



HAL
open science

Etude du rôle des monocytes dans la pathogénèse du diabète et de ses complications

Jean-Baptiste Julla

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Julla. Etude du rôle des monocytes dans la pathogénèse du diabète et de ses complications. Endocrinologie et métabolisme. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS236 . tel-03787895

HAL Id: tel-03787895

<https://theses.hal.science/tel-03787895>

Submitted on 26 Sep 2022

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.

École doctorale ED 394 - Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

*Laboratoire Centre de Recherche des Cordeliers – Inserm U1138 – Equipe 23
IMMEDIAB*

Etude du rôle des monocytes dans la pathogénèse du diabète et de ses complications

Par Jean-Baptiste Julla

Thèse de doctorat de Sciences

Dirigée par Jean-François Gautier

Présentée et soutenue publiquement le 22/09/2021

Devant un jury composé de :

Bruno Fève, PU-PH, INSERM UMR S938, Président du Jury

Jean-François Gautier, PU-PH, INSERM UMR S1138, Directeur de thèse

Pierre Gourdy, PU-PH, INSERM UMR 1048, Rapporteur

Wilfried Le Goff, Directeur de Recherche, INSERM UMR S1166, Examineur

Roberto Mallone, PU-PH, INSERM UMR S8104, Rapporteur

David Masson, PU-PH, INSERM UMR1231, Examineur

Aux membres du Jury, qui ont eu la gentillesse de m'accorder leur temps, si précieux,

À l'équipe Venteclef, dont j'ai vu le début et dont je suis si fier d'être membre depuis 5 ans

- À Nicolas, dont la bienveillance et l'exigence font avancer l'équipe et ses individualités
- À Raphaëlle, amie et binôme pendant 3 ans, dont le travail immense n'a pas pu être valorisé dans ce manuscrit ;
- À Fawaz qui a mis au point ce formidable outil qu'est l'immunophénotypage
- À Marc dont les analyses de dernières minutes ont grandement amélioré mes résultats
- À ceux, jeunes ou moins jeunes, qui me font regretter de ne pas être beaucoup venu sur site cette dernière année : Tina, Lucie, Diane, Elise, Amélie, Elena, Dina, Charline, Pauline, Akila, Joy, Claire, Ronan, Ronan, Louis, Frédéric et Gilberto
- À ceux qui sont partis mais que je n'oublie pas : Kari, Mano, Catherine, Andreia, Anouar, Maria, Abdoul

Au service de diabétologie de l'hôpital Lariboisière, qui m'a accepté à mi-temps, et dont je me sens privilégié de faire partie

- À Jean-François, qui croit en moi depuis mon passage dans le service en 2013
- À Jean-Pierre, un appui sur lequel je sais que je peux compter
- À Marie et Tiphaine, pour avoir partagé toutes ces boîtes de chocolat,
- À Diane et Lucas, plus amis que co-chefs, qui ne m'ont jamais reproché mes absences
- À Clara, Florine, Karima, Clémence, Asma, Vanessa et JPK
- À toute l'équipe paramédicale, infirmières, aides-soignantes, secrétaires, diétistes, qui font de ce service un endroit où j'aime travailler

Enfin, À tous ceux qui me permettent de faire tomber la pression et de me changer les idées

- À mes amis, dont je me rends compte avec bonheur qu'ils seraient trop nombreux à énumérer.
- À ma famille, qui espère que cette 16^{ème} inscription consécutive à la FAC est la dernière, mais qui me soutiendrait si j'allais jusqu'à 50.
- À Caro, Anna et Tim, sans qui rien n'aurait de sens

Parce que cette thèse est aussi un peu la vôtre, et que je n'y serai jamais arrivé sans vous,

Je voudrais, du fond du cœur, vous dire

MERCI

Sommaire

I. INTRODUCTION

1. L'inflammation perturbe la sécrétion et la signalisation de l'insuline

A. Insulino-résistance et inflammation

- a) Macrophages
- b) Lipotoxicité

B. Insulinosécrétion et inflammation

C. Les monocytes

- a) Origine des monocytes et déterminants de leurs taux plasmatiques
- b) Description des sous-types et de leurs fonctions
- c) Variations des pourcentages des différents sous-types de monocytes en fonction de différentes situations

D. Pré diabète et diabète gestationnel

2. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique.

A. Physiopathologie de l'athérosclérose

B. Evaluation de l'athérosclérose

C. Association entre les différents sous-types de monocytes et le risque cardiovasculaire dans la population générale.

3. En pratique clinique générale, l'évaluation de l'inflammation repose sur la quantification des globules blanc plasmatiques, de la CRP(us) et du fibrinogène

4. L'étude de l'inflammation en recherche fondamentale

5. Hypothèse et Objectifs

II. RESULTATS

Chapitre 1 : Etude des monocytes dans une population de patients avec diabète de type 2

1. Introduction

2. Objectif

3. Méthodes

- A. Cohorte Angiosafe2
- B. Immunophénotypage
- C. Analyses statistiques
- D. Analyse transcriptomique

4. Résultats

- A. Description de la population totale
- B. Evaluation des facteurs cliniques et biologiques associés au taux de monocytes dans une population diabétique de type 2 non sélectionnée.
- C. Evaluation du risque cardiovasculaire dans cette même population, et son association avec les données monocytaires
- D. Description de la sous-population utilisée pour l'analyse transcriptomique
- E. Résultats de l'analyse transcriptomique

5. Discussion

Chapitre 2 : Etude des monocytes dans le modèle du diabète post-gestationnel – Etude Epitherapie

1. Introduction

2. Objectif

3. Méthodes

- A. Recrutement des sujets
- B. Immunophénotypage
- C. Biologie moléculaire
- D. Analyse lipidomique

4. Résultats

- A. Immunophénotypage
- B. Biologie moléculaire
- C. Analyse lipidomique

5. Discussion

Chapitre 3 : Etude de l'influence de l'inflammation dans les formes sévères d'infection à COVID-19 - PUBLICATION

III. CONCLUSION

IV. BIBLIOGRAPHIE

V. ANNEXES

VI. RESUME

INTRODUCTION

Les dernières estimations de la prévalence mondiale du diabète par l'Organisation Mondiale de la Santé font état de 424 million d'adultes diabétiques dans le monde, représentant 8,8% de la population adulte. Ce chiffre déjà conséquent est en constante augmentation et pourrait atteindre les 10% d'ici 2045. Les conséquences individuelles et sociétales de cette pandémie métabolique font de la compréhension et de la prise en charge de cette pathologie une urgence sanitaire.

La définition actuelle d'un diabète ne repose que sur l'existence d'une hyperglycémie chronique, avec un seuil diagnostique correspondant à l'émergence, pour le patient, d'un risque de complication.

Si les premières descriptions de cette maladie datent de l'Égypte ancienne (entre le xv^e siècle et le xvi^e siècle avant notre ère), et son nom « Diabète » du Grec ancien *diabaïno*, qui signifie « traverser » (II^e-III^e siècle avant notre ère), la compréhension de sa physiopathologie (et donc la possibilité de traitement) est beaucoup plus récente, et reste incomplète.

Il faut d'ailleurs parler de physiopathologies au pluriel, puisqu'il existe plusieurs types de diabète, définis en fonction des anomalies responsables de leur genèse. Les deux voies métaboliques dont la dérégulation est susceptible d'engendrer une hyperglycémie chronique sont l'insulinosécrétion par les cellules bêta-pancréatiques et l'insulino-sensibilité des tissus métaboliques périphériques (principalement le tissu adipeux blanc, le foie et les muscles).

Classiquement, on sépare le diabète de type 1 auto-immun, les diabètes monogéniques, les diabètes secondaires à des traitements ou à des pathologies du pancréas, et le diabète de type 2 qui est un diagnostic d'élimination, une fois toutes les étiologies précitées éliminées.

Néanmoins, La pratique clinique nous montre depuis longtemps que les patients classés diabétiques de type 2 sont hétérogènes en termes d'âge de début du diabète, d'indice de masse corporelle, de réponse au traitement et de susceptibilité à développer des complications.

De plus en plus d'études tentent de subdiviser ce fourre-tout en plusieurs groupes plus homogènes. Ahlqvist et al (1) proposent ainsi, en plus du groupe de diabète auto-immun, 4 groupes caractérisés par leurs degrés d'insulinopénie, d'insulinorésistance, et d'âge de début. Ces nouvelles classifications pourraient permettre d'aller vers un traitement plus personnalisé et donc plus efficace.

Nous rappellerons dans cette introduction que l'insulino-sensibilité comme l'insulino-sécrétion peuvent être affectées par un état inflammatoire chronique de bas grade. Cela soulève l'hypothèse que certains types de diabètes puissent être liés à cette inflammation, tandis que d'autres seraient liés à des processus physiopathologiques autres. Nous verrons ensuite pourquoi les monocytes sont des acteurs majeurs de cette inflammation. Puis nous présenterons les cas particuliers du diabète gestationnel et de l'athérosclérose, et le rationnel de les utiliser comme modèles dans nos recherches. Enfin nous exposerons les moyens habituels d'évaluer l'inflammation en pratique clinique et en recherche fondamentale.

1. L'inflammation perturbe la sécrétion et la signalisation de l'insuline

A. Insulino-résistance et inflammation

La résistance à l'insuline est un état caractérisé par une réponse réduite des cellules cibles de l'insuline, telles que les myocytes et les adipocytes, à la liaison de l'insuline à son récepteur. L'effet principal de l'insuline dans ces tissus cibles est de stimuler l'absorption du glucose dans la phase postprandiale et d'inhiber la lipolyse dans les adipocytes. Dans les hépatocytes, les fonctions principales de l'insuline sont d'inhiber la néoglucogenèse et de stimuler la lipogenèse de novo. Tout degré de résistance à l'insuline doit être compensé par une augmentation de la production d'insuline par la cellule beta pancréatique afin de prévenir l'hyperglycémie. (2)

a) Les macrophages

Les analyses comparatives des tissus adipeux viscéraux de patients minces, obèses sains et obèses diabétiques ont permis de mettre en évidence des différences d'états inflammatoires de ces tissus, notamment de polarisation des macrophages, indiquant que l'inflammation pourrait être associée au développement des désordres métaboliques (**Figure 1**) (3-5).

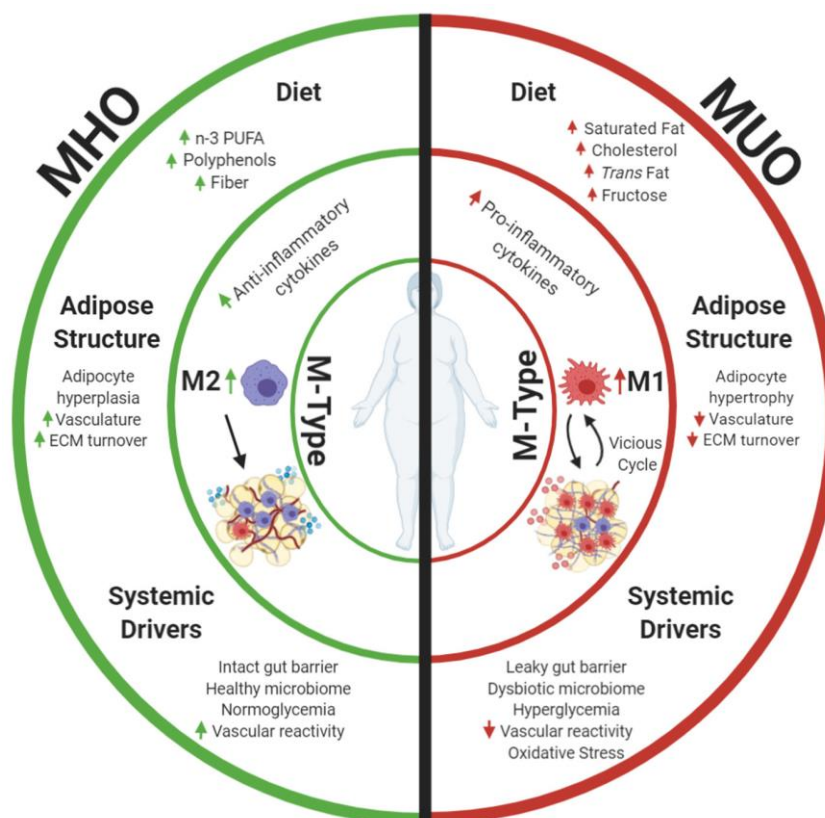


Figure 1 : Différences des tissus adipeux blancs des patients obèses métaboliquement sains (MHO) et diabétiques (MUO), notamment en terme de phénotypes macrophagiques. Tiré de « Ruggiero et al. *Front Nutr* 2021 »

Les macrophages sont des cellules tissulaires phagocytaires mononuclées dont l'objectif global est le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ils fonctionnent en piégeant les débris, les agents pathogènes et les cellules apoptotiques ou nécrotiques.

Il existe toute une gamme de polarisation des macrophages, allant des plus pro-inflammatoires « M1 » au plus anti-inflammatoires « M2 » (**Figure 2**) (4).

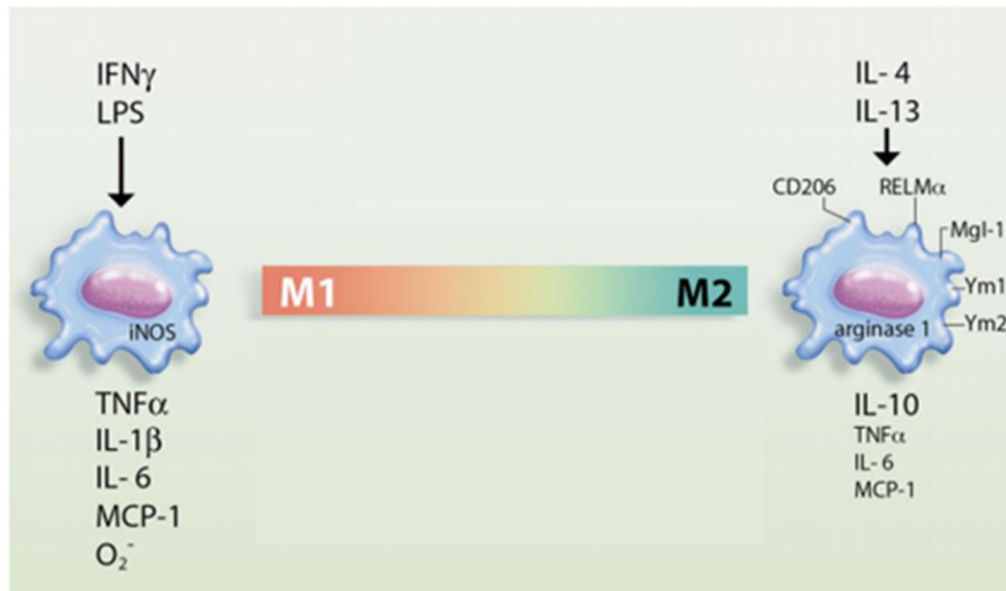


Figure 2 : Représentation simplifiée des deux phénotypes macrophagiques extrêmes. Modifiée de « Russo et al. Immunology 2018 »

A l'état basal physiologique, les macrophages du tissu adipeux blanc viscéral tendent vers un phénotype M2, sécrétant de médiateurs inflammatoires tels que l'Interleukine-10 et l'arginase I. Les macrophages M2 ont aussi la capacité de réguler l'adipogénèse et l'angiogénèse en réponse à des stimuli environnementaux (6–7), notamment via la sécrétion de PDGF, un facteur de croissance qui promeut la survie des pré-adipocytes et permet donc une expansion par hyperplasie du tissu adipeux.

Dans les modèles animaux, le défaut de polarisation M2 était d'ailleurs associé à une tendance des animaux à l'insulino-résistance et à l'intolérance au glucose (8), témoignant du lien entre ces cellules de l'inflammation innée et le métabolisme glucidique. C'est ce phénotype qui est majoritairement observé chez les patients minces ou obèses métaboliquement sains. Les macrophages M1 ne sécrétant pas de PDGF1, l'expansion du tissu adipeux dans cette situation va se faire sur le modèle hypertrophique (augmentation de la taille des adipocytes).

Les adipocytes hypertrophiés, potentiellement dysfonctionnels, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , MCP-1) responsables du recrutement de nouveaux macrophages et de leurs polarisations vers un phénotype M1, entraînant une boucle pro-inflammatoire auto-amplificatrice (9-10).

Ces cytokines pro-inflammatoires d'origine double, adipocytaire et macrophagique, peuvent directement entraîner une diminution du stockage des triglycérides et augmenter la lipolyse via la diminution de la transcription de PPAR- γ . Ils sont surtout responsables, via la liaison à

leurs récepteurs, de l'induction de voies de signalisation intracellulaires aboutissant à l'activation de l'Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B (IKK- β) et de la c-Jun N-terminal Kinase (JNK) (11-13). Ces deux kinases vont jouer un double rôle : à la fois pro-inflammatoire et pro-insulino-résistance.

Les voies IKK- β et JNK participent ainsi à l'auto-entretien d'un état inflammatoire chronique au niveau du tissu adipeux via notamment l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires : Nuclear Factor Kappa-B (NF κ B) et Activator Protein 1 (AP-1) respectivement (14). De plus, une fois activé, JNK a la capacité d'augmenter la phosphorylation Ser/Thr des IRS 1 et 2, entraînant de facto la diminution de leur phosphorylation Tyrosine en réponse à l'activation du récepteur de l'insuline, et donc favorisant l'insulino-résistance (15) (**Figure 3**)

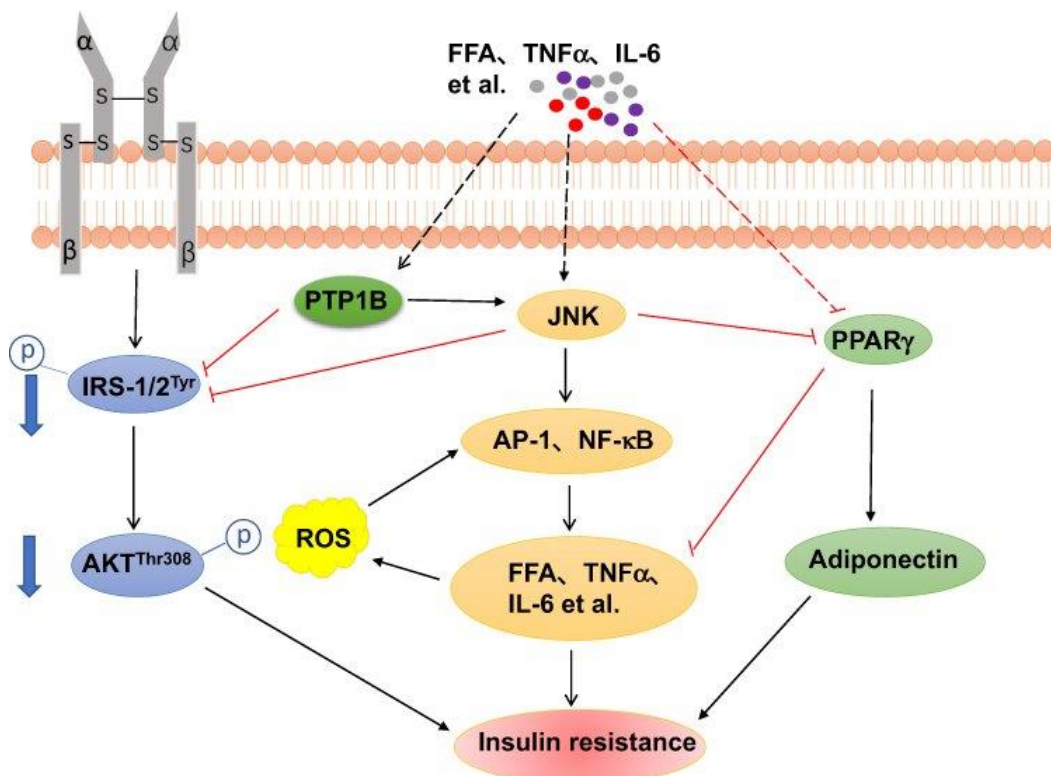


Figure 3 : Représentation schématique du rôle des Acides gras libres (FFA) et des cytokines inflammatoires dans l'établissement de l'insulino-résistance, via l'activation de la voie JNK. Tiré de « Wilcox et al. *Clin Biochem Rev* 2005 »

Au niveau des tissus adipeux, le rôle physiologique de l'insuline est de freiner la lipolyse via la phosphorylation inactivatrice par AKT de PDE3B, impliquée dans la voie de l'AMPc (16); la résistance à l'insuline va donc notamment entraîner une lipolyse incontrôlée, responsable d'une libération systémique d'acide gras libres et de glycérol.

