce travail est d'évaluer les interactions entre les altérations des cellules immunitaires et les perturbations du métabolisme dans les CMDs.

Dans une première étude, nous avons étudié l'immunité intestinale et la production cytokinique des lymphocytes T (LT) jéjunaux de sujets minces et obèses et évalué la relation fonctionnelle entre LT et entérocytes. Nous montrons que la densité des LT est augmentée dans la muqueuse dans l'obésité et que l'augmentation de la production de cytokines par les LT de sujets obèses induit une résistance à l'insuline sur les entérocytes *in vitro*.

Dans une deuxième étude, nous avons caractérisé les cellules MAIT (mucosal-associated invariant T cells), une sous-population de LT qui reconnaît des métabolites bactériens dérivés de la vitamine B, dans le sang de 5 groupes de patients présentant différentes CMDs par rapport à des sujets contrôles. Dans tous les groupes de patients, nous observons une diminution des cellules MAIT circulantes qui est corrélée avec l'HbA1c. Nous montrons *ex vivo* que cette diminution pourrait être liée à une plus forte apoptose provoquée par une glucotoxicité.

Nos résultats indiquent que l'environnement immunitaire intestinal pourrait participer aux perturbations métaboliques locales et systémiques dans l'obésité humaine. De plus, l'abondance de certaines cellules immunitaires, comme les MAIT, pourrait servir de marqueur précoce de la dysfonction cardiométabolique.

**Mots clés :** inflammation ; obésité ; maladies cardiométaboliques ; lymphocytes T ; cellules MAIT ; intestin grêle ; insulino-résistance

### **Immune cells in cardiometabolic diseases: phenotypic and functional alterations**

A common feature between cardiometabolic diseases (CMDs) is a state of chronic low-grade inflammation. In obesity and type-2-diabetes (T2D) notably, insulin resistance has been linked to inflammation in several tissues. The objective of this project is to evaluate the interactions between immune cell alterations and metabolic perturbations in CMDs.

In a first study, we investigated intestinal immunity and cytokine production of intestinal T cells in a cohort of lean and obese subjects and evaluated the functional relationship between T cells and enterocytes. We demonstrated that T cell density and cytokine production was increased in the jejunal mucosa of obese subjects and promoted insulin resistance in enterocytes *in vitro*.

In a second study, we characterized mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, a subset of T cells recognizing bacterial vitamin B derivatives, in 5 groups of patients with different forms CMDs (metabolic syndrome, obesity, T2D, coronary artery disease with or without heart failure) compared to healthy subjects. We demonstrated that MAIT cell decrease is correlated with HbA1c and is a common feature in all CMD groups. In an *ex vivo* study, we show that their depletion in the blood could be explained by a higher propensity to apoptosis under high glucose concentrations.

Altogether, our findings suggest that the jejunal immune microenvironment could participate in local and systemic metabolic perturbations in human obesity. We also demonstrate that the abundance immune cells, such as circulating MAIT cells could serve as an early marker of cardiometabolic dysfunction.

**Keywords:** inflammation; obesity; cardiometabolic diseases; T lymphocytes; MAIT cells; small intestine; insulin resistance