L'insulino-résistance du tissu adipeux blanc viscéral passe donc par l'installation d'une inflammation de bas grade chronique médiée par les macrophages ; et ces deux phénomènes (insulino-résistance et inflammation) s'associent pour augmenter la lipolyse et entraîner une augmentation des taux d'acides gras libres plasmatiques. Ces lipides vont avoir un rôle dans l'établissement de l'insulino-résistance au niveau musculaire et hépatique, via un mécanisme moléculaire appelé lipotoxicité, qui lui-même implique les macrophages de ces tissus.

b) La lipotoxicité

L'effet délétère sur le métabolisme glucidique de l'augmentation des taux de lipides circulants et intracellulaires est appelé « lipotoxicité » (17-18). Ainsi l'élévation des AGNE (Acides Gras Non Essentiels) circulants et l'accumulation de lipides dans les myocytes et les hépatocytes sont corrélées avec le développement d'une insulino-résistance (19-22). Le type de lipides ectopiques, plus que leur quantité, est important pour le développement de l'insulino-résistance. Les acides gras libres, notamment issus de la lipolyse du tissu adipeux, peuvent être classés en Acides Gras Saturés, Mono-Insaturés ou Poly-Insaturés. Les Acides Gras Saturés (AGS) sont ceux qui sont le plus liés à l'obésité, l'insulino-résistance et l'athérosclérose (23-24).

Les acides gras libres saturés à longue chaîne, tels le palmitate (PA, C16 :0), sont capables d'activer directement la voie TLR4 dans les macrophages et les adipocytes.

Dans le tissu adipeux, ils participent donc à la boucle auto-amplificatrice inflammatoire locale puisque cette activation de la voie des TLR4 permet d'une part l'activation d'IKK- β et donc de NF κ B, et d'autre part celle de MKK4 et donc de JNK. Comme lorsqu'elle est activée par les cytokines pro-inflammatoires, l'activation lipido-médiée de la voie JNK entraîne l'augmentation de la phosphorylation Ser/Thr des IRS 1 et 2 et donc favorise l'insulino-résistance.

Dans le muscle, alors que les macrophages résidents ont au niveau basal un phénotype plutôt M2, la liaison d'AGS à leurs récepteurs TLR4 va favoriser le changement vers un phénotype plutôt M1 et donc pro-inflammatoire (25-28). Cette activation va entraîner une augmentation de la sécrétion de CCL2, et donc le recrutement de nouveaux macrophages via l'infiltration monocyttaire (29). Il existe en parallèle une augmentation de la sécrétion de TNF- α , IL-1 β et IL-6, activant dans les myocytes les voies NF κ B et JNK, y entraînant une insulino-résistance (30-33).

Dans le foie, les AGL proviennent de 3 sources distinctes potentielles : de l'alimentation, de la lipolyse du tissu adipeux et de la lipogenèse de novo intra-hépatique à partir de carbohydrates (34). Dans le diabète de type 2, l'insulino-résistance dans le tissu adipeux entraîne une majoration de la lipolyse, et dans le muscle entretient l'hyperglycémie, responsables d'une accumulation de lipides dans les hépatocytes appelée stéatose hépatique. Si ces AGL sont des mono ou poly-insaturés, cela entraîne une stéatose simple (35), mais en présence d'AGL saturés une lipotoxicité va se développer (36-37). Au niveau de l'hépatocyte ces lipides vont induire un stress du Réticulum Endoplasmique avec production de ROS (38-39), responsables de l'activation de gènes pro-apoptotiques et de la voie JNK impliquée dans l'insulino-résistance (40-42). Les macrophages hépatocytaires vont être activés d'une part par les hépatocytes apoptotiques et d'autre part directement par les AGL saturés qui vont se lier à leurs récepteurs TLR2/TLR4. Comme dans les autres tissus, cette liaison va favoriser l'expression de gènes pro-inflammatoires via les voies NF κ B et JNK et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Comme dans les autres tissus, l'activation de ces voies entraîne au niveau hépatique une insulino-résistance.

Lorsqu'ils entrent dans la cellule, les Acides Gras Libres sont rapidement estérifiés avec le CoEnzymeA en AcylCoA, qui peut soit être transféré sur une molécule de glycérol pour donner un Mono- un Di- ou Tri-Acylglycérol, soit être estérifié avec une sphingosine pour donner un céramide. Les Di-AcylGlycérols et les céramides ont une fonction de second messenger, et vont avoir un rôle dans la lipotoxicité lorsqu'ils contiennent des Acides Gras Saturés (33). A l'inverse, les Triglycérides et les AcylCoA tissulaires ne sont pas impliqués directement dans la lipotoxicité.

Les Diacylglycérols (DAG) interfèrent avec la voie de l'insuline en activant la PKC θ qui va diminuer la phosphorylation tyrosine des IRS 1 et 2 via une phosphorylation sérine inactivatrice. Le DAG contribue aussi à l'activation de JNK via une voie de signalisation PKC-dépendante.

Les céramides activent eux directement la PKC ζ et stimulent l'activité cytosolique de la Proteine Phosphatase 2A (PP2A) permettant la phosphorylation inactivatrice de Akt/PKB, et donc l'insulino-résistance. Ils sont aussi responsables d'un stress du RE et d'une dysfonction mitochondriale et donc d'une activation de la voie JNK. **(Figure 4)**

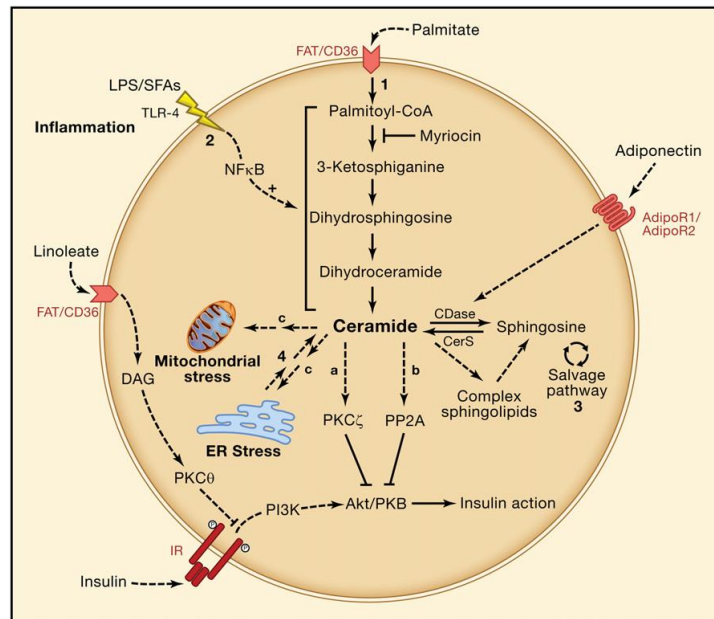


Figure 4 : Diagramme schématique illustrant les multiples mécanismes par lesquels les céramides sont générés en réponse à des stimuli de stress, et leur implication dans l'insulino-résistance. Tiré de Chavez et Al. *Cell Metabolism* 2012

B. Insulino-sécrétion et inflammation

La sécrétion d'insuline se fait exclusivement par les cellules- β des îlots de Langerhans pancréatiques, en réponse à une élévation de la glycémie. Ces cellules doivent donc être capables de monitorer la glycémie, de synthétiser les molécules d'insuline, de les stocker et de les sécréter.

Alors que l'inflammation de l'îlot était un mécanisme connu de longue date dans la physiopathologie du diabète de type 1, les premières descriptions dans le diabète non auto-immun ne datent que de 2007 (43). Il s'agissait initialement de l'observation d'une augmentation du nombre de macrophages dans les îlots des patients diabétiques par rapport aux îlots de patients non malades. En effet, si l'on trouve la même proportion d'îlots inflammés dans les diabètes auto-immun ou non, dans ce dernier cas les cellules immunitaires principales retrouvées ne sont pas des lymphocytes T mais bien des macrophages (44).

Les mécanismes de recrutement de ces macrophages sont toujours en cours d'exploration. La piste la plus sérieuse est celle de l'amyline, une hormone co-sécrétée par les cellules β en réaction à leur stimulation par le glucose ou des acides gras libres (45-46). A l'état pré-diabétique, l'élévation de l'insulinosécrétion s'accompagne donc d'une élévation de l'amyline (47-49.), dont l'accumulation semble entraîner la formation de plaques toxiques dans l'îlot, appelées « dépôts amyloïdes » (50-52). La présence de ces dépôts amyloïdes est corrélée à une élévation de la sécrétion d'IL-1 β par l'îlot. Cette élévation inverse le ratio IL-1 β / IL-1Ra en faveur de l'IL-1 β pro-inflammatoire. Il a été montré in vitro que le traitement d'îlots par de l'IL-1Ra humaine recombinante (Anakinra) améliorerait la dysfonction β initialement induite par leurs expositions à des hautes concentrations de glucose (glucotoxicité) (53). Conformément à ce concept, les résultats in vivo chez l'homme de plusieurs essais cliniques d'un antagoniste de l'IL-1 β , pour inhiber l'inflammation, ont montré une amélioration de la sécrétion d'insuline et de la glycémie (54-55).

Au niveau de l'îlot, l'élévation d'IL-1 β induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 IL-8 CXCL-1 CCL-2 et TNF- α) (56-57), responsables du recrutement de nouveaux macrophages et de leurs polarisations pro-inflammatoires. IL-1 β est aussi responsable de la sécrétion de son antagoniste IL-1Ra (53 ;58), ce qui en condition physiologique, permet une résolution rapide de l'état pro-inflammatoire. En effet, l'élévation transitoire d'IL-1 β dans l'îlot en réponse à l'apport de glucose alimentaire est une réaction adaptatrice physiologique, conduisant à une stimulation de la sécrétion d'insuline; l'effet délétère d'IL-1 β sur l'insulino-sécrétion dans le diabète de type 2 pourrait venir du caractère chronique de son élévation dans cette circonstance. La stimulation chronique par IL-1 β des cellules β pourrait ainsi conduire à leurs épuisement, à l'établissement d'un état de résistance de la cellule β à IL-1 β et donc à son pouvoir insulino-sécréteur et/ou IL-1Ra sécréteur, ou enfin à reprogrammer transcriptionnellement la cellule β diminuant sa capacité de prolifération et augmentant son apoptose.

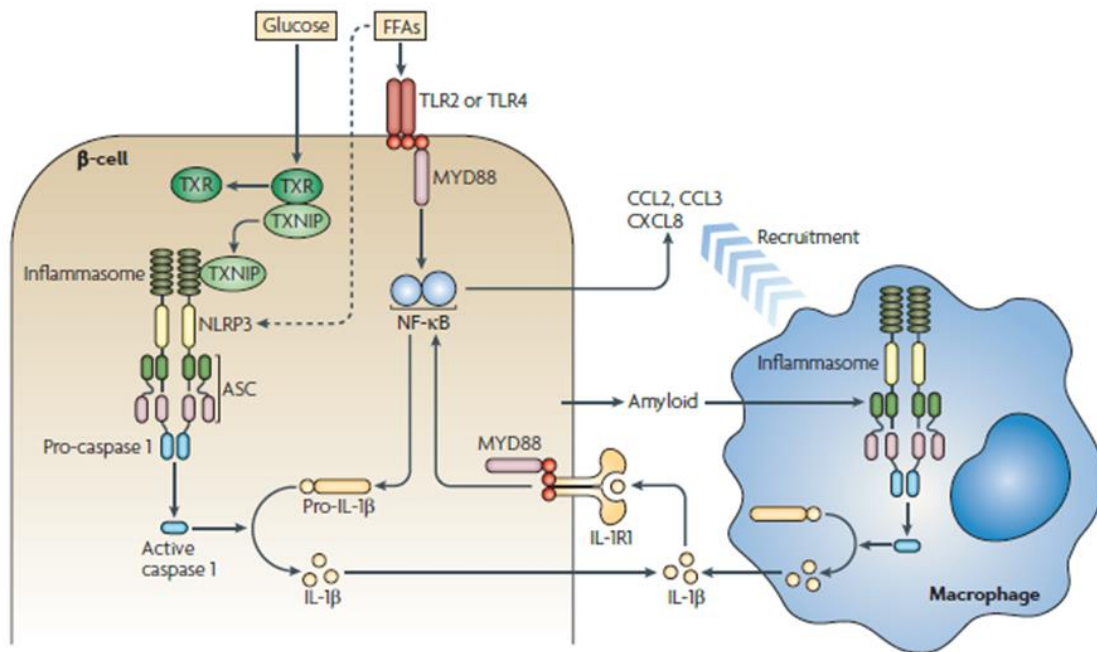


Figure 5 : Schéma représentant le rôle des Acides gras libres et du glucose dans l'établissement de l'inflammation médiée par IL-1 β dans l'îlot. Tiré de Donath et al. *Nature* 2011

Comme dans le foie et le tissu adipeux, les macrophages de l'îlot expriment le TLR-4 et peuvent donc aussi être directement orientés vers un phénotype pro-inflammatoire par les acides gras libres, circulant secondairement à la lipolyse accrue du fait de l'insulino-résistance. **(Figure 5)**

Alors que les macrophages M2 ont été montrés comme capables de promouvoir la régénération et la prolifération des cellules β , se sont ces activations pro-inflammatoires des macrophages résidents ou dérivés des monocytes qui, à l'inverse, sont associées à l'augmentation de l'apoptose et à la diminution de la prolifération beta-cellulaire.

La mise en place de l'insulino résistance est donc dépendante de celle d'une inflammation des tissus métaboliques, largement médiée par la polarisation des macrophages et l'accumulation de lipides toxiques. En parallèle, l'insulinopénie est aussi associée à un état inflammatoire local, médié par les mêmes acteurs : macrophages et lipides.

Les modulations locales de cette polarisation et de cette accumulation lipidique, par des facteurs génétiques ou environnementaux, pourraient donc participer aux différences d'insulino-résistance et d'insulino-sécrétion observées entre les différents groupes de patients diabétiques.

C. Les monocytes

L'analyse des macrophages tissulaires, tant à l'état basal qu'en situation inflammatoire, a montré qu'une partie d'entre eux étaient d'origine monocyttaire (59-60). En effet, certains sous-types de monocytes circulants ont la capacité, en réponse à des chimiokines telles que CCL2, des PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou des DAMP (Damage Associated Molecular Pattern), de pénétrer les tissus puis de s'y différencier en macrophages (61– 62). Dans le diabète de type 2, il a été montré que les macrophages pro-inflammatoires associés à l'insulino-résistance et au défaut d'insulinosécrétion étaient, au moins partiellement, d'origine monocyttaire (63). Il semble donc nécessaire d'étudier le fonctionnement de leurs précurseurs circulants pour analyser leurs potentiels rôles dans la mise en place de cette inflammation chronique de bas grade tissulaire.

a) Origine des monocytes et déterminant de leur taux plasmatique

Les monocytes sont des cellules myéloïdes appartenant au système phagocytaire mononucléaire en compagnie des macrophages et des cellules dendritiques classiques (CDc) (64– 65). Ce sont des cellules circulantes du sang qui constituent environ 10% des leucocytes dans l'espèce humaine. Ils se différencient initialement dans la moelle osseuse, à partir d'un progéniteur commun granulocytaire monocyttaire (66), puis sont libérés sous forme de Monocytes Classiques (cf infra) dans la circulation sanguine.

De nombreux facteurs influencent la libération dans le sang des monocytes, et donc leur abondance (**Figure 6**) (67) :

- *Le genre* : En situation basale physiologique, et quel que soit l'âge, le taux de monocytes est systématiquement plus élevé chez les hommes que chez les femmes (68-70). Cette différence semble notamment liée à la sécrétion d'œstrogènes puisqu'à la ménopause le taux de monocytes augmente significativement, et que cette hausse est annulée en cas de traitement hormonal de la ménopause (71)
- *L'âge* : il ne semble pas y avoir d'augmentation du taux de monocytes totaux avec l'âge (70–72) mais une modification de leurs profils inflammatoires (cf infra)
- *L'ethnie* : Une méta-analyse pluri-ethnique a montré que les caucasiens avaient des taux de monocytes circulants plus importants que les Afro-Américains ou que les Japonais (73).
- *L'alimentation* : Il a été bien montré que 3h après l'ingestion d'un repas hypercalorique (fast-food) le taux de monocytes totaux augmentait (74), alors qu'à l'inverse il existe une diminution de ce taux lorsque le sujet est à jeun (75).
- *L'exercice* : Il est connu depuis longtemps que l'exercice augmente le taux de leucocytes circulants (76). Pour les monocytes, il semblerait que la variation induite par l'exercice dépende du type d'exercice réalisé (aérobie ou anaérobie) (77)
- *Le cycle nyctéméral* : Le taux de monocytes totaux varie au cours de la journée, avec une diminution progressive au cours de la nuit, puis une remontée à partir du réveil et au cours de la journée (78-79).

- *Les traitements* : La prise de glucocortoïdes, connus pour être immunosupresseurs et anti-inflammatoires, entraîne une diminution rapide du taux de monocytes circulants (80). La sécrétion endogène de cortisol étant cyclique, elle a d'ailleurs possiblement une influence sur la variation nyctémérale des monocytes.

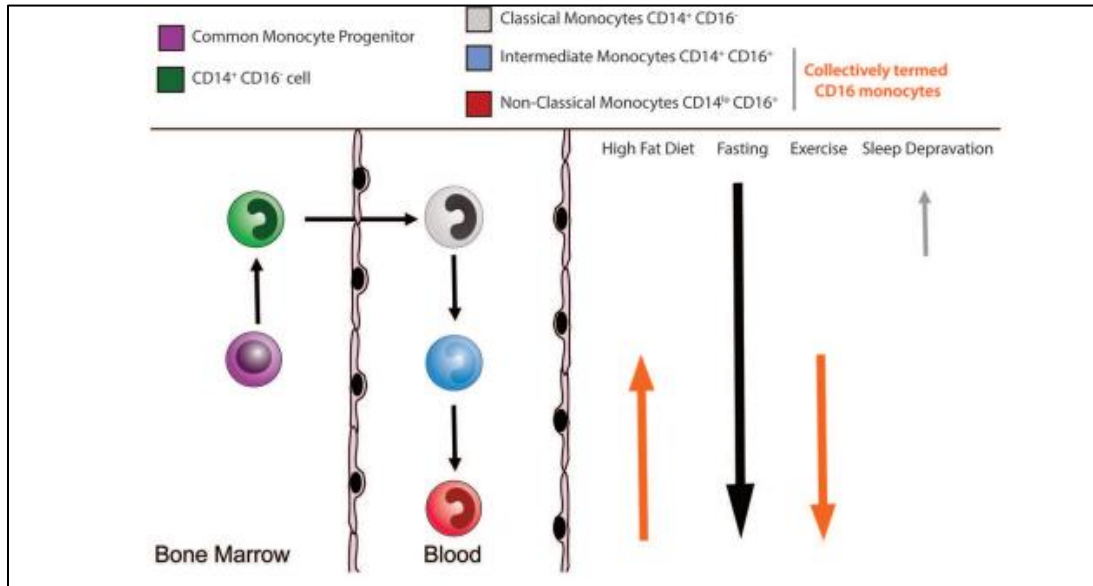


Figure 6 : Différenciations monocytaires dans la moelle osseuse et la circulation sanguine, et représentation de l'impact de différents facteurs sur le part de CD16+. Tiré de Patel et al. *Front Immun* 2019

b) Description des sous-types et de leurs fonctions

A l'état basal, les monocytes circulent dans le réseau vasculaire en attente d'un signal d'activation, que ce dernier vienne de médiateurs inflammatoires circulants ou directement de la rencontre avec un pathogène. En l'absence d'activation, une partie des monocytes peut infiltrer les tissus où ils se différencient en macrophages, participant au turn-over de ces derniers.

Les monocytes circulants constituent ainsi une équipe d'urgence, ayant la capacité de réagir très rapidement à une agression. Cette réaction consiste en un déplacement rapide vers le site de l'agression puis en des actions coordonnées anti et pro-inflammatoires, aidant ainsi à la destruction de l'agresseur et à la réparation du tissu lésé. Le déplacement vers le site d'action implique une capacité d'infiltration des tissus puis une capacité de différenciation en macrophage. Les actions pro-inflammatoires consistent majoritairement en la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permettant le recrutement et l'activation de nouvelles cellules de l'immunité innée. Les actions anti-inflammatoires des monocytes sont la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires stoppant le recrutement et l'activation de nouvelles cellules de l'immunité innée, et la phagocytose de cellules apoptotiques ou de débris cellulaires. Les caractères antagonistes de certaines de ces actions impliquent l'existence de plusieurs sous-types de monocytes circulants.

Chez l'Homme, les connaissances actuelles sub-divisent les monocytes en 3 sous-groupes que sont les monocytes classiques, les monocytes intermédiaires et les monocytes non classiques. Cette classification en 3 sous-groupes, a été possible grâce à l'apport de la cytométrie en flux qui a permis de mesurer le degré d'expression des protéines de surface CD14 et CD16 (81). CD14 est un corécepteur des TLR-4 qui médie le signal LPS, alors que CD16 est un Récepteur Fc des Immunoglobulines G.

Les monocytes classiques, qui représentent 80 à 90% des monocytes circulants sont CD14⁺CD16⁻, alors que les monocytes intermédiaires (5-10%) sont CD14⁺CD16⁺ et les monocytes non classiques sont CD14^{Low}CD16⁺ (5-10%). (81-82).

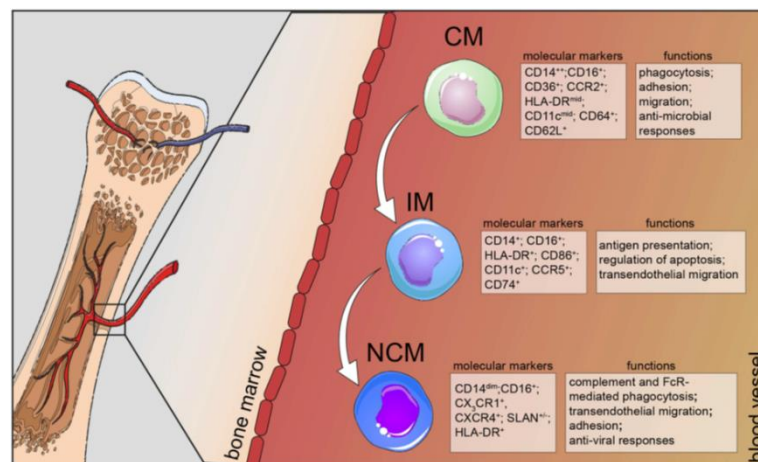


Figure 7. Caractérisation et devenir des différents sous-types de monocytes. CM= classiques, IM = Intermédiaires et NCM = Non-Classiques. Tiré de Kapellos *Front in Immunol* 2019

Les Monocytes Classiques (MC).

Les dernières études sur le sujet tendent à montrer que la moelle osseuse produit en fait quasi exclusivement des monocytes classiques, dont la durée moyenne de présence dans la circulation est de un jour (83– 84).

A l'état basal, 99% d'entre eux vont secondairement disparaître de la circulation sanguine en mourant ou en infiltrant un tissu pour s'y différencier (84). Ils ont en effet une capacité de migration intra-tissulaire puis de différenciation en Macrophages dérivés des Monocytes (moM_φs) et en DC dérivés des monocytes (moDCs)(85-89)

Le dernier pourcent semble se différencier en monocytes intermédiaires circulants, comme montré dans plusieurs études de cinétiques d'apparition des différents sous-types (83–84). Un autre argument majeur pour cette hypothèse est que les monocytes non classiques n'expriment pas le récepteur CCR2, nécessaire à la sortie de la moelle osseuse (90).

Les données actuelles de la science tendent ainsi à démontrer qu'il existe une différenciation linéaire entre les différents groupes de monocytes circulants et donc que les monocytes circulants CD14⁺ représenteraient les précurseurs des monocytes circulants CD16⁺ et des cellules tissulaires dérivées des monocytes (moM_φs et (moDCs) (91).

Face à un stimulus, les monocytes classiques ont plutôt un rôle dans la résolution de l'agression et de la réponse inflammatoire via des capacités de phagocytose, de détection/amplification de la réponse immunitaire innée (présentation d'antigène) et de sécrétion majoritairement de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10. (82–92)

Néanmoins, certaines études in vitro leur confèrent aussi une capacité de sécrétions massives de cytokines pro-inflammatoires (91), et les analyses comparatives d'expression génique les placent comme les équivalents des Monocytes Ly-6C^{High} (inflammatoire) chez la souris (88). Ces différences soulignent que la compréhension fine du fonctionnement des monocytes circulants reste à améliorer.

Dans son étude transcriptomique, Wong et al; retrouvent 1554 gènes différentiellement exprimés entre les MC, les MI et les MNC. Les voies moléculaires significativement enrichies dans les MC impliquent l'angiogenèse, la cicatrisation et la coagulation, témoignant de leurs rôles dans la réparation du tissu lésé. De plus les MC sont ceux exprimant le plus de gènes codant pour des récepteurs membranaires spécialisés dans le recyclage des LDL et des carbohydrates.

Ils y retrouvent aussi plus de gènes impliqués dans des phénomènes anti-apoptotiques et pro-prolifératifs, en faveur de l'hypothèse des MC précurseurs des autres sous-types. (82)

Il est à noter que leur métabolisme énergétique repose sur l'utilisation des carbohydrates via la voie de la glycolyse. (93)

Les **Monocytes Intermédiaires (MI)**.

Les monocytes intermédiaires sont un état de transition entre les MC et les MNC, puisqu'ils ont acquis le CD16 sans encore perdre le CD14.

Les facteurs régulateurs de la conversion, à l'état basal, des monocytes classiques en monocytes intermédiaires sont encore mal connus chez l'Homme. Les monocytes issus de cette transition ont une vie plasmatique de quatre jours avant de poursuivre leur transition vers le phénotype non classique ou la mort, sans possibilité d'infiltration de tissu à l'état basal.

In vitro, la stimulation par le LPS entraîne la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et CCL3), laissant penser à un rôle in vivo plus pro-inflammatoire que les monocytes classiques. Leurs fonctions seraient de recruter et d'activer rapidement les cellules du système immunitaire innée en cas de rencontre avec une agression. (82-94-95).

Sur le plan transcriptomique, ils clusterisent plus avec les MNC qu'avec les MC, et sont ceux qui comptent le moins de gènes surexprimés (135/1554). Ils expriment la majorité des gènes différentiellement exprimés à un niveau intermédiaire entre les MC et MNC, témoignant de leur statut d'état de transition. (82)

Enfin, **les Monocytes non classiques (MNC)** seraient donc la dernière étape de différenciation des monocytes circulants, caractérisée notamment par la perte du CD14 et donc potentiellement par l'activation préférentielle via la voie TLR4. A l'inverse ils reconnaissent et éliminent (phagocytent) les cellules endothéliales mourantes d'une manière dépendante de

TLR7 dans le but de maintenir l'homéostasie vasculaire. Ils sont d'ailleurs appelés « Monocytes patrouillants » car se déplaçant au contact de l'endothélium, où ils exercent une fonction de surveillance. Comme les Monocytes intermédiaires, ils ont un profil sécrétoire in vitro pro-inflammatoire (TNF α IL1b) mais en réponse à des ligands des TLR7 (Complexes viraux ou immuns) et non à des ligands de TLR4. (94)

A l'inverse des monocytes classiques, leur métabolisme énergétique repose sur les capacités d'oxydation/phosphorylation de la chaîne respiratoire mitochondriale. (93)

Chez l'homme, un quatrième sous-groupe de monocytes a été décrit dans 2 études (96–97) et consisterait en des monocytes CD14^{LOW} - CD16⁻, appelés « **Immatures** ». Ces monocytes seraient stockés dans la moelle osseuse et la rate et pourraient exceptionnellement devenir circulants, ils auraient des capacités prolifératives supérieures aux autres sous-types, seraient sécréteurs de TNF α et se différencieraient directement en monocytes intermédiaires (97).

Nous avons vu précédemment qu'il existait une inflammation chronique de bas grade dans le diabète de type 2, avec notamment un switch phénotypique pro-inflammatoire des macrophages. Il est connu que cet état inflammatoire chronique est associé à une monocytose (98–99), qui pourraient être liée d'une part directement à l'hyperglycémie et d'autre part aux signaux pro-inflammatoires tissulaires. Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires de cette monocytose sont encore très peu connues. La question du rôle des monocytes dans l'entretien et donc la non résolution de cette inflammation est encore sans réponse.

3. Variations des pourcentages des différents sous-types de monocytes en fonction de différentes situations physiologiques ou pathologiques

Nous avons vu précédemment que, même à l'état physiologique, le compte de monocytes variait selon de nombreux critères cliniques simples, il en est de même pour la répartition des 3 sous-groupes décrits plus haut.

Ainsi la proportion de monocytes non classiques serait supérieure chez les hommes par rapport aux femmes (100), les sujets d'origine africaine auraient plus de monocytes non classiques et moins de monocytes classiques et que les caucasiens (101), et il existerait une augmentation avec l'âge du pourcentage de monocytes intermédiaires et non classiques (102–103).

Durant la grossesse, il est connu que le taux de monocytes augmente (104–105), mais il existe aussi une modification de la répartition des sous types. La grossesse est associée à une activation des monocytes se traduisant par une augmentation du taux de monocytes intermédiaires et une diminution du taux de monocytes classiques (106–107). A l'inverse, chez les patientes ayant un diabète gestationnel, on observe une diminution significative des monocytes intermédiaires et une augmentation des classiques (108).

Des variations de répartitions des monocytes ont aussi été décrites entre des états sains et des états pathologiques. Le premier exemple est celui des sepsis durant lesquels les pourcentages de Monocytes Intermédiaires et Non-Classiques augmentent alors que celui des Monocytes Classiques diminue (109).

Dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques stériles, les patients porteurs de lupus systémique, de maladies de Crohn, d'asthme ou de polyarthrite rhumatoïde présentent les mêmes variations des différents sous-types de monocytes que durant le sepsis (109–112). Cette constance dans les variations en contexte inflammatoire est un argument supplémentaire en faveur du rôle pro-inflammatoire des MI et MNC.

Enfin, les maladies cardio-métaboliques sont également associées à des variations des sous types de monocytes. Ainsi, chez les patients en surpoids ou obèses, le pourcentage de monocytes classiques diminue par rapport aux patients sains (113–115), avec une augmentation des non classiques (113–116). A l'inverse, la perte de poids associée à la réalisation d'une chirurgie bariatrique de type Bypass gastrique était associée à une rediminution des monocytes intermédiaires et non classiques (113).

L'analyse de la littérature concernant la répartition des sous-types de monocytes chez les patients de la population générale ayant développés de l'athérosclérose montre de manière répétée une augmentation des monocytes intermédiaires et une absence de modification significative des monocytes non classiques (117-119).

Les monocytes sont donc des cellules impliquées dans la mise en route de la réponse inflammatoire puis dans sa résolution, via des sous-types aux propriétés distinctes, pro ou anti-inflammatoires. La rupture de l'équilibre entre ces sous-types, avec augmentation durable de la proportion des sous-types pro-inflammatoires, est associée à l'établissement de maladies inflammatoires chroniques. Comme vu plus haut, certains types de diabète sont eux-mêmes des maladies inflammatoires chroniques, dans lesquelles le rôle des monocytes pourrait être important si ce n'est central. (Figure 8)

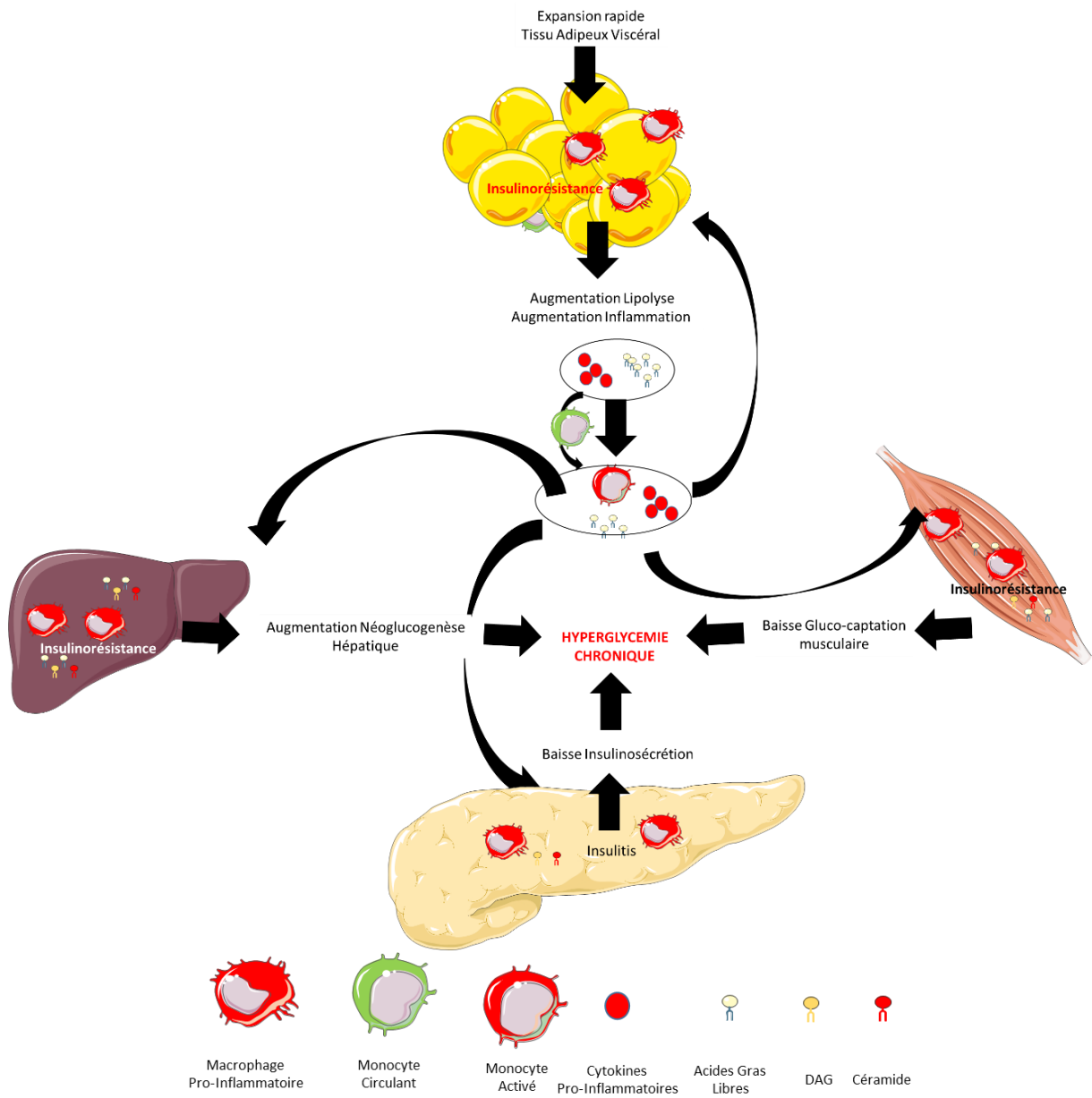


Figure 8 : Récapitulatif de la place des cellules de l'immunité innée dans l'établissement d'une hyperglycémie chronique.

D. Prédiabète et diabète gestationnel

Entre la normoglycémie et le diabète, il existe un état appelé « Prédiabète », basé sur des paramètres glycémiques supérieurs à la normale mais en dessous des seuils de diabète. Pour l'ADA le prédiabète comprend les patients avec une glycémie à jeun entre 1g/l et 1,25g/l, avec une glycémie à 2h lors d'une HGPO 75g entre 1,4 et 2g/l ou avec une HbA1c entre 5,7 et 6,4% (120).

Il s'agit d'un état à haut risque de diabète avec un taux de conversion annuel de 5 à 10 % (121-122), mais avec une proportion bien supérieure de sujets retournant en normoglycémie (121-123-124). La prévalence du prédiabète augmente dans le monde (125-126) et il est prévu que >470 millions de personnes auront un prédiabète en 2030 (127). Les patients prédiabétiques peuvent être divisés en deux groupes, ceux présentant une hyperglycémie à jeun et ceux présentant une intolérance au glucose.

Comme le diabète, le prédiabète associe à des degrés diverses une résistance à l'insuline et un dysfonctionnement des cellules β ; ces anomalies débutent avant que l'élévation du taux de glucose ne soit détectable (128–131).

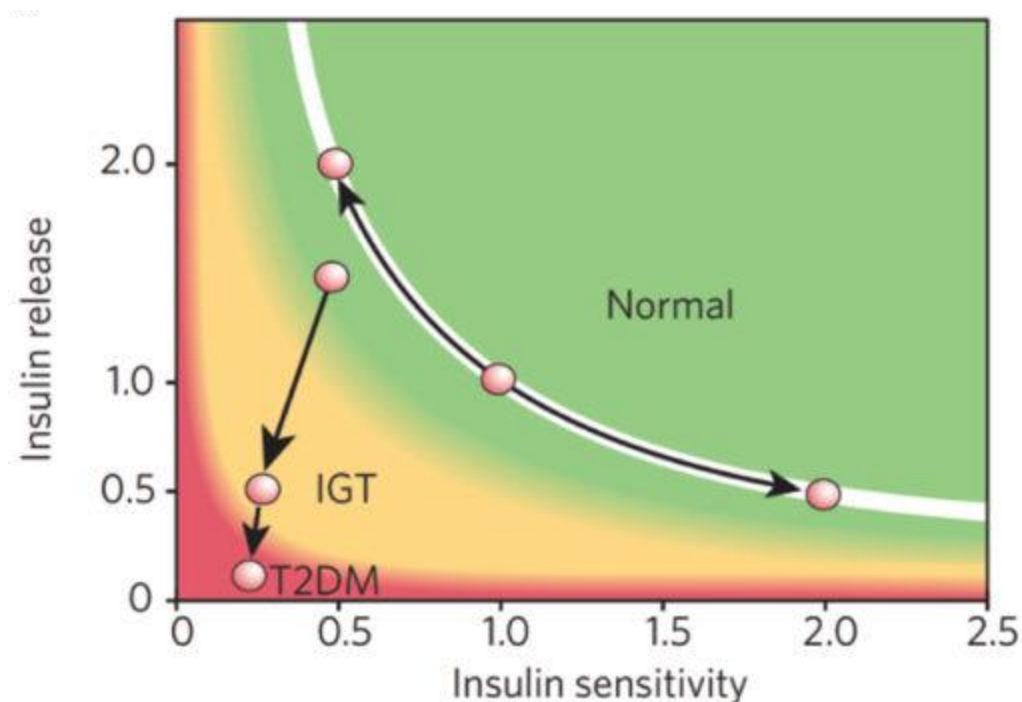


Figure 9 : Insulinosensibilité et fonction beta-pancréatique en situation de normoglycémie, d'intolérance au glucose (IGT) et de diabète de type 2 (T2DM)

Un autre état intermédiaire est le diabète gestationnel.

Au cours d'une grossesse normale, le métabolisme glucidique maternel, qu'il soit basal ou postprandial, change progressivement pour limiter l'utilisation maternelle du glucose et ainsi rediriger les substrats énergétiques glucidiques vers le fœtus, afin de permettre une croissance fœtale optimale. L'insulino-sensibilité et l'insulino-sécrétion maternelles sont impactées. (132-135)

L'évolution de l'insulino-sensibilité maternelle au premier trimestre reste controversée, même si plusieurs arguments sont en faveur de son augmentation. D'abord sur le plan clinique, les patientes ayant un diabète de type 1 voient leurs besoins en insuline diminuer au 1^{er} trimestre de leurs grossesses; ensuite, on constate une augmentation du tissu adipeux en rapport avec une hyperphagie et une majoration de la lipogenèse, qui est sous le contrôle du signal insuline. Sur le plan scientifique enfin, Yen et al. et Kalkhoff et al. (136-137) ont montré cette augmentation au cours de tests métaboliques simples, et Kirwan et al. (138) au cours de clamps euglycémiques hyperinsulinémiques, mais de nombreuses autres études n'ont pas réussi à confirmer ces résultats.

A l'inverse, il existe de nombreuses démonstrations de la diminution de l'insulino-sensibilité maternelle lors des seconds et troisième trimestres, (139-140-132). Cette deuxième phase conduit à un état d'insulino-résistance physiologique à partir du début du 2^{ème} trimestre. La mise en place progressive de cette insulino-résistance se fait sous la direction de deux grands groupes de facteurs circulants : les hormones placentaires et les adipokines. (141)

En parallèle, il existe une majoration progressive de l'insulino-sécrétion maternelle en réponse au glucose, tant lors de la première que de la deuxième phase d'insulino-sécrétion. Il a été montré chez les rongeurs que cette compensation beta cellulaire précédait le développement de l'insulino-résistance. Cette majoration de l'insulino sécrétion est secondaire à une augmentation, transitoire pendant la grossesse, de la masse des cellules β des îlots de Langerhans maternels via des mécanismes d'hyperplasie et d'hypertrophie. Ces modifications seraient induites par l'augmentation des concentrations sériques d'hormones placentaires et non placentaires, notamment la human Placental Lactogen (Hpl) et la Prolactine (PRL), Ces deux hormones se lient au même récepteur au niveau de la cellule β , le récepteur de la prolactine. Cette liaison permet la phosphorylation du récepteur par JAK2, permettant le recrutement et la phosphorylation du transducteur/activateur STAT5, qui se déplace ensuite vers le noyau où il régule l'expression des gènes cibles. La sérotonine, induite par la grossesse, joue également un rôle dans l'augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose.

En post-partum, la masse beta réduit rapidement, via une association entre réduction de la prolifération et de la taille des cellules bêta, et augmentation de leur apoptose. (135 ;142-146)

Chez les patientes présentant un diabète gestationnel, la majoration de l'insulino-sécrétion maternelle ne permet pas de compenser la progression de l'insulino-résistance, résultant en une hyperglycémie chronique. **(Figure 10)**

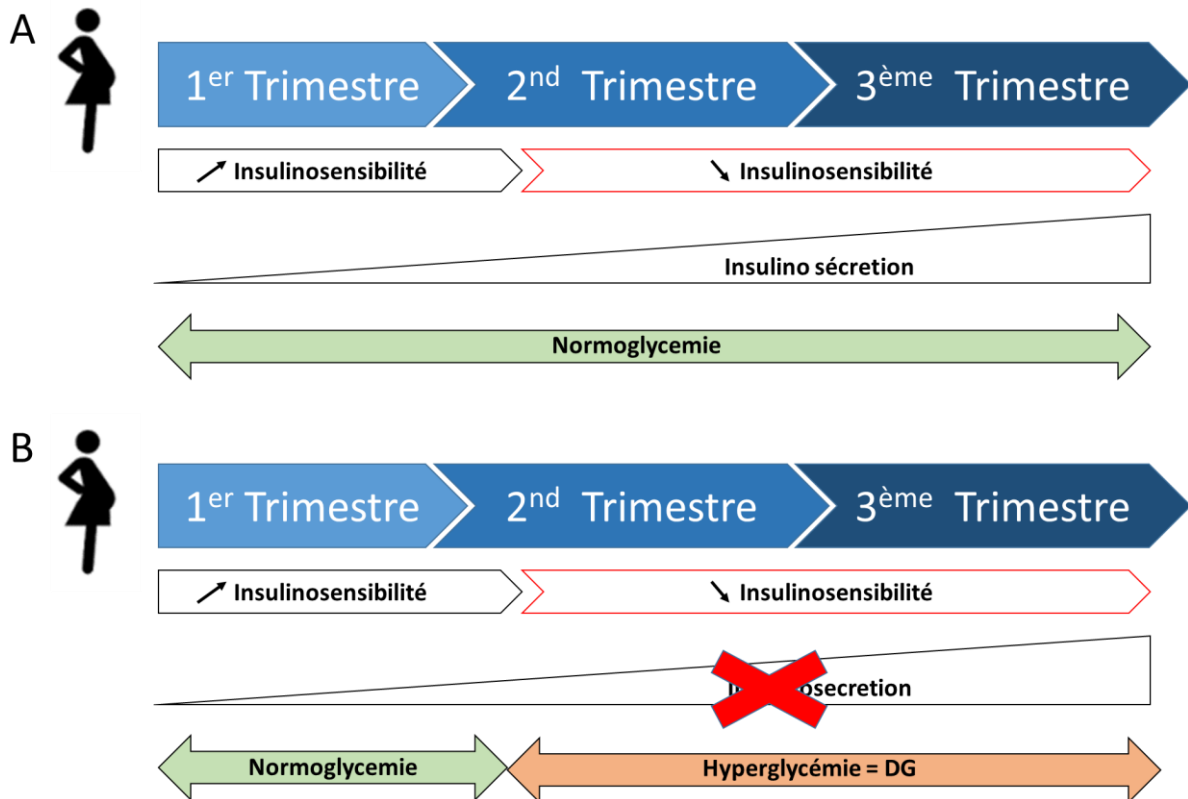


Figure 10 : régulation glycémique normale au cours d'une grossesse (A) et altérée au cours d'un diabète gestationnel (B)

Pour en faire le diagnostic, il convient chez les patientes à risque de réaliser entre 24 et 28 Semaines d'Aménorrhées(SA) une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) à 75 grammes de glucose avec mesure de la glycémie à jeun, à 1 heure et à 2 heures.

Les seuils pour poser le diagnostic de diabète gestationnel après HGPO 75 g sont:

- Glycémie à jeun entre 0,92 g/l et 1,25 g/l;
- Et/ou glycémie à 1 heure \geq à 1,80 g/l;
- Et/ou glycémie à 2 heures entre 1,53 g/l et 1,99 g/l.

Une seule valeur supérieure ou égale à ces normes suffit pour poser le diagnostic de diabète gestationnel.

Si la glycémie est \geq à 1,26 g/l à jeun et/ou \geq à 2,0 g/l 2 heures après la charge, il s'agit d'un diabète avéré découvert pendant la grossesse.

La prise en charge du diabète gestationnel permet de réduire les complications maternelles, fœtales et néonatales. Cette prise en charge comprend systématiquement des règles hygiéno-diététiques, qui peuvent être associées à une insulinothérapie si leur efficacité est insuffisante.

Immédiatement après l'accouchement, l'expulsion du placenta permet une levée rapide de l'insulinorésistance qu'il induisait, et donc une amélioration de l'équilibre métabolique. Les recommandations actuelles sont de réaliser à 3 mois post-partum une HGPO 75g pour classer les femmes en normo glycémiques, prédiabétiques ou diabétiques, et démarrer la prise en charge adaptée.

Le diabète gestationnel partage avec un sous-groupe de diabète de type 2 sa physiopathologie (insulinorésistance au premier plan, associée à une insulinopénie relative) et ses facteurs de risque (âge, surpoids et antécédents familiaux).

Par ailleurs, le risque à 10 ans de développer un diabète est autour de 50% chez les femmes ayant fait un diabète gestationnel. (147)

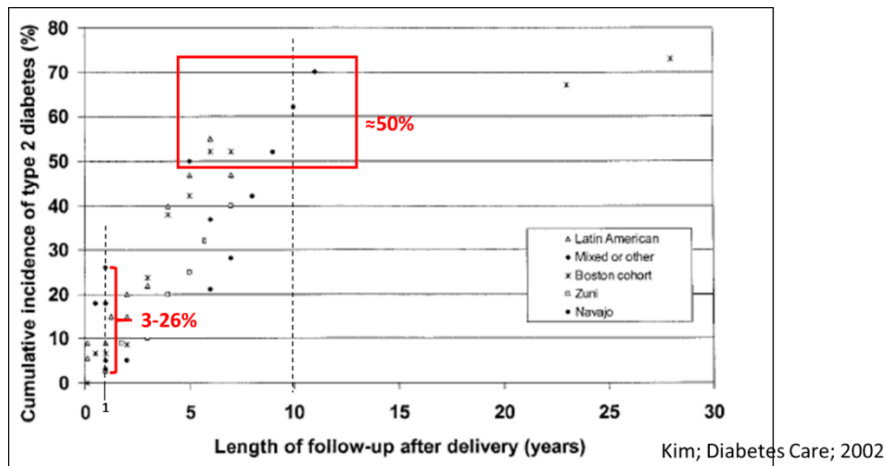


Figure 11 : Incidence par ethnie du diabète de type 2 au cours du suivi post-partum de patientes ayant développé un diabète gestationnel, Modifiée de Kim *Diabetes Care* 2002

Toutes ces considérations tendent à montrer que le diabète gestationnel est une manifestation visible d'un processus chronique en cours de progression qui a été décompensé transitoirement par les modifications hormonales de la grossesse, et qui conduira à terme vers un diabète persistant. Les patientes normo glycémiqes, pré diabétiques et diabétiques lors de l'HGPO 75g 3 mois après la délivrance d'une grossesse marquée par un diabète gestationnel seraient donc des femmes à 3 stades différents d'une même maladie.

Dans l'hypothèse d'une participation de l'inflammation dans la genèse de cette pathologie, l'étude comparative de l'état inflammatoire de ces femmes, et notamment de leurs monocytes, pourrait permettre de confirmer cette théorie et de mettre en lumière les mécanismes moléculaires sous-jacents. Figure 12

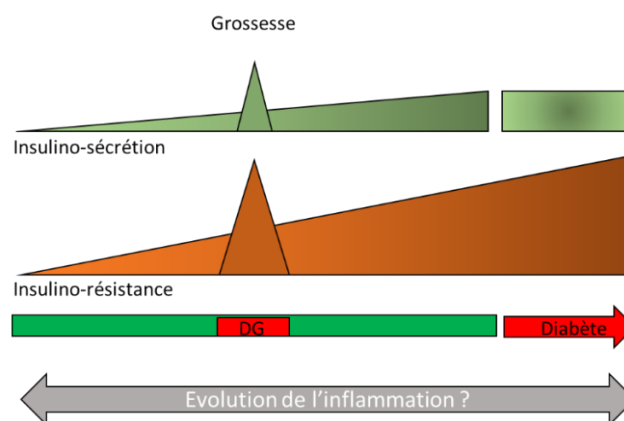


Figure 12 :Représentation de l'évolution de l'insulino-sécrétion et de l'insulinorésistance chez une femme ayant fait un diabète gestationnel puis développant un diabète.

2. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique.

L'OMS définit l'athérosclérose comme étant « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modification de la média ». Ces remaniements sont appelés *plaques d'athéromes*, ces plaques font saillies dans la lumière artérielle mais n'ont un retentissement clinique que lorsqu'elles diminuent de plus de 50-70% la lumière de l'artère ou quand elles se détachent et provoquent des thromboses qui vont bloquer la circulation sanguine en aval.

L'athérosclérose n'est pas spécifique du diabète, mais s'y distingue par sa précocité, sa plus grande fréquence et sa sévérité. Le risque cardiovasculaire est multiplié par 2 à 3 par le diabète, indépendamment des autres facteurs de risque fréquemment associés comme l'HTA. Le sur risque associé au diabète varie selon le lit artériel :

- Risque coronarien multiplié par 2 à 4 ;
- Risque d'accident vasculaire ischémique multiplié par 1,5 à 2 ;
- Risque d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs multiplié par 5 à 10.

La mortalité des AVC et des infarctus du myocarde est supérieure en cas de diabète (risque de décès multiplié par 2 environ).

A. Physiopathologie de l'athérosclérose

La constitution de la plaque se fait en plusieurs étapes et dépend d'une part de l'entrée passive des lipoprotéines (LDLc, VLDL) et de leurs oxydations dans l'intima, et d'autre part de la réaction inflammatoire locale impliquant macrophages résidents et monocytes infiltrants.

Elle commence par la pénétration passive et l'accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDLc) dans l'intima artérielle. Dans l'espace intimal, les LDL sont alors oxydées par différents mécanismes enzymatiques et non enzymatiques. (148). Cette oxydation conduit à l'activation des cellules endothéliales, c'est-à-dire à l'expression à leurs surfaces de molécules d'adhésion (intégrines et sélectines) qui permettent l'adhésion de monocytes circulants à cette surface endothéliale (149-152).

Sous l'influence du MCP-1, les monocytes ayant adhérents à la paroi pénètrent dans l'espace sous endothélial (153-154) ; puis sous l'influence du M-CSF (monocyte-colony stimulating factor) les monocytes s'y différencient en macrophages (149).

Ces macrophages nouvellement différenciés vont d'une part se transformer en cellules spumeuses en captant les LDL-oxydées via des récepteurs « scavengers » (155-156) et d'autre part produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) responsables de l'amplification et de la pérennisation de l'état inflammatoire local (157). Ces cytokines pro-inflammatoires sont notamment à leurs tours capables de médier l'activation endothéliale,

favorisant ainsi l'adhésion et l'internalisation de nouveaux monocytes, faisant rentrer la plaque dans un cercle vicieux d'auto-amplification responsable de la progression de la plaque.

Ce recrutement cellulaire continu favorise la formation de plaques d'athérome avancées, consistant en une région centrale nécrotique entourée d'une chape de cellules musculaires et d'une matrice extra-cellulaire riche en collagène et en protéoglycane. Par la suite, cette chape fibreuse peut être progressivement amincie par l'action de métalloprotéinases matricielles (MMP) sécrétées par les macrophages, rendant les plaques sujettes à la rupture (158).

La rupture d'une plaque d'athérome entraîne la libération de son contenu dans la lumière artérielle, occasionnant la formation d'un thrombus qui, en obstruant la lumière artérielle, occasionne une ischémie aiguë des territoires en aval (159). Cette ischémie aiguë est appelée syndrome coronarien aigu, accident vasculaire cérébrale ou ischémie aiguë de jambe suivant le lit artériel intéressé.

En l'absence de rupture de plaque, celle-ci peut progresser jusqu'à occasionner des symptômes (angor d'effort, claudication intermittente) pour des efforts de moins en moins importants.

Cette progression de la plaque d'athérome jusqu'à la constitution d'une sténose significative ou jusqu'à sa rupture, est donc fortement dépendante des cellules de l'immunité innée.

B. Evaluation de l'athérosclérose

Il est possible d'évaluer le risque de survenue d'un événement cardiovasculaire majeur (ECVM) via la réalisation d'un score calcique coronaire (SCC) (160). Plus l'athérosclérose coronaire est importante, plus la plaque d'athérome contient des dépôts de calcaires qui sont visibles au scanner (hyperdenses). Le calcul du SCC repose sur l'acquisition par un scanner de 20 coupes transversales centrées sur le cœur et les artères coronaires. Pour chaque coupe, ne sont retenues que les régions de plus de 1mm² ayant une densité supérieure ou égale à 130 unités Hounsfield (UH). Ces régions sont affectées d'un score égal à la multiplication de leur surface en mm² par un nombre reflétant leur densité, nombre défini selon le protocole suivant : 1 = 130 à 199 UH, 2 = 200 à 299 UH, 3 = 300 à 399UH et 4 ≥ 400 UH. L'addition du score de chaque région d'une coupe donne le score de la coupe. L'addition du score de chaque coupe donne le score calcique coronaire total.

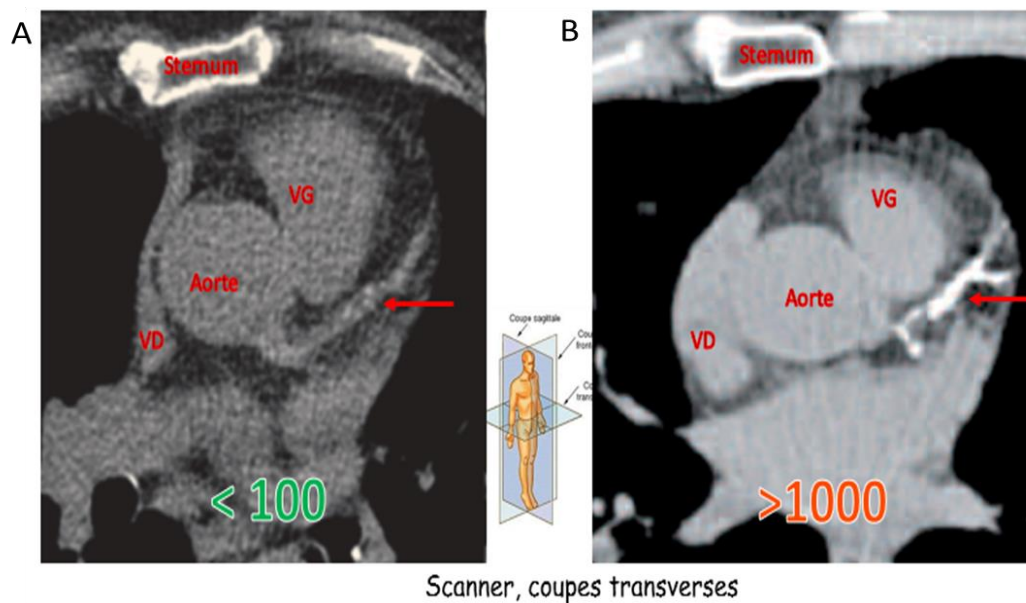


Figure 13 : Exemple de deux coupes de score calcique coronaire, représentant deux scores extrêmes (A) moins de 100, (B) plus de 1000.

Les résultats du score calcique coronaire sont corrélés au risque de survenue d'un événement cardiovasculaire chez le patient. A 0, le risque est nul, entre 1 et 100 il est faible, modéré entre 101 et 399, et on parle de risque élevé à 400 ou plus de score calcique coronaire (160–161).

Il existe néanmoins quelques limites au score calcique coronaire, qui sont

- Sa faible résolution ne permettant pas de décrire précisément la plaque (circonférentielle ou non, embranchement vasculaire, taille du vaisseau sous-jacent),
- L'absence de quantification des plaques d'athéromes non calcifiées, et
- L'absence de renseignement fonctionnelle direct (flux sanguin, hypoxie tissulaire) qui nécessite un autre type d'imagerie en cas de suspicion d'ischémie myocardique silencieuse.

Si les principaux déterminants de la progression du score calcique coronaire chez un patient sont le tabagisme, l'hypertension et la présence d'un diabète de type 2, il a aussi été montré récemment que, dans une population de patients diabétiques de type 2, après ajustement sur le sexe, l'âge, le taux de cholestérol, l'HbA1c, la pression artérielle et l'existence d'une microalbuminurie, plus le taux de TNF α (Tumor-Necrosis-Factor alpha) était élevé chez un patient, plus son score calcique coronaire progressait. Le TNF α étant une cytokine pro-inflammatoire, on peut donc y voir un autre lien entre inflammation et progression du score calcique coronaire. (162)

C. Association entre les différents sous-types de monocytes et le risque cardiovasculaire dans la population générale.

Dans la population générale, l'athérosclérose est associée à une augmentation du pourcentage de monocytes intermédiaires ; dans le même temps le pourcentage de monocytes non-classiques ne change pas, et l'évolution de celui des monocytes classiques varie en fonction des études (163– 165).

Si l'on se focalise sur les atteintes coronariennes, il ne semble pas y avoir de modification du nombre ou du pourcentage de monocytes intermédiaires entre les patients malades et les patients sains (166-171); les données actuelles concernant les monocytes classiques et non classiques sont très hétérogènes et ne permettent pas de conclure (166;168;170).

Enfin, dans le cas précis de la cardiopathie ischémique, la seule étude dédiée ne retrouve pas de changement de répartition ou de nombre des différents sous-groupes de monocytes, entre les sujets sains et malades (172).

3. En pratique clinique générale, l'évaluation de l'inflammation repose sur la quantification des globules blanc plasmatiques, de la CRP(us) et du fibrinogène

En pratique clinique, il est régulièrement nécessaire d'évaluer l'état inflammatoire locale ou systémique d'un patient, et de monitorer cet état afin de vérifier sa résolution. Pour cela il existe des marqueurs cliniques et biologiques, témoignant de la physiologie du système immunitaire inné. Elle comprend des barrières physiques et chimiques, des médiateurs humoraux et des médiateurs cellulaires.

Les barrières

Les barrières physiques et chimiques sont à l'interface entre l'hôte, qui doit être protégé, et l'environnement extérieur qui est potentiellement agressif.

La principale barrière physique est la peau, qui consiste en des couches de cellules épithéliales stratifiées reliées par des jonctions serrées et des protéines de structures. Elle peut être divisée en deux couches superposées distinctes : le derme (en profondeur) et l'épiderme (en surface). Ces couches empêchent l'infiltration d'agents pathogènes dans un sens, et les pertes hydriques dans l'autre. En plus de cette défense mécanique, la peau est constamment lubrifiée par des sécrétions externes qui non seulement aident au maintien de son intégrité physique mais présentent par ailleurs des propriétés antimicrobiennes. Enfin la peau contient en son sein des médiateurs de l'immunité innée, qui seront développés dans le paragraphe dédié. (173- 174)

La seconde barrière physique est l'ensemble des muqueuses de l'organisme, qui en tapissent les cavités internes et remplissent les mêmes fonctions que la peau. Au-delà de leurs spécificités propres, les muqueuses de chaque appareil (digestif, respiratoire, urinaire et reproductif) partagent de nombreuses caractéristiques : un pH bas, la présence d'enzymes hydrolytiques et de mucus à leurs surfaces, et la sécrétion de médiateurs humoraux (175).

Cliniquement, l'inflammation se traduira au niveau local par l'existence d'un œdème avec rougeur, douleur et chaleur.

Les médiateurs humoraux

Les médiateurs humoraux sont des protéines ayant un rôle dans l'immunité innée, on peut les regrouper en 5 grandes familles (176-177) :

1. Les peptides anti-microbien (PAM) se trouvent dans le plasma et les sécrétions des muqueuses, le plus actif est le Lysozime qui, grâce à son action enzymatique, lyse directement les bactéries. Via leurs capacités antibactériennes, anti-fongiques et anti-parasitaires, les Defensines, les Cathélicidines et l'Hepcidine font aussi parti des peptides anti-microbien impliqués dans l'immunité innée.
2. Les protéines de la phase aigüe (PPA) sont synthétisées puis sécrétés dans le plasma et les sécrétions épithéliales durant l'infection et l'inflammation. Le principal PPA est la protéine C-Réactive (CRP) qui est impliquée dans la reconnaissance du pathogène, la réaction d'agglutination et l'activation du complément. Les autres PPA sont

l'haptoglobine, la céruloplasmine, l'alpha2-macroglobuline, le fibrinogène, la transferrine et les serum Amyloid Aa et P.

3. Le système du complément est composé de protéines sériques qui réagissent contre une pathogène via une cascade moléculaire, permettant l'opsonisation du pathogène, l'augmentation de la réponse inflammatoire systémique, et la formation du complexe d'attaque membranaire qui entraîne la lyse microbienne.
4. Les cytokines sont les protéines qui assurent la communication intercellulaire, essentielle pour obtenir une réponse immunitaire coordonnée et efficace. Elles sont divisées en différentes familles telles que les Interférons (IFN), les Interleukines (IL) les Tumor Necrosis Factors (TNF) et les Transforming Growth Factors (TGF). Certaines d'entre-elles ont déjà été présentées précédemment.
5. Les anticorps naturels sont des immunoglobulines circulantes (principalement des IgM) préexistantes à tout pathogène ; ils sont synthétisés par des lymphocytes B en absence de pathogène.

En pratique clinique l'ensemble de ces médiateurs peuvent être dosés. Le plus fréquemment utilisé est la CRP, qui permet d'attester de la présence d'une inflammation, quel qu'en soit la cause, puis de sa résolution. Dans certaines pathologies, son taux peut servir de facteur pronostic ou de de gravité (178-183). Il convient d'ajouter que, dans le cadre d'une recherche d'inflammation chronique de bas grade durant laquelle est attendue une élévation de la CRP dans les valeurs basses, il est recommandé doser la CRP ultrasensible plutôt que la CRP. C'est par exemple le cas au cours de l'évaluation du risque cardiovasculaire chez des patients en prévention primaire. Le dosage de CRP ultra-sensible permet ainsi de détecter des valeurs allant jusqu'à 0.2 mg/l.

Les médiateurs cellulaires

Le système monocytaire phagocytaire a déjà été présenté plus haut. En pratique clinique, la quantification du taux de leucocytes sanguins et monocytémie sont possible, mais pas l'analyse plus fine des différents sous types de monocytes, ni celle des macrophages tissulaires.

4. L'étude de l'inflammation en recherche fondamentale

A l'inverse, il est possible en recherche fondamentale d'étudier plus précisément l'ensemble des leucocytes circulants ainsi que les macrophages, notamment du tissu adipeux. Dans le chapitre suivant, publié dans Methods in Molecular Biology, les méthodes utilisées dans le laboratoire, et utilisées pour ce travail de thèse, sont décrites.

[cf ANNEXE]

Hypothèse : Certains types de diabètes non auto-immuns, notamment ceux pour lesquels l'insulino résistance est prépondérante, sont associés à un état inflammatoire chronique de bas grade, pathologique car non régressif, semblable à celui rencontré dans l'athérosclérose, ce qui expliquerait leurs plus grandes susceptibilités à la macroangiopathie. A l'inverse, il pourrait exister des diabètes non auto-immuns dans lesquels le système immunitaire inné n'est pas ou peu impliqué, et dont le risque cardiovasculaire est moindre. Identifier des marqueurs biologiques séparant ces différents sous-types pourrait permettre de mieux individualiser la prise en charge thérapeutique des patients.

Objectifs :

- Etudier et décrire les monocytes circulants dans la population diabétique, et leurs modifications au cours de la progression de l'athérosclérose chez des patients diabétiques.
- Etudier et décrire les monocytes circulants et leurs interactions avec les lipides au cours de la pathogénèse du diabète, dans le modèle du diabète gestationnel.
- Etudier le rôle de l'inflammation dans le sur-risque de formes sévères d'infection à COVID-19 chez les patients diabétiques de type 2.

RESULTATS

Sommaire

Chapitre 1 : Etude des monocytes dans une population de patients avec diabète de type 2

- 1. Introduction**
- 2. Objectif**
- 3. Méthodes**
 - A. Cohorte Angiosafe2
 - B. Immunophénotypage
 - C. Analyses statistiques
 - D. Analyse transcriptomique
- 4. Résultats**
 - A. Description de la population totale
 - B. Evaluation des facteurs cliniques et biologiques associés au taux de monocytes dans une population diabétique de type 2 non sélectionnée.
 - C. Evaluation du risque cardiovasculaire dans cette même population, et son association avec les données monocytaires
 - D. Description de la sous-population utilisée pour l'analyse transcriptomique
 - E. Résultats de l'analyse transcriptomique
- 5. Discussion**
- 6. Publication**

Chapitre 2 : Etude des monocytes dans le modèle du diabète post-gestationnel – Etude Epitherapie

- 1. Introduction**
- 2. Objectif**
- 3. Méthodes**
 - A. Recrutement des sujets
 - B. Immunophénotypage
 - C. Biologie moléculaire
 - D. Analyse lipidomique
- 4. Résultats**
 - A. Immunophénotypage
 - B. Biologie moléculaire
 - C. Analyse lipidomique
- 5. Discussion**

Chapitre 3 : Etude de l'influence de l'inflammation dans les formes sévères d'infection à COVID-19

Chapitre 1 : Etude des monocytes dans une population de patients avec diabète de type 2

1. Introduction

Le diabète de type 2 et l'athérosclérose sont associés à une inflammation chronique de bas grade. Les cellules de l'immunité innée, et en particulier le couple Monocyte-Macrophage, font parties des acteurs susceptibles d'influer sur la progression de ces deux situations pathologiques. Il est donc important de caractériser au mieux ces cellules dans le but d'affiner nos connaissances physiopathologiques et d'étudier la possibilité d'en faire des biomarqueurs de risque dans le cadre du diabète et de ses complications micro- et macro-angiopathiques ; les monocytes ont la double capacité de participer aux phénomènes inflammatoires et de se différencier en macrophages, et ils sont faciles à étudier puisqu'accessibles via une simple prise de sang ; ils sont donc les candidats idéaux pour débiter cette caractérisation inflammatoire.

2. Objectif

L'objectif principale de cette étude était d'évaluer les facteurs cliniques et biologiques associés au taux de monocytes dans une population diabétique de type 2 non sélectionnée.

L'objectif secondaire était d'étudier le risque cardiovasculaire dans cette même population, et son association avec les données monocytaires (taux de monocytes, répartition des différents sous-types et modifications transcriptomiques).

3. Méthodes

A. Cohorte Angiosafe2 et sous-cohorte

En parallèle de mon travail de thèse, j'ai participé à la constitution de la cohorte Angiosafe2 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02671864). Cette cohorte a été constituée dans le but d'évaluer l'association entre l'exposition aux agonistes du récepteur au GLP-1 (un traitement injectable du diabète de type 2) et la survenue d'une rétinopathie diabétique. L'article correspondant est présenté en Annexe.

L'étude inclut des patients DT2 (selon les critères de l'ADA) quel que soit leur traitement. Ces patients sont inclus lors d'une visite en hôpital de jour, et phénotypés sur le plan clinique (sexe, âge, date de début du diabète, IMC, tour de taille, traitements, stades des complications macro et microangiopathiques) et sur le plan biologique (glycémie à jeun, Hba1c, bilan rénal, bilan hépatique complet, exploration des anomalies lipidiques, CRPus, BNP, Troponine et fibrinogène). Enfin, dans le cadre de l'hôpital de jour, certains ont bénéficiés de la réalisation d'un score calcique coronaire.

Il y a à ce jour 4800 patients de l'hôpital Lariboisière inclus dans la cohorte. Parmi eux, environ 1000 patients ont eu un score calcique coronaire (dans le cadre du soin courant) le jour de l'inclusion, et plus de 300 d'entre eux ont aussi bénéficié d'un immunophénotypage en cytométrie en flux.

La sous-population participant à l'analyse transcriptomique des monocytes comprend des patients inclus consécutivement en HDJ entre Octobre 2017 et Mars 2018 dans angiosafe2, hommes, et ayant bénéficiés d'un score calcique coronaire ou étant en prévention cardiovasculaire secondaire.

B. Immunophénotypage en cytométrie en flux

Il s'agit d'une expérience réalisée en routine dans le laboratoire, qui permet de renseigner pour chaque patient, la répartition de 16 types ou sous-types de leucocytes. Cette caractérisation est réalisée sur du sang frais total. La première étape est la lyse des globules rouges, puis après un double lavage au PBS, l'incubation des cellules avec un cocktail de 11 anticorps de surface et un marqueur de viabilité, tous associés à un fluorochrome différent. Après deux nouveaux lavages au PBS et une remise en suspension des cellules marquées dans une solution tampon, les échantillons sont passés un par un dans un cytomètre en flux Fortessa® doté de 4 lasers, permettant la détection de 16 couleurs différentes. Pour tous les échantillons, le même nombre de cellules marquées est analysé par le cytomètre. **Tableau 1**

Laser	Longueur d'onde	BP Filter	Antigène ciblé	Fluorochrome
405	685	780/60	CD14	BV786
	630	655/80	CD56	BV650
	595	610/20	CD11c	BV605
	575	585/15		
	475	525/50	Viability	AmCyan
	/	450/50	HLADR	VioBlue
488	655	695/40	CD45	PerCP-Cy5.5
	502	530/30	CD16	FITC
	/	488/10	Size	SSC
561	735	780/60	CD20	PE-Cy7
	685	695/40		
	600	610/20	CD4	ECD
	/	582/15		
640	755	780/60	CD8	APC-Vio770
	690	730/45	CD3	AF700
	/	660/20	CD123	APC

Tableau 1 : Panel d'anticorps marqués par un fluorochrome, utilisé pour l'immunophénotypage.

Le cytomètre fournit ainsi pour chaque cellule, l'intensité qu'il a recueillie pour chacun des fluorochromes, c'est-à-dire le niveau de fixation des anticorps et donc d'expression des antigènes de surface. Une stratégie d'analyse standardisée de l'expression de ces antigènes permet pour chaque cellule de déterminer son type et son sous-type (Par exemple monocyte du sous-groupe non classique) **Tableau 2**. Le logiciel FlowJow® a été utilisé pour cette analyse ; Ces analyses ont été réalisées par Charline Potier sous la direction du Dr Alzaid ; Pour chaque échantillon nous disposons donc du pourcentage de chaque type cellulaire, et puisque le même nombre de cellules est analysé à chaque fois, nous pouvons comparer la répartition de ces types cellulaires entre les différents échantillons.

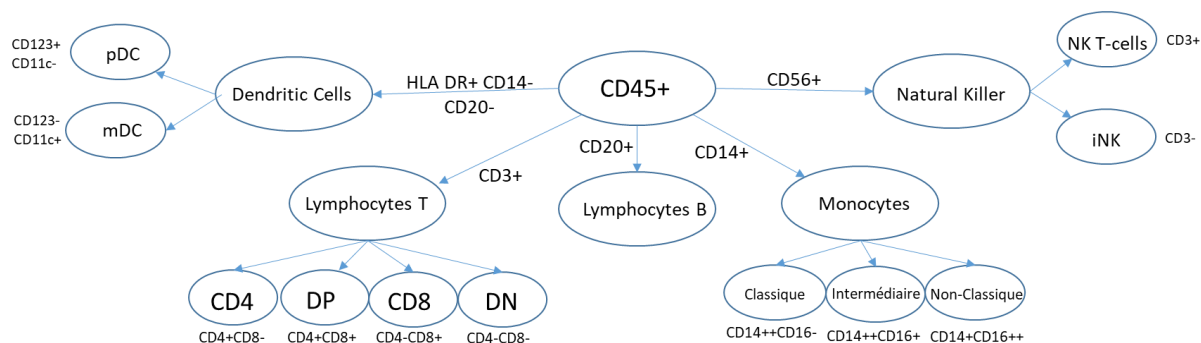


Tableau 2 : Stratégie d'analyse standardisée des données de cytométrie en flux. DP= double positif, DN=double négatif. iNK =inante Natural Killer.

C. Analyse transcriptomique

L'analyse transcriptomique se déroule en quatre parties.

- L'immunosélection des monocytes via des billes magnétiques CD14+.
La méthode d'immunosélection est explicitée en détails en ANNEXE dans le **chapitre *Isolation and Analysis of Human Monocytes and Adipose Tissue Macrophages***.
- L'extraction de l'ARN cellulaire, réalisée en suivant le protocole des kit QIAGEN® RNAmi plus.
 - o La quantité d'ARN extrait est ensuite mesurée le système QUBIT ; pour réaliser un séquençage ARN, la plateforme de séquençage exige, au vue de son protocole, au minimum 50ng d'ARN.
 - o La qualité de l'ARN extrait est évaluée par le système BioAnalyzer®, un index d'intégrité de l'ARN supérieur ou égal à 7/10 est demandé par la plateforme de séquençage pour obtenir des résultats fiables.
- Le séquençage de l'ARN par une plateforme de génomique. Ici celle de l'ENS paris.
- Le traitement Bio-informatique des données, réalisé par le Dr Mano Matthews, afin de réaliser l'analyse différentielle du transcriptome de ces monocytes, en fonction du risque cardiovasculaire.

Celui-ci a été déterminé en fonction du résultat du Score calcique coronaire :

- SCC=0 : Risque de survenue d'un événement cardiovasculaire nul,
- SCC<100 : Risque de survenue d'un événement cardiovasculaire faible,
- SCC 100-400 : Risque de survenue d'un événement cardiovasculaire modéré,
- SCC >400 : Risque de survenue d'un événement cardiovasculaire élevé.

D. Analyses statistiques

Les associations entre le compte monocyttaire et les caractéristiques basales des patients ont été étudiées via la réalisation de tests de corrélation de Spearman pour les variables continues.

Le score calcique coronaire a été considéré comme une variable continue, sauf dans la partie transcriptomique.

Pour les variables dichotomiques, des comparaisons des moyennes des taux de monocyte entre les deux conditions ont été réalisés via un test de Mann Withney Wilcoxon.

Les corrélations entre le SCC et les variables continues ont été évaluées par test de corrélation de Spearman. Des analyses de covariance (ANCOVA) ont été réalisées pour évaluer l'indépendance des associations retrouvées dans les analyses univariées.

Les tests de Spearman et l'ANCOVA ont été réalisées sur le logiciel SAS.

Un $p < 0,05$ a été retenu comme étant significatif.

4. Résultats

A. Description de la population totale

Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients sont présentées dans les **tableaux 3 et 4**. Cette population présente un âge moyen de 62 ans, une durée moyenne d'évolution du diabète de 14.3 ans, un IMC moyen de 29kg/m² et une HbA1c moyenne de 7.7%. On notera aussi que les moyennes des marqueurs de l'inflammation (leucocytes, monocytes et CRP) sont dans les valeurs normales, avec des déviations standards faibles, témoignant de l'absence d'événement inflammatoire ou infectieux aigu chez ces patients.

n=340	Moyenne	DS
Age (ans)	62,0	9,8
Durée du Diabète (années)	14,3	9,6
Hba1c (%)	7,7	1,3
Poids (en kg)	83,0	17,6
Taille (en cm)	168,2	9,8
IMC (kg/m ²)	29,3	5,7
Tour de taille (cm)	102,1	12,8
PA Syst (mmHg)	128,8	14,8
PA Diast (mmHg)	67,3	10,0
FC (bpm)	77,9	8,5
Score calcique Coronaire	267,6	696,6
Leucocytes	7,1	2,7
Monocytes (x10 ⁹)	0,5	0,4
Cholestérol total (g/L)	1,8	0,4
HDL (g/L)	0,5	0,1
LDL (g/L)	1,1	0,3
Triglycérides (g/L)	1,3	0,8
Acide urique (micromol/l)	339,8	99,1
Troponine US (ng/ml)	4,0	5,4
BNP (ng/l)	26,2	35,6
CRP US (mg/l)	3,6	5,0
Fibrinogène (ng/l)	3,6	1,0
Créatinémie (µmol/l)	76,8	32,1
Albuminurie/Créatinurie (mg/mmol)	15,3	53,7
DFG patient (MDRD)	87,8	27,8
DFG patient (CKD épi)	85,7	20,6

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques et biologiques des 340 patients issus de la cohorte Angiosafe2 et considérés dans l'analyse ancillaire – Variables continues

	n	%
Sexe (n=340)		
<i>Masculin</i>	177	52%
Tabagisme (n=330)		
<i>Jamais</i>	198	60%
<i>Sevré</i>	96	29%
<i>Actif</i>	36	11%
Traitements (n=340)		
<i>Biguanides</i>	265	78%
<i>SU-Glinide</i>	160	47%
<i>Inhibiteur DPP4</i>	106	31%
<i>Analogues GLPI</i>	78	23%
<i>inhibiteur SGLT2</i>	1	0%
<i>Hypolipémiants</i>	165	49%
<i>Antihypertenseur</i>	190	56%
<i>Antiagrégants</i>	103	30%
<i>Insuline</i>	124	36%
Synthèse ophtalmologique (n=317)		
<i>Pas de RD</i>	197	62%
<i>RDNP minime</i>	61	19%
<i>RDNP Modérée</i>	29	9%
<i>RDNP Sévère</i>	10	3%
<i>RDP / PPR</i>	20	6%
Synthèse néphrologique (n=288)		
<i>Pas de néphropathie</i>	176	61%
<i>Néphropathie incipiens</i>	78	27%
<i>Néphropathie avec protéinurie</i>	9	3%
<i>Néphropathie avec IRC</i>	25	9%
Grading Podologique (n=244)		
<i>0</i>	194	87%
<i>1</i>	20	9%
<i>2</i>	7	3%
<i>3</i>	3	1%

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et biologiques des 340 patients issus de la cohorte Angiosafz2 et considérés dans l'analyse ancillaire – Variables catégorielles

B. Evaluation des facteurs cliniques et biologiques associés au taux de monocytes dans une population diabétique de type 2 non sélectionnée.

Le compte des monocytes n'est pas associé à la durée du diabète, l'IMC et l'HbA1c (p respectivement à 0,63 ; 0,46 et 0,48). Il est inversement corrélé avec le cholestérol circulant, qu'il soit total, HDLc ou LDLc. En revanche on ne retrouve pas cette association avec les triglycérides. (**Tableau 5**)

Les variables positivement corrélées au compte des monocytes étaient l'âge ($r = 0,13$; $p = 0,01$), la leucocytémie ($r = 0,56$; $p < 0,0001$) et le résultat du score calcique coronaire ($r = 0,12$; $p = 0,12$). (**Tableau 5**)

Comme attendu, les hommes avaient des taux de monocytes significativement plus élevés que les femmes ($p < 0,0001$), tout comme les tabagiques actifs par rapport aux non-fumeurs ($p < 0,0001$). En ce qui concerne les traitements, les patients sous traitements antihypertenseurs et sous traitements antiagrégants plaquettaire avaient plus de monocytes que les non traités ($p = 0,03$ et $0,02$). A l'inverse, aucune différence significative de monocytémie n'a été mise en évidence en fonction du traitement par insuline ou par agonistes du récepteur au GLP-1. (**Figure 1**) Après ajustement, les variables restant significativement associées au compte de monocytes étaient le sexe masculin, l'IMC, le tabagisme et la taux plasmatique de créatinine. (**Tableau 6**)

Spearman Monocytes		
Age (ans)	r	0,13
	p	0,01
	n	348
Durée du diabète (ans)	r	0,03
	p	0,63
	n	348
Hba1c (%)	r	-0,04
	p	0,48
	n	344
IMC (kg/m²)	r	0,04
	p	0,46
	n	346
CRP us (mg/l)	r	0,03
	p	0,63
	n	220
Leucocytes (x10⁹)	r	0,56
	p	<,0001
	n	348
Troponine Hs (ng/ml)	r	0,002
	p	0,97
	n	322
Fibrinogène (ng/l)	r	0,11
	p	0,07
	n	245
BNP (ngL)	r	-0,07
	p	0,24
	n	325
Cholestérol Total (g/l)	r	-0,14
	p	0,01
	n	337
LDLc (g/l)	r	-0,13
	p	0,02
	n	331
HDLc (g/l)	r	-0,14
	p	0,01
	n	338
Triglycérides (g/l)	r	0,06
	p	0,28
	n	338
Créatininémie (μmol/)	r	0,09
	p	0,12
	n	333
DFG MDRD (ml/min)	r	0,02
	p	0,69
	n	318
Score Calcique Coronaire	r	0,12
	p	0,02
	n	348

Tableau 5 : Etude de la corrélation entre le taux de monocytes et 16 variables continues clinico-biologiques, via un test de Spearman , dans la population des 340 patients issus de la cohorte AngioSafe 2

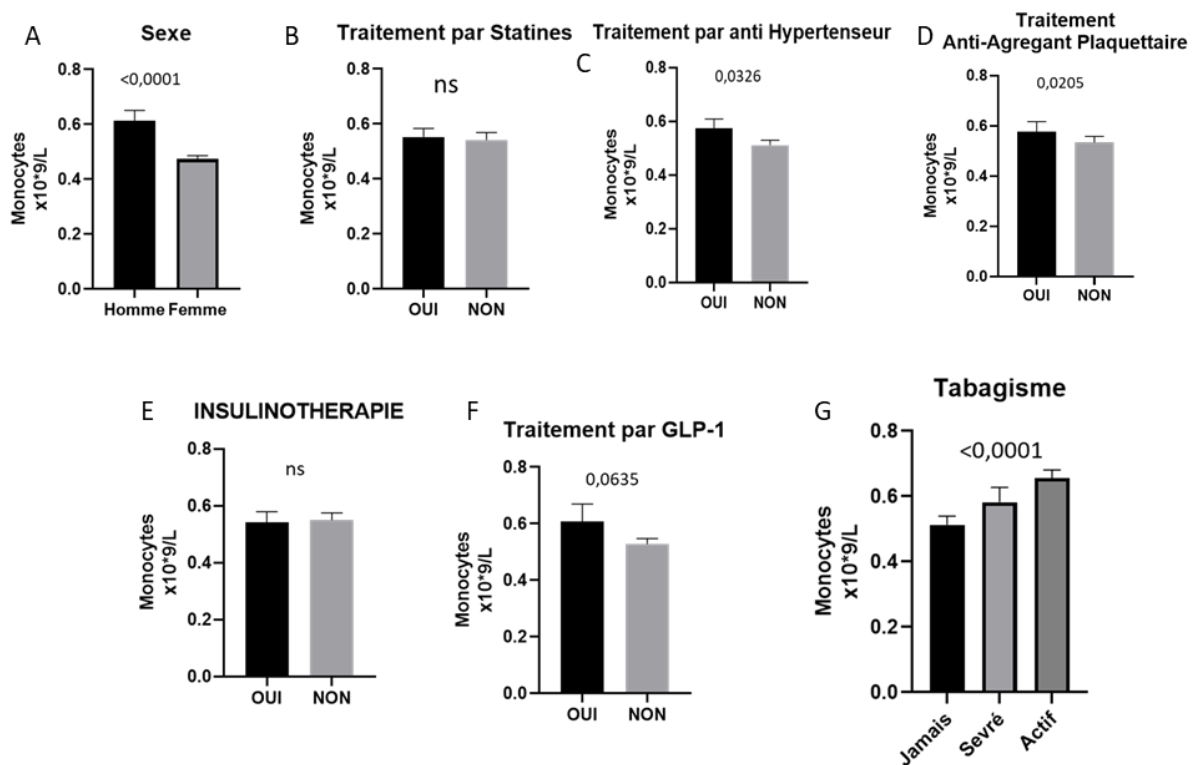


Figure 1 : Comparaisons des moyennes des taux de monocyte entre (A) hommes et femmes, (B) Traitement par statine ou non, (C) Traitement anti-hypertenseur ou non, (D) Traitement antiagrégant ou non, (E) Insulinothérapie ou non, (F) Traitement par analogues du GLP-1 ou non, via un test de Mann Withney Wilcoxon ; et (F) entre les non tabagiques, tabagiques sevrés et tabagiques actifs via une ANOVA. Le tout dans la population des 340 patients issus de la cohorte AngioSafe 2.

Monocytes	Valeur estimée			
	du point	IC95%		p
Sexe Masculin	3.098	1.895	5.065	<.0001
Age (ans)	0.980	0.958	1.003	0.2706
Durée du diabète (années)	0.999	0.976	1.023	0.9415
IMC (kg/m²)	0.958	0.922	0.996	0.0285
Hba1c (%)	1.067	0.906	1.256	0.4375
Tabagisme Actif	5.974	2.901	12.301	0.0006
Tabagisme Sevré	6.283	2.964	13.318	0.0005
Traitement par Statines	0.837	0.535	1.308	0.4350
Traitement par Anti-Agregant	1.625	0.995	2.653	0.0522
Traitement par Anti-HTA	1.413	0.857	2.330	0.1754
Score Calcique coronaire	1.000	1.000	1.000	0.3601
Creatininémie	1.007	1.000	1.014	0.0072

Tableau 6 : Analyse de covariance des variables associées au taux de monocytes sanguins, dans la population des 340 patients issus de la cohorte AngioSafe 2.

C. Evaluation du risque cardiovasculaire dans cette même population, et son association avec les données monocytaires

Les résultats des tests de corrélation du score calcique coronaire avec les différentes variables cliniques et biologiques sont résumés dans le **Tableau 7**.

Score calcique	r	p	n
Age (ans)	0,4071	<0,0001	350
Durée du Diabète (ans)	0,2754	<0,0001	350
Hba1c (%)	-0,03239	0,5482	346
Poids (en kg)	-0,04917	0,3604	348
IMC (kg/m ²)	-0,1417	0,0081	348
Tour de taille (cm)	0,03294	0,5927	266
Leucocytes (x10 ⁹)	0,05654	0,2929	348
Monocytes (x10 ⁹)	0,1234	0,0213	348
Cholestérol total (g/L)	-0,1419	0,0089	339
HDL (g/L)	-0,07264	0,1814	340
LDL (g/L)	-0,1429	0,009	333
Triglycerides (g/L)	0,0386	0,4781	340
Acide urique (micromol/l)	0,1931	0,0005	318
Troponine US (ng/ml)	0,1573	0,0045	324
BNP (ng/l)	0,2317	<0,0001	327
CRP US (mg/l)	-0,0396	0,5581	221
Fibrinogènes	0,2001	0,0016	246
Créatinémie (micromol/l)	0,2448	<0,0001	335
Albuminurie/Créaturinurie (mg/mmol)	0,07857	0,4256	105
DFG patient (MDRD)	-0,1535	0,0059	320
DFG patient (CK épi)	-0,2202	0,0003	266

Tableau 7 : Analyse univariée des variables associées au résultat du Score Calcique Coronaire, dans une population de patients issus de la cohorte AngioSafe 2.

Les variables positivement et significativement associées avec le résultat du score calcique coronaire sont l'âge ($r=0.4$, $p<0.0001$), la durée du diabète ($r=0.27$, $p<0.0001$), des biomarqueurs cardiaques (Troponine $r=0.15$ $p=0.0045$ et BNP $r=0.23$ $p<0.0001$) et des biomarqueurs inflammatoires (Monocytes $r=0.12$ $p=0.02$ et Fibrinogène ($r=0.2$ $p=0.0016$)) **Figure 2**.

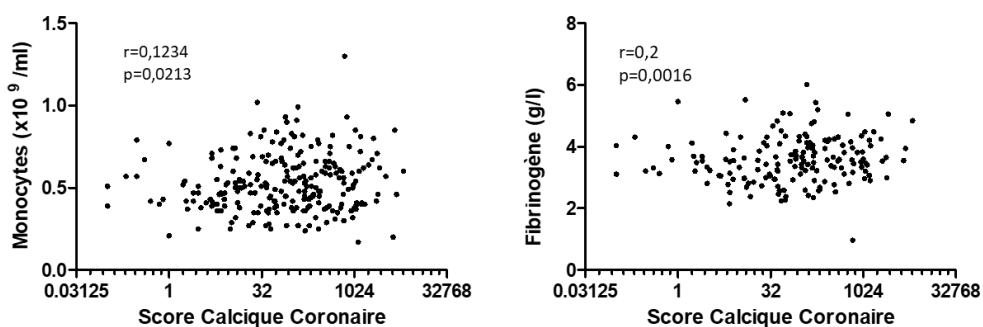


Figure 2 : Corrélation entre le résultat du score calcique coronaire (Echelle des axes en log₂(x) et A. le taux de monocytes sanguins et B. la concentration plasmatique en fibrinogène.

Les variables négativement et significativement associées avec le résultat du score calcique coronaire sont l'IMC ($r = -0.14$, $p = 0.008$), les cholestérols total et LDL ($r = -0.14$, $p = 0.009$ dans les deux cas), et le débit de filtration glomérulaire.

L'association négative entre le LDLc et le score calcique coronaire s'explique probablement par le fait que les patients à CAC élevés sont plus traités par statines (Inhibiteur de L'HMG-coA réductase, utilisé en tant qu'hypolipémiant). Dans l'ANCOVA, il a décidé d'intégrer la prise de statine et non le taux de cholestérol (total ou LDL).

Les variables catégorielles telles que le sexe masculin, le tabagisme et l'hypertension artérielle sont connues pour être des facteurs de risque cardiovasculaire, ce qui a bien été retrouvé ici **Figure 3.**

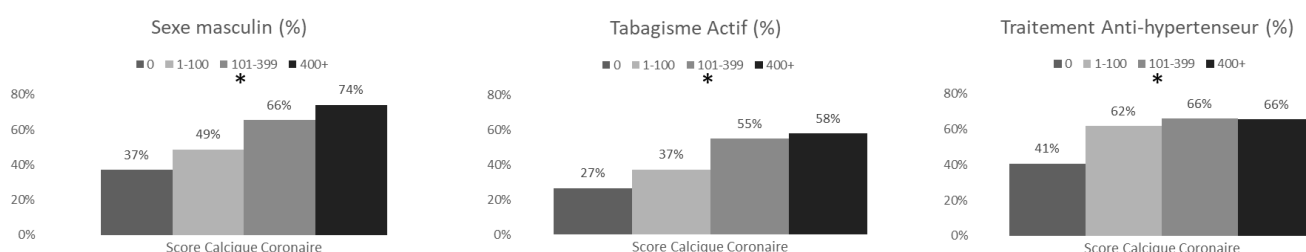


Figure 3 : Pourcentage A. d'hommes, B. de tabagiques actifs, C. de patients sous anti-hypertenseurs en fonction du risque cardiovasculaire défini par le résultat du score calcique coronaire (0= nul ; 1-100=faible ; 101-399=intermédiaire ; 400+ = élevé)

L'indépendance des variables associées au résultat du score calcique coronaire a été testée via la réalisation d'une ANCOVA. (**Tableau 8**)

SCC	Valeur estimée			P
	du point	IC 95%		
Sexe Masculin	2.308	1.385	3.843	0.0013
Age (années)	0.940	0.916	0.966	<.0001
IMC (kg/m ²)	1.011	0.971	1.052	0.6020
Durée du diabète (ans)	0.975	0.952	0.999	0.0896
Hba1c (%)	0.970	0.808	1.164	0.6845
Tabagisme actif	1.285	0.621	2.658	0.0896
Tabagisme sévère	0.687	0.325	1.451	0.0635
Traitement par Statines	2.156	1.355	3.430	0.0012
Traitement par AntiAgregant	1.391	0.847	2.285	0.1926
Traitement par AntiHTA	1.377	0.818	2.320	0.2288
Monocytes (x10 ⁹)	0.914	0.540	1.548	0.7389
Creatininémie (µg/ml)	0.999	0.991	1.007	0.8567

Tableau 8 : Analyse de covariance des variables associées au résultat du score calcique coronaire , dans la population une de patients issus de la cohorte AngioSafe 2.

Le sexe masculin et la prise de statine restent positivement associés avec le résultat du score calcique coronaire et donc avec le risque de survenue d'un événement cardiovasculaire. Après

ajustement, l'âge reste associé au résultat du score calcique coronaire, mais négativement, alors que la durée du diabète ou la monocytémie n'y sont plus significativement associées.

Un immunophénotypage en cytométrie en flux a été réalisé chez 229 de ces patients.

Les résultats sont exprimés soit en pourcentages des CD45 totaux (cellules hématopoïétiques nucléées) soit en pourcentages du compte de monocytes totaux. Les associations entre les résultats de ces pourcentages et le résultat du score calcique coronaire ont été testées via un test de spearman. Les résultats sont présentés dans le **tableau 9**.

Correlation avec le SCC, test de spearman	n	r	p
Monocytes classiques (%CD45)	229	0,18	0,007
Monocytes intermédiaires (%CD45)	228	-0,07	0,28
Monocytes non classiques (%CD45)	228	-0,08	0,21
Monocytes classiques (%Monocytes totaux)	226	0,2	0,0026
Monocytes intermédiaires (%Monocytes totaux)	226	-0,12	0,0615
Monocytes non classiques (%Monocytes totaux)	226	-0,14	0,0391

Tableau 9 : Détermination via un test de Spearman des corrélations entre le résultat du Score Calcique Coronaire et les différents sous-types de monocytes, exprimés par rapport au nombre total de cellules CD45+ puis au nombre de total de monocytes.

Le pourcentage de monocytes classiques, qu'il soit rapporté à toutes les cellules CD45+ ou juste aux monocytes totaux, est positivement corrélé avec le résultat du score calcique coronaire. En revanche notre analyse ne montre pas de corrélation significative entre le pourcentage de monocytes intermédiaires et le résultat du score calcique coronaire. Le pourcentage de monocytes non-classiques parmi les cellules CD45+ n'est pas corrélé au résultat du score calcique coronaire ; il existe une corrélation négative du pourcentage de monocytes non classiques parmi les monocytes totaux, en miroir par rapport au pourcentage de monocytes classiques.

D. Description de la sous-population utilisée pour l'analyse transcriptomique

86 patients ont été inclus dans cette sous-population, leurs caractéristiques cliniques sont décrites dans le **tableau 10**. On notera les différences d'âge, de durée du diabète et de Monocytémie entre les 5 groupes.

	0	1-100	101-400	>400	Prev2r	p (ANOVA)
n	20	29	20	10	7	
Age (ans)	53,72+/-2,0	62,15+/-1,4	66,7+/-1,6	67,3+/-2,36	70,9 +/-3,42	<0,0001
Durée (années)	10,6+/-1,6	13,93+/-2,19	17,8+/-1,97	20,3+/-3,75	17,86+/-3	0,024
HbA1c (%)	8+/-0,4	7,96+/-0,28	7,62+/-0,23	7,72+/-0,14	8,0+/-0,6	0,98
IMC (Kg/m ²)	28,9+/-1	27,84+/-0,7	27,37+/-1	30,78+/-1,9	28,05+/-1,5	0,35
LDLc	1,07+/-0,08	1,05+/-0,05	0,91+/-0,09	0,89+/-0,2	1,08+/-0,08	0,14
A/C (mg/mmol)	18,6+/-16,8	2,18+/-0,83	11,8+/-6,8	33,22+/-19,8	5,62+/-2,1	0,35
Insulinothérapie	44%+/-10	44%+/-10	40%+/-11	40%+/-16	57%+/-20	0,17
Monocytes (x10 ⁹ /ml)	0,48 +/-0,03	0,54+/-0,03	0,56+/-0,04	0,66+/-0,09	0,71+/-0,05	0,02

Tableau 10 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients de la cohorte CRC

E. Résultats de l'analyse transcriptomique

Un premier lot de 28 échantillons a d'abord été séquencé, puis un deuxième de 46 patients. En raison des améliorations apportées fin 2017 aux protocoles d'immuno-sélection et d'extraction d'ARN, les 2 sets sont trop différents en terme de qualité et de nombre de gènes détectés (8198 vs 12404) pour pouvoir être analysés conjointement (**Figure 4**). Pour 12 patients, la qualité de l'ARN n'a pas permis de réaliser l'analyse.

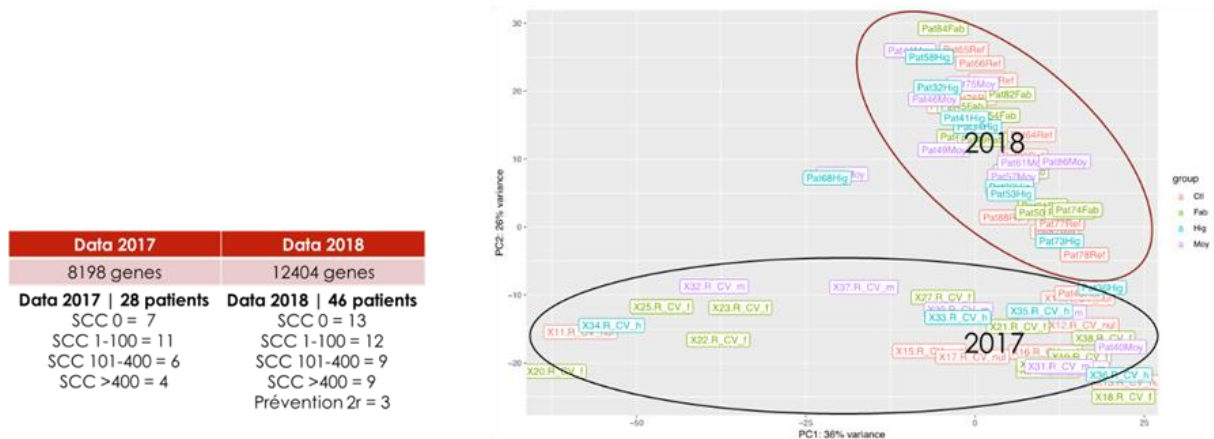


Figure 4 : Description des 2 sets de RNAseq et de leur clusterisation

Les 2 analyses se sont donc faites séparément, avec pour objectif d'identifier in fine les pathways communs.

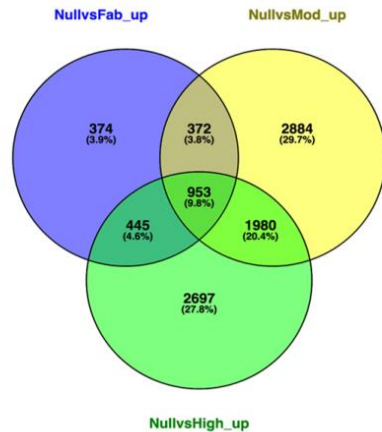
Je ne présenterai ici que les résultats du 2^e set (2018), qui incluait 46 patients et dont le séquençage a permis de détecter le plus de gènes. Nous avons d'abord réalisé une analyse de l'expression différentielle des gènes entre le groupe référence SCC=0 et chacun des autres groupes de risque cardio-vasculaire, les nombres de gènes sur et sous exprimés sont présentés dans le **Tableaux 11**

Data 2018	SCC=0 vs SCC 1-100	Data 2018	SCC=0 vs SCC 101-400	Data 2018	SCC=0 vs SCC>400
Number of Transcripts	13165	Number of Transcripts	20435	Number of Transcripts	25345
Number of Genes	3956	Number of Genes	6732	Number of Genes	7949
Upregulated Transcripts	7100	Upregulated Transcripts	18746	Upregulated Transcripts	18446
Upregulated Genes	2144	Upregulated Genes	6189	Upregulated Genes	6075
Downregulated Transcripts	6065	Downregulated Transcripts	1689	Downregulated Transcripts	6899
Downregulated Genes	1865	Downregulated Genes	562	Downregulated Genes	2043

Tableau 11 : Descriptions des gènes différentiellement exprimés dans les monocytes des 2 groupes de risque cardiovasculaire (A) SCC=0 vs SCC 1-100, (B) SCC=0 vs SCC 101-400 et (C) SCC=0 vs SCC>400

Ces analyses ont notamment permis de constater que les monocytes des patients SCC=0 et SCC>400 expriment différentiellement des gènes impliqués dans les complications du diabète (Produits de glycation avancée), l'entrée du cholestérol dans les cellules (ABC transporter) ou encore l'entrée des monocytes dans la plaque. Ces données sont donc en accord avec notre hypothèse d'un rôle des monocytes dans la pathogenèse de l'athérosclérose.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux 953 gènes retrouvés surexprimés à la fois dans les monocytes des patients à faible, à moyen et à haut risque versus les monocytes des patients à risque nul. (**Figure 5**)



Reactome	P-value
Chromatin modifying enzymes	0.00003031
Chromatin organization	0.00003031
Generic Transcription Pathway	0.0001719

GO Biological Process	P-value
DNA methylation	0.0001831
DNA methylation or demethylation	0.0000906

Figure 5 Gènes et pathways surexprimés communs aux 3 analyses différentielles SCC=0 vs 1-100, 101-400 ou >400

L'étude des pathways surexprimés dès le passage du risque nul au risque faible, et restant surexprimés au cours de la progression du risque cardiovasculaire montre une augmentation des enzymes modifiant la chromatine, des gènes régissant l'organisation de la chromatine ainsi que de ceux impliqués dans les modifications de méthylation de l'ADN. Ces données corroborent l'impact des modifications épigénétiques au niveau des monocytes circulants dans la progression de l'athérosclérose.

Enfin, l'étude des corrélations entre le score calcique coronaire et la présence de transcrits de gènes, préalablement ciblés, associés à l'inflammation (IL-6, CD16) ou à des modifications épigénétiques (KDM6B) a permis de vérifier qu'il existe bien des modifications à ces niveaux (Figure 6).

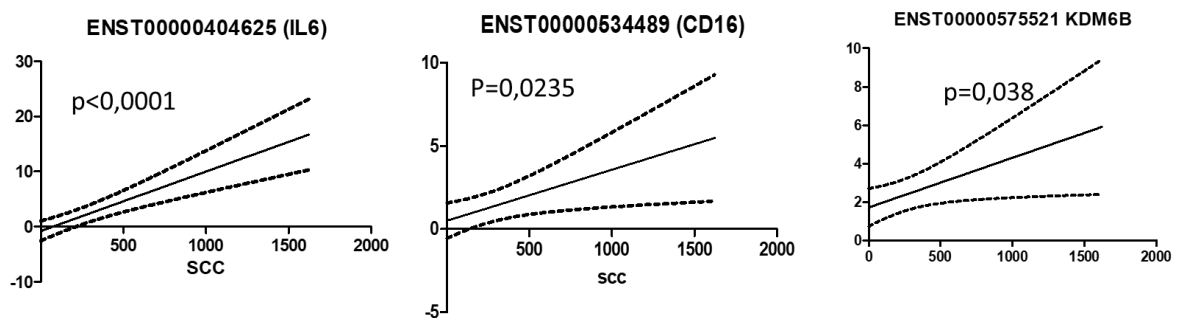


Figure 6 Courbes de corrélation (avec IC 95% et p value) de l'expression de transcrits d'IL-6 (A), de CD16 (B) ou de KDM6B(C) en fonction du SCC dans les monocytes des patients

KDM6B est une histone déméthylase spécifique de la marque H3K27me3, c'est-à-dire de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3. Cette marque est connue pour être répressive sur le plan transcriptionnel ; le passage à la forme H3K27me2, catalysé par KDM6B, permet donc le levé de la répression. Dans le laboratoire, nous nous intéressons au rôle que KDM6B peut jouer au niveau monocytaire dans la dérégulation de l'inflammation associée au diabète de type 2 et à l'athérosclérose.

5. Discussion

Les monocytes sont des cellules de l'immunité dont la fonction est de réagir à toute rencontre dangereuse pour l'organisme. Ce rôle implique une très grande variabilité dans le nombre et les compétences des monocytes circulants. Si au stade aigu physiologique ces caractéristiques sont les conséquences de la rencontre avec l'agression, l'état inflammatoire chronique pathologique pourrait, à l'inverse, être lui-même la conséquence des modifications aberrantes chroniques du nombre et de l'état d'activation des monocytes.

La caractérisation des monocytes dans les différentes pathologies aiguës ou chroniques dans lesquelles ils sont impliqués permet de mieux appréhender la physiologie ou la physiopathologie de ces états, et donc potentiellement de développer des nouvelles thérapeutiques ou même des nouveaux scores de gravité.

Notre population regroupe des patients dont le bilan étiologique du diabète n'a retrouvé ni auto-immunité, ni histoire familiale ou clinique évocatrice de MODY ou de cause secondaire. Ils ont donc été rangés dans le groupe du diabète de type 2, indépendamment de l'âge au diagnostic, de l'IMC, de la persistance d'une insulino-sécrétion ou du délai de survenue des complications du diabète. Nos résultats sont donc à analyser en gardant en tête les hypothèses où ce groupe inclurait des patients avec des diabètes ayant des physiopathologies différentes, et où seules certaines de ces étiologies seraient en lien avec une inflammation chronique dérégulée de bas grade. Néanmoins les recommandations internationales de classification du diabète, et de prise en charge des différents diabètes considèrent toujours le diabète de type 2 dans sa globalité hétérogène, et la littérature du diabète non auto-immun se base sur cette classification. Décrire la place et les associations des monocytes dans cette population répond donc toujours à une problématique actuelle. De plus, décrire le comportement global des monocytes dans cette population pourrait permettre ultérieurement d'identifier au sein de cette population des groupes de patients dont les monocytes se comportent différemment, aidant à délimiter des nouveaux sous-groupes de patients diabétiques de type 2.

Dans notre population globale de sujets présentant un diabète de type 2, le taux de monocytes circulants totaux est associé après ajustement,

- Au sexe, avec un taux supérieur chez les hommes par rapport aux femmes. Ce résultat est similaire à ceux de la population générale (68–70). Il semblerait par ailleurs que le sexe entraîne des différences dans l'activation des monocytes (184-185), ce que nous voulons vérifier ultérieurement, dans le sous-groupe de patients de la cohorte angiosafe 2 ayant bénéficié d'un immunophénotypage.
- A l'indice de masse corporelle. Les deux explications, non exclusives, de cette relation sont l'augmentation du volume de distribution et la mise en place d'une inflammation chronique de bas grade au cours de l'obésité (186). L'obésité modifie aussi la répartition des différents sous types de monocytes, en augmentant les intermédiaires et non classiques (186).

- Au tabagisme qu'il soit actif ou sevré. Ces relations sont connues, tout comme le phénotype plus inflammatoire des monocytes chez les fumeurs (187-190). Ces modifications pourraient d'ailleurs participer au sur-risque cardiovasculaire constaté chez les fumeurs.
- À la créatininémie. L'élévation de la créatininémie témoigne d'une diminution du débit de filtration glomérulaire. Cette diminution entraîne l'accumulation de toxines urémiques et la diminution de l'excrétion de cytokines, responsables d'un état inflammatoire chronique et de l'augmentation du taux de monocytes que nous avons constaté (191– 192).

A l'inverse nous n'avons pas retrouvé, après ajustement, de corrélation entre l'âge et le compte des monocytes circulants. Ce résultat est cohérent avec la littérature (70–72). En revanche, ces monocytes sont, d'après la littérature, plus activés (103 ;193)

Les déterminants connus du taux de monocytes dans la population générale sont donc bien retrouvés dans notre population de diabétiques de type 2.

Afin d'étudier la relation entre l'hyperglycémie chronique et les monocytes (compte et répartition des sous-types), il est donc important d'apparier les patients hyperglycémiques ou non sur leur sexe, leur âge, leur IMC, leur statut tabagique et leur fonction rénale. Ou au moins d'ajuster les analyses d'associations sur ces variables. Le **chapitre 2** traite de cette problématique.

Afin de tester l'hypothèse de l'existence de plusieurs grands profils monocytaires types parmi les patients diabétiques de type 2, définissant plusieurs sous-groupes ayant des physiopathologies et/ou des risques de complications différents, une analyse intégrative bio-informatique de toutes nos données est en cours de réalisation.

Sur le plan du risque cardiovasculaire, notre description des résultats du score calcique coronaire dans une population de patients diabétiques de type 2 non sélectionnés, montre les corrélations attendues entre risque d'événement cardiovasculaire et genre, âge, tabagisme et traitement par statines (194)

De même la corrélation positive entre le taux de monocytes et l'athérosclérose, évaluée par le score calcique coronaire, est compatible avec la physiopathologie de l'athérosclérose vue précédemment, et avec la littérature (195-196).

Cette cohorte semble donc être valide pour étudier les associations entre les différents sous-types de monocytes et le risque cardiovasculaire.

Le principal résultat de cette étude d'association est la corrélation positive entre le pourcentage de monocytes classiques parmi les cellules CD45+ et le score calcique coronaire.

Il n'existe pas d'autres données dans la littérature concernant le rôle des sous types de monocytes dans l'estimation du risque cardiovasculaire via la réalisation d'un score calcique coronaire, a fortiori dans une population de patients diabétiques de type 2.

Néanmoins plusieurs parallèles peuvent être réalisés

- Avec d'autres moyens d'évaluer le risque d'événement cardiovasculaire. Les deux plus fréquents étant la mesure de l'épaisseur intima-media des carotides, en échographie-doppler, et la comparaison entre sujets en prévention primaire et sujets ayant déjà présenté un événement cardiovasculaire (Infarctus du myocarde, Accident Vasculaire Cérébrale ou Ischémie aigue de jambe).
- Avec d'autres populations ayant une pathologie chronique telle que l'infection à VIH, le lupus, l'IRC terminale nécessitant une prise en charge en dialyse, ou même avec la population générale.

Si théoriquement les monocytes CD16+, considérés comme plus inflammatoires, devraient jouer un plus grand rôle dans la progression de l'athérosclérose que les CD16-, considérés comme favorisant la résolution de l'agression, les connaissances recueillies à ce jour sont plus mitigées.

Dans la population générale, Williams et al ; ont montré une augmentation du pourcentage de MI chez les patients athérosclérotiques (Athérome carotidien ou Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs (AOMI)) par rapport aux sujets sains (197). De même, Schlitt et al. ont montré une association entre l'existence d'une coronaropathie et le pourcentage de monocytes CD16+ (198). Chelombitko et al. ont eux retrouvés un taux de MI deux fois plus importants chez les patients ayant une athérosclérose prouvée par rapport aux contrôles (199). Enfin, toujours dans la population générale, Rogacev et al. montre une corrélation significative et positive entre l'épaisseur intima-media carotidienne et le compte de monocytes CD16+ (200) ; il est toutefois important de préciser que ces associations ne sont plus significatives après ajustement pour l'âge et l'IMC.

Dans des populations avec maladies rénales chroniques (patients insuffisants rénaux chroniques ou patients en dialyse), Rogacev et al. et Heine et al. montrent que les patients subissant un événement cardiovasculaire avaient des plus hauts taux de MI au début du suivi que les patients restant indemnes d'événement à la fin du suivi (201– 202). Ulrich et al. sont moins catégoriques puisqu'ils trouvent chez des patients allogreffés rénaux une association entre IMT et MNC (et pas IM), et chez des patients en dialyse une association entre l'IMT et à la fois les CM et les IM, mais pas les MNC.

A l'inverse, Berg et al. ont trouvé, dans leur cohorte de 700 patients issus de la population générale, une association entre la survenue d'un événement cardiovasculaire et un taux élevé de monocytes classiques au début du suivi (203).

Devant ces disparités, il reste difficile de conclure sur la répartition monocyttaire associée à la progression de l'athérosclérose chez les patients diabétiques. Les populations, les méthodes d'évaluation de l'athérosclérose, les protocoles de détermination des sous-types de monocytes et les ajustements statistiques cliniques et biologiques doivent être uniformisés.

Il faut néanmoins garder en tête que ces sous-types de monocytes forment un continuum, qu'ils ont des fonctions opposées mais complémentaires, et qu'ils sont donc probablement

tous impliqués dans la progression de l'athérosclérose, mais avec un rôle et un poids qui restent à déterminer.

Chapitre 2 : Etude des monocytes dans le modèle du diabète post-gestationnel – Etude Epitherapie

1. Introduction

Nous avons fait l'hypothèse qu'il existait des modifications progressives des monocytes circulants au cours de la progression de la pathogénèse de certains sous-types de diabète non auto-immuns. Parmi ces sous-types, nous avons sélectionné les diabètes survenant après un diabète gestationnel, caractérisés par l'âge jeune de survenue et le surpoids associé.

Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé le phénotype des monocytes circulants de trois groupes de patientes (normo glycémiques, prédiabétiques et diabétiques) via un immuno-phénotypage en cytométrie en flux, et sur les mécanismes moléculaires sous-jacent via une double approche transcriptomique et épigénomique. Devant le rôle des Acides Gras Libres dans la polarisation des cellules mononucléées, et celui des céramides dans l'installation d'une insulino-résistance périphérique, une analyse comparative de la présence de ces trois classes lipidiques au sein des trois groupes de patients a aussi été réalisée.

2. Objectif

L'objectif principal était de caractériser les modifications monocytaires au cours de la progression du diabète, en terme

- De répartition des 3 sous types de monocytes
- De transcription génique

L'objectif secondaire était d'étudier le rôle des lipides sériques dans ces modifications de répartition et de transcription des monocytes.

3. Méthodes

A. Recrutement des sujets

Devant la difficulté de débiter une étude longitudinale nous avons réalisé une étude transversale, Epithérapie, comparant les monocytes de patients normoglycémiques, de patients pré-diabétiques et de patients diabétiques.

Afin de limiter les biais liés au sexe ou à l'âge dans notre comparaison, et pour maximiser nos chances de trouver des patients dans les trois groupes, nous avons choisis de nous focaliser sur des patientes en post-partum d'un diabète gestationnel. Ce sont toutes des femmes, elles ont un âge compris entre 20 et 40 ans, et la réalisation d'une HGPO 75g s'inscrit dans les recommandations de prise en charge de ces femmes. C'est par ailleurs un modèle de diabète associé à une insulino-résistance majeure, dans lequel l'inflammation et les monocytes pourraient donc avoir un rôle à jouer.

Pour rappel, l'HGPO 75g consiste en un dosage de la glycémie veineuse à jeun, suivi de l'absorption orale de 75g de glucose, puis d'un dosage de la glycémie veineuse à 1h puis 2h post ingestion de glucose. Une glycémie veineuse à 2h inférieure à 140mg/dl est normale, entre 140 et 200mg/dl on parle de pré-diabète, et au-delà de 200mg/dl de diabète. Par ailleurs elles ont toutes bénéficié du dosage de l'HbA1c, qui est un reflet de la glycémie des 3 derniers mois. Cela a permis de classer les neuf femmes pour lesquelles il n'avait pas été possible d'obtenir de résultat d'HGPO. Une HbA1c inférieure à 5.7% est normale, entre 5.7%

et 6.4 la patiente est classée pré-diabétique, et une HbA1c à 6.5% ou plus signe un diabète. Les facteurs d'exclusion étaient un traitement antidiabétique déjà débuté, un diabète de type 1, un antécédent de maladie inflammatoire chronique et une prise de corticoïdes ou d'autres traitements immuno-modulateurs.

Le recrutement des patientes s'est fait selon deux méthodes complémentaires :

- Une recherche rétrospective, dans la base de donnée du service de diabétologie de l'hôpital Lariboisière, des patientes y ayant été suivies pour un diabète gestationnel et ayant déjà accouché. J'ai proposé par téléphone à ces femmes une consultation diabétologique ainsi que la réalisation d'une HGPO 75g afin de déterminer leurs statuts métaboliques.
- Une recherche prospective, en me programmant systématiquement en consultation post-partum (3 mois) les femmes suivies dans le service pour un diabète gestationnel insulino-traité. Une ordonnance d'HGPO 75g avait été remise et une sensibilisation à l'étude avait été réalisée avant l'accouchement par les professionnels de santé (médecins ou infirmières d'éducation) ayant suivis la patiente durant sa grossesse.

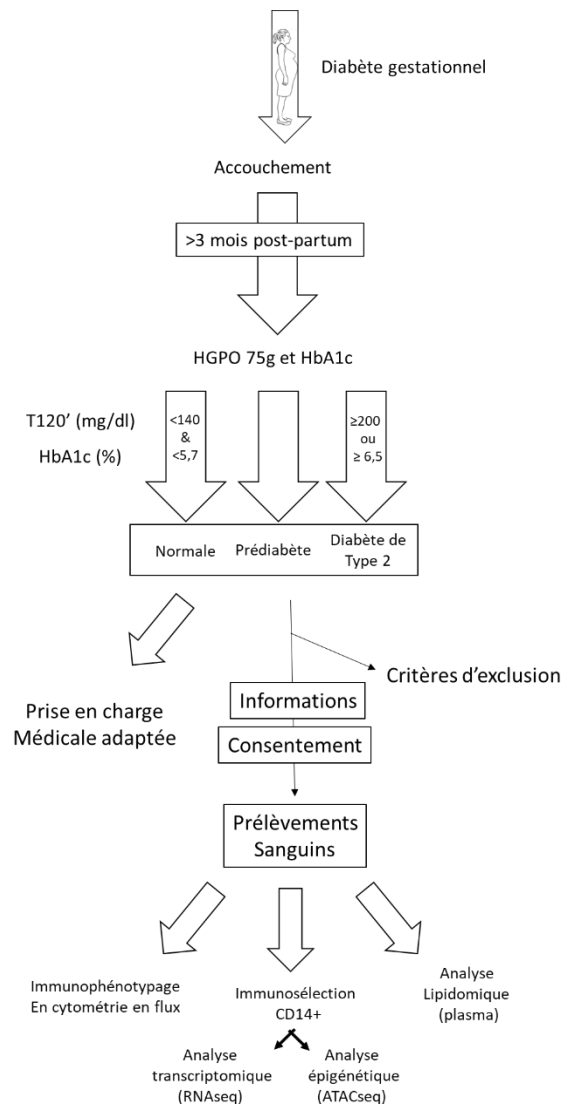


Figure 7: Déroulé de l'étude Epithérapie

La consultation consistait en

- La vérification de l'absence de contre-indication à l'étude.
- La mesure du poids, de la taille et de la pression artérielle.
- Le recueil des données obstétricales
- La détermination du statut glycémique grâce à l'HGPO ou à l'HbA1c
- L'explication du protocole de recherche à la patiente
- En cas d'accord, la signature d'un consentement écrit (Annexe 1) validé par un CPP (Comité de Protection des Personnes) et la CNIL.
- Le prélèvement de 4 tubes EDTA, qui seront envoyés à l'INSERM, pour réalisation des protocoles d'immuno-sélection et d'immuno-phénotypage précédemment décrits.
- L'organisation de la prise en charge ultérieure adéquate (mesures hygiéno-diététiques seules ou associées à un traitement anti-diabétique).

L'ensemble de ces étapes est résumé dans la **figure 7**

B. Immunophénotypage en cytométrie en flux

a) Protocole

Toutes les patientes ont bénéficié du même protocole d'immunophénotypage, décrit dans le **chapitre 1**.

b) Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données d'immunophénotypage ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism V8[®].

Des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées dans l'hypothèse d'une différence de répartition entre les trois groupes. Le seuil de significativité retenu était $p < 0.05$).

C. Analyse biomoléculaire

La deuxième partie de ce projet était d'isoler par immunosélection CD14⁺ les monocytes de ces trois groupes de patientes pour y étudier d'une part les différences de transcriptomes par RNAsequencing et d'autre part l'accessibilité de la chromatine par ATACseq.

La méthode d'immunosélection est explicitée en détails en ANNEXE dans le **chapitre *Isolation and Analysis of Human Monocytes and Adipose Tissue Macrophages***.

Une fois les monocytes immunosélectionnés, l'analyse transcriptomique nécessite l'extraction de l'ARN cellulaire, que nous avons réalisé en suivant le protocole des kit QIAGEN[®] RNAmi plus.

La quantité d'ARN extrait est ensuite mesurée via le système QUBIT ; pour réaliser un séquençage ARN, la plateforme de séquençage exige, au vu de son protocole, au minimum 50ng d'ARN.

La qualité de l'ARN extrait est évaluée par le système BioAnalyzer[®], un index d'intégrité de l'ARN supérieur ou égal à 7/10 est demandé par la plateforme de séquençage pour obtenir des résultats fiables.

D. Analyse Lipidomique

a) Méthodes d'extraction et de quantification des lipides

Le plasma sanguin a été envoyé à l'équipe INSERM UMRS 1136 dirigé par le Dr Le Goff, qui a réalisée l'extraction des lipides selon une méthode *Bligh et Dyer* modifiée, leur quantification par spectrométrie de masse, et enfin l'analyse des données obtenues.

i. Extraction

Les lipides ont été extraits du plasma selon une méthode modifiée de Bligh et Dyer :

- Les plasmas (10µl) ont été complétés par une solution étalon interne
- Les Lipides ont été extraits avec 2,1ml méthanol/CHCl₃ (2:1 v/v), en présence de l'antioxydant BHT et de 550µl HCl 0,01N
- La séparation des phases a été déclenchée par l'ajout de 700µl de CHCl₃ et de 700µl d'eau
- Les lipides extraits ont été séchés puis remis en suspension dans 40µl de solvant LC/MS
- Un plasma témoin a été extrait en parallèle et injecté tous les 10 échantillons pour corriger la dérive du signal

ii. Analyse LC-MS/MS des phospholipides et sphingolipides

- Les lipides ont été quantifiés par LC-ESI/MS/MS à l'aide d'un UFLC Prominence et d'un spectromètre de masse QTrap 4000
- L'échantillon (4µl) a été injecté dans une colonne Kinetex HILIC 2,6µm 2,1x150mm. Les phases mobiles étaient constituées d'eau et d'acétonitrile contenant de l'acétate d'ammonium et de l'acide acétique.
- Les espèces lipidiques ont été détectées à l'aide de la surveillance programmée des réactions multiples (sMRM) en mode ions positifs reflétant le groupe de tête fragmentation de chaque classe lipidique.

b) Analyses bio informatiques des résultats

Une première analyse a été réalisée, étudiant chaque espèce lipidique individuellement, puis une deuxième analyse a été réalisé après regroupement des espèces lipidiques en modules en appliquant une méthode habituellement utilisée pour les analyses transcriptomiques : la Weighted Correlation Network Analysis (WGCNA).

i. Analyse totale

- Un script R développé par l'équipe du Dr Le Goff a été utilisé pour corriger la contribution isotopique sur les signaux MRM des injections HILIC.
 - Les caractéristiques avec plus de 80 % de valeurs manquantes ont été supprimées, les valeurs manquantes des caractéristiques restantes ont été imputées à l'aide d'une approche KNN sur le logiciel open source MetaboAnalyst.
 - Les caractéristiques lipidiques dont les variabilités dépassaient 30% dans le pool QC ont été supprimées.
 - Les données brutes ont été exprimées en nmol/ul comme concentration plasmatique.
- Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour tous les groupes afin de trouver des caractéristiques séparant les trois groupes. Dans toutes ces analyses, une caractéristique est

considérée comme significative lorsque la p-value est inférieure à 0,05 après la correction Benjamini–Hochberg FDR.

- L'analyse s'est concentrée sur les glycérophospholipides et les sphingolipides, car ce sont les deux familles lipidiques les plus connues pour être impliquées dans l'insulinorésistance et la pathogénèse du diabète.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Multi Experiment Viewer (MeV) version 4.9 (<https://sourceforge.net/projects/mevtm4/>)

ii. Analyse WGCNA

La première étape de cette WGCNA, appliquée au lipidome des patientes issues de la cohorte Epithérapie, a été la normalisation des données via une transformation normale inverse basée sur le rang.

Puis le logiciel a étudié les relations entre les concentrations de chaque espèce lipidique de chaque patiente, afin de construire des modules de lipides corrélés entre eux. Cette étape a donné naissance à 6 modules lipidiques, que nous désignerons selon 6 couleurs (bleu, turquoise, vert, marron, jaune et gris). La composition en lipides de chaque module est détaillée en **annexe**.

Pour chaque module lipidique, il a ensuite été testé l'association avec

- Des variables cliniques: Age, poids, IMC, Pression artérielle Systolique, Pression Artérielle Diastolique.
- Des variables biologiques : HbA1c, pourcentage de Monocytes et des différents sous types monocytaires issues de l'immunophénotypage de la partie a)
- Les différents états de tolérance glucidique.

L'ensemble des lipides quantifiés a été considéré dans cette analyse, et non uniquement les glycérophospholipides et les sphingolipides comme dans la première analyse.

4. Résultats

A ce jour 88 femmes ont été recrutées, parmi lesquelles 47 non diabétiques, 23 pré-diabétiques, 17 diabétiques de type 2. Pour une patiente, il n'a été possible d'avoir ni HGPO ni HbA1c, elle a donc été exclue de l'analyse.

Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces femmes sont résumées dans le **tableau 12**

Les femmes des trois groupes ainsi constitués ne sont pas différentes en termes d'âge, d'IMC, de Pression Artérielle systolique ou de poids de naissance du bébé (non ajustés au terme). Par ailleurs aucune d'elles ne fumait ou n'avait de traitement antidiabétique, anti hypertenseur ou antiagrégant au moment du prélèvement et depuis au moins 1 an (en dehors de l'insuline durant la grossesse).

Comme attendu, il y avait une plus grande proportion de femmes insulino-traitées pendant la grossesse dans le groupe diabétique de type 2 en post-partum que dans les autres groupes.

Le délai moyen entre l'accouchement et la consultation était de 365 jours (+/-218) avec un délai minimal de 100 jours et maximale de 1630 jours.

Tableau 12 : caractéristiques cliniques et biologiques des patientes de l'étude Epitherapie

	Normal	Pre-Diabète	Diabète type 2	P
	n=47	n=23	n=17	
âge (années)	34,9 ± 5,2	33,2 ± 8,4	35,3 ± 5,9	0,62
IMC (kg/m ²)	29,9 ± 5,3	29,8 ± 8,3	34,4 ± 5,7	0,28
PA Systolique (mmHg)	115 ± 13,7	120,9 ± 18,3	123,5 ± 18,2	0,26
Poids de naissance (g)	3349 ± 332	3264 ± 256	3454 ± 572	0,44
DG Insulino-traité (%)	50%	64%	100%	0,0004
HbA1c (%)	5,37 ± 1,4	5,89 ± 1,76	7,38 ± 1,14	< 0,0001
T0' (g/l)	0,97 ± 0,24	1,04 ± 0,26	1,43 ± 0,33	< 0,0001
T60' (g/l)	1,21 ± 0,3	1,77 ± 0,48	2,77 ± 0,6	< 0,0001
T120' (g/l)	1 ± 0,19	1,36 ± 0,35	2,51 ± 0,63	< 0,0001

A. Immunophénotypage

a) Analyses statistiques de la répartition de chaque population immunitaire

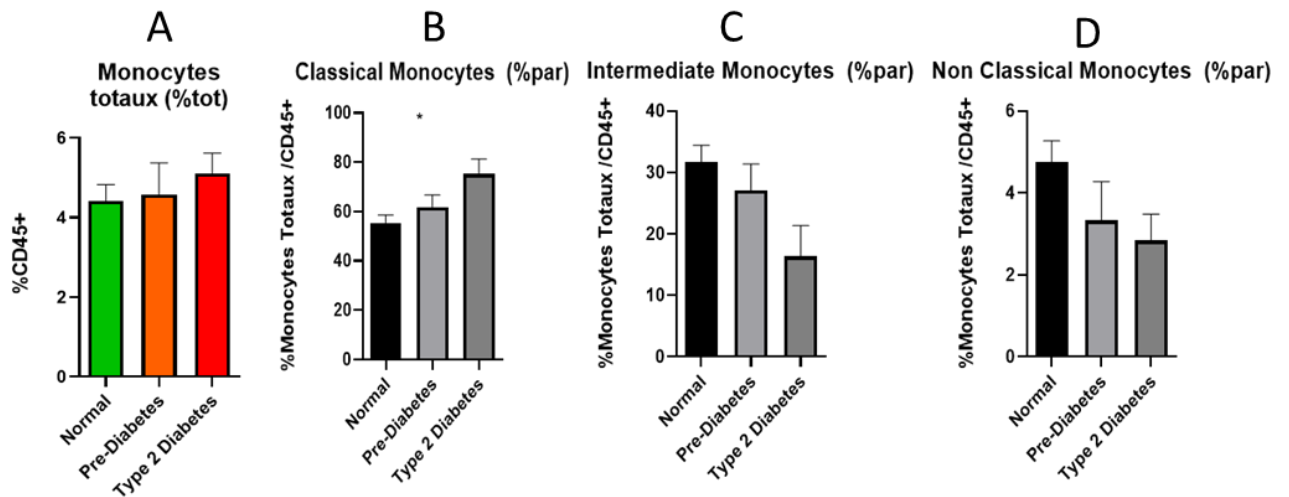
Les analyses de l'immunophénotypage montrent d'abord que le pourcentage de monocytes circulants parmi les cellules CD45+ ne varie pas significativement entre patients normo-glycémiques, prédiabétiques et diabétiques ($p=0,37$) (**Figure 8A**).

Il existe une modification progressive du profil de répartition des monocytes circulants au cours de la pathogénèse du diabète, puisque le pourcentage, parmi les monocytes totaux, de monocytes classiques augmente progressivement entre les patients normo-glycémiques, pré diabétiques et diabétiques ($p =0,0233$) (**Figure 8B**).

A l'inverse les pourcentages, parmi les monocytes totaux, de monocytes intermédiaires (**Figure 8C**) et de monocytes non classiques (**Figure 8D**) ne sont pas significativement différents entre les patients normaux, pré diabétiques et diabétiques (p respectivement égaux à 0,056 et 0,11).

Comme décrit dans la littérature, et quel que soit le groupe de tolérance au glucose, les monocytes classiques étaient le sous-groupe de monocytes principal, suivi des monocytes intermédiaires et enfin des non classiques. L'observation de l'évolution de la répartition des 3 sous-types en fonction du groupe de tolérance au glucose nous montre qu'il existe une augmentation progressive de la part des monocytes classiques, au dépend des monocytes intermédiaires et des monocytes non-classiques. Il est à noter que la somme des pourcentages des trois sous-types de monocytes n'était pas égale à 100%, une explication potentielle était la présence de monocytes immatures. (**Figure 8E**)

Une analyse complémentaire des autres cellules immunitaires circulantes a été réalisée à partir des mêmes échantillons. Il n'a pas été mis en évidence de modification du pourcentage de lymphocytes T ($p=0,21$), de lymphocytes B ($p=0,265$), et des Natural Killer ($p=0,99$) (**Figure 8 F, G et H**) parmi les cellules CD45+.



E

	Classiques (%)	Intermédiaires (%)	Non-classiques (%)	Total (%)
Normal	55,4	31,6	4,8	91,7
PréDiabète	61,5	27,1	3,3	92,0
DT2	75,2	16,3	2,8	94,3

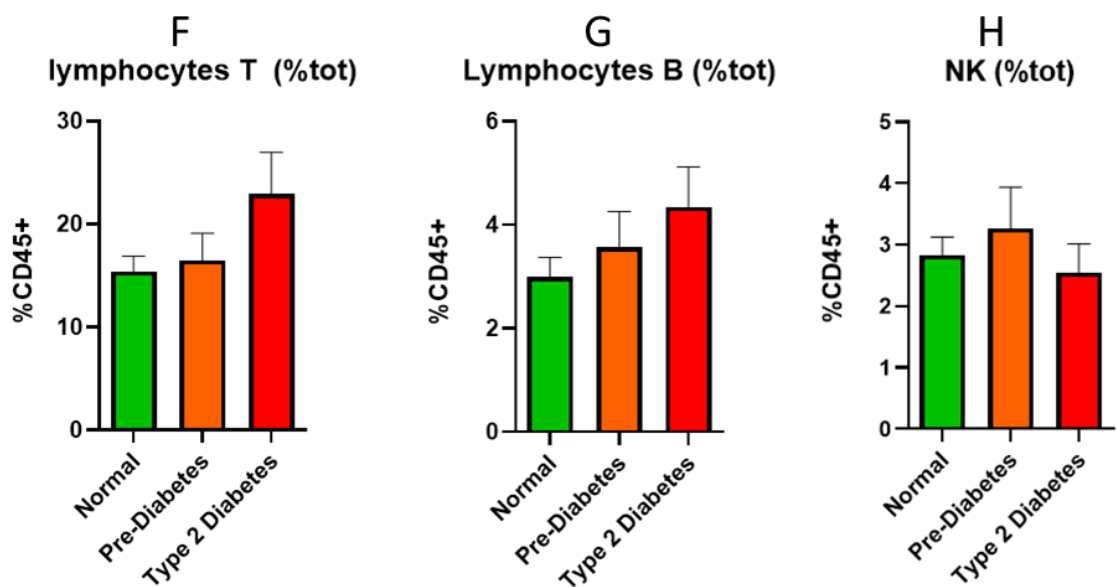
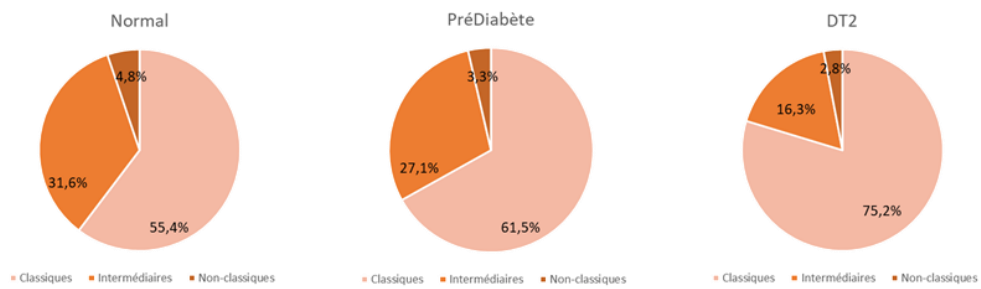


Figure 8 : Analyse de la répartition des différentes populations immunitaires en fonction du statut glycémique.

b) Analyse statistique après clusterisation de la répartition des sous-types de monocytes

Nous avons vu dans l'analyse des données FACS des différents sous-types de monocytes que la répartition de ces trois populations évoluait au cours de la progression vers le diabète. Afin de connaître l'importance de ces différences de répartition, Marc Diedisheim a réalisé la clusterisation après transformation centro-réduite de la répartition des sous-types monocytaires.

Après analyses des données, il a été décidé de séparer 3 clusters (**Figure 9A – Tableau 13**)

- Le cluster 1 correspond à la répartition monocytaire de 41 patientes, 27 normo glycémiques (65.9%), 11 pré diabétiques (26.8%) et 3 diabétiques (7.3%).
- Le cluster 2 comprends les données monocytaires de 9 patientes, dont la répartition entre les différents groupes de tolérance au glucose est comparable au cluster 1 (66,7% de normo glycémiques, 22,2% de pré diabétiques et 11,1% de diabétiques de type 2). Sur le plan monocytaire, les patientes du cluster 2 ont plus de monocytes intermédiaires et non classiques que celles du cluster 1 (**Figure 9B**).
- Le cluster 3 est composé de 13 patientes, avec un plus fort pourcentage de patientes diabétiques que dans les 2 autres clusters (33% de patientes diabétiques). L'HbA1c et la glycémie à jeun moyennes de ce groupe sont supérieures à celles des autres groupes (p=0.017 et p=0.035 respectivement). Elles sont caractérisées par une augmentation des monocytes classiques par rapport aux clusters 1 et 2. (**Figure 9B**)

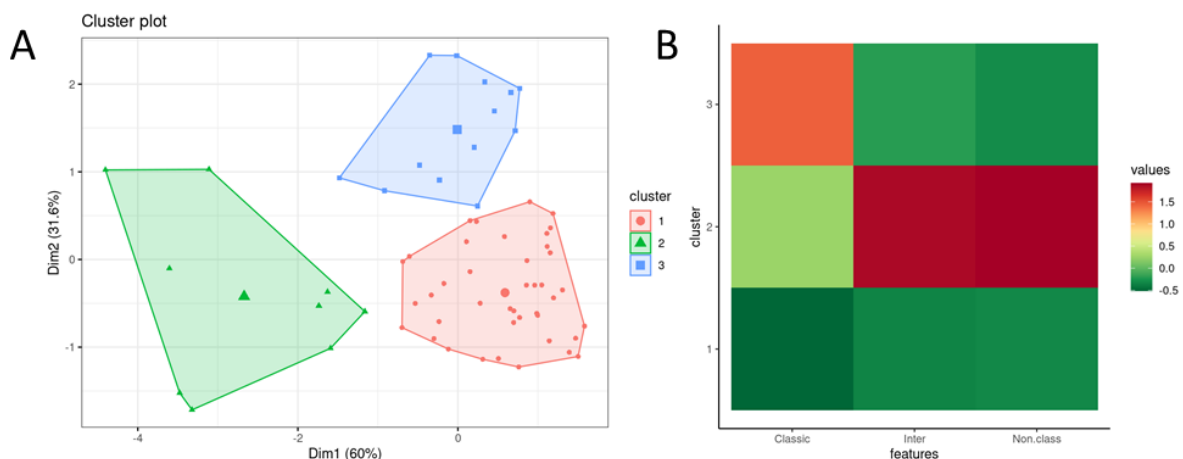


Figure 9 : (A) Représentation des 3 clusters de répartition des sous-types de monocytes ; (B) HeatMap représentant le poids relatif de chaque sous-types de monocytes dans chacun des 3 clusters.

	1 (N=41)	2 (N=9)	3 (N=13)	Total (N=63)	p value
HbA1c (%)	5.55 (5.4, 5.8)	5.50 (5.25, 5.95)	6.35 (5.75, 6.60)	5.6 (5.4, 6.1)	0.017
HGPO (g/l)					
T0	0.98 (0.94, 1.05)	0.99 (0.98, 1.06)	1.1 (1.06, 1.16)	1.01 (0.97, 1.11)	0.035
T30	1.66 (1.33, 1.87)	1.63 (1.39, 2)	1.93 (1.69, 2.63)	1.73 (1.39, 1.99)	0.509
T60	1.33 (1.17, 1.68)	1.58 (1.29, 1.87)	1.59 (1.1, 2.07)	1.33 (1.15, 1.87)	0.885
T120	1.13 (0.91, 1.3)	1.17 (1.10, 1.51)	1.16 (1.03, 1.48)	1.14 (0.97, 1.48)	0.483
Statut.glycémique					0.143
Normal	27 (65.9%)	6 (66.7%)	4 (33.3%)	37 (59.7%)	
PreDiabete	11 (26.8%)	2 (22.2%)	4 (33.3%)	17 (27.4%)	
DT2	3 (7.3%)	1 (11.1%)	4 (33.3%)	8 (12.9%)	
Age (ans)	35.5 (30, 38)	36 (33, 40)	34 (31, 38)	35.5 (31.25, 38.75)	0.672
Poids (kg)	79 (72.8, 90)	65 (64, 80)	84.5 (77.75, 91.25)	79.5 (70.75, 89.25)	0.120
IMC (kg/m²)	30.8 (26.75, 34.05)	25.6 (21.88, 28.85)	31.6 (30.7, 32)	30.55 (26.65, 33.75)	0.163
PA.Systolique (mmHg)	115 (108, 124)	104 (98, 117)	118 (105.5, 121)	114 (104.5, 122.5)	0.163
PA.Diastolique (mmHg)	70 (64.5, 78)	67 (63, 75)	58 (55, 77.5)	70 (61.5, 78)	0.490

Tableau 13 : Caractéristiques cliniques et biologiques des 3 clusters de répartition des 3 sous-types de monocytes

B. Biologie Moléculaire

a) Transcriptomique

Pour les quarante-quatre premières patientes incluses, un trop faible nombre de cellules CD14+ immuno-sélectionnées a compromis la qualité des ARN, ne permettant pas un séquençage satisfaisant. Après amélioration du protocole, nous avons obtenu des quantités et des index d'intégrité de l'ARN satisfaisant.

A ce jour, nous disposons d'ARN exploitables pour 18 patientes normoglycémiques, 18 patientes prédiabétiques et seulement 8 diabétiques de type 2 (**Figure 10**). La décision a été prise de poursuivre le recrutement afin d'augmenter le nombre de patientes diabétiques. Afin d'éviter tout biais relatif à la réalisation de séquençages multiples, tous les échantillons seront envoyés à séquencer en même temps.

Les analyses bio-informatiques des données brutes de séquençage seront faites par les bio-informaticiens de l'équipe les Dr Claire Vandiedonck (PhD) et Marc Diedisheim (MD PhD).

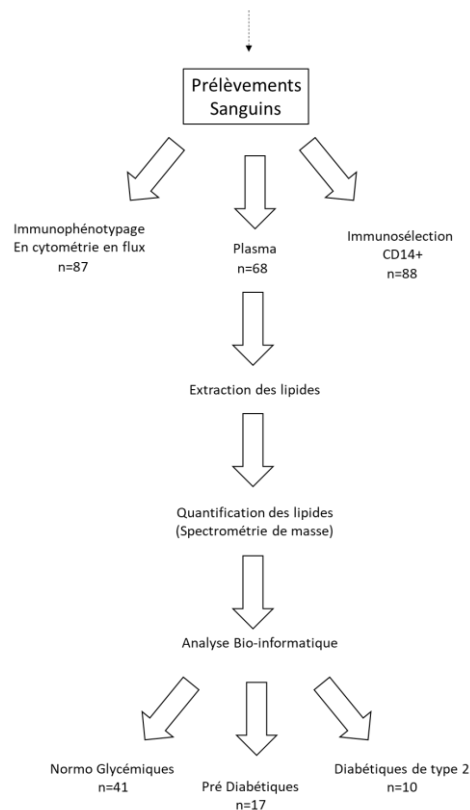


Figure 10 : Etat d'avancement de la partie transcriptomique de l'étude épithérapie

b) Epigénétique

Il est bien connu que la transcription des gènes nécessite que la machinerie moléculaire puisse accéder aux régions amplificatrices, initiatrices et codantes de l'ADN. L'un des mécanismes de régulation de cette accessibilité est le degré de condensation de la chromatine. Cette condensation peut facilement être évaluée via la technique de cartographie des sites d'accessibilité de la chromatine (ATACseq).

L'ARN des monocytes de 28 patientes (14 normo glycémiques, 10 prédiabétiques et 2 diabétiques de type 2) a déjà été préparé puis envoyé à séquencer par Elena Carcarino (PhD), le séquençage a été réalisé à l'institut Karolinska, et Claire Vandiedonck (PhD) a débuté l'analyse des données. Il faut néanmoins encore augmenter le nombre d'échantillons analysés, principalement dans le groupe DT2, avant de pouvoir fournir des résultats.

C. Lipidomique

La troisième et dernière partie de ce projet était de réaliser l'analyse lipidomique comparative des patientes normoglycémiques, prédiabétiques et diabétiques de type 2. **(Figure7)**

Le rationnel de cette analyse tient au fait que, comme présenté dans l'introduction, les lipides jouent un rôle dans la polarisation des monocytes, et que des changements de lipidomes dans les trois différentes conditions pourraient être corrélés avec l'activation ou la répression de voies intracellulaires constatées en analyse biomoléculaire.

L'analyse initiale a porté sur le plasma de 68 femmes, dont 41 normo glycémiques, 17 prédiabétiques et 10 diabétiques de type 2 **(Figure 11)**.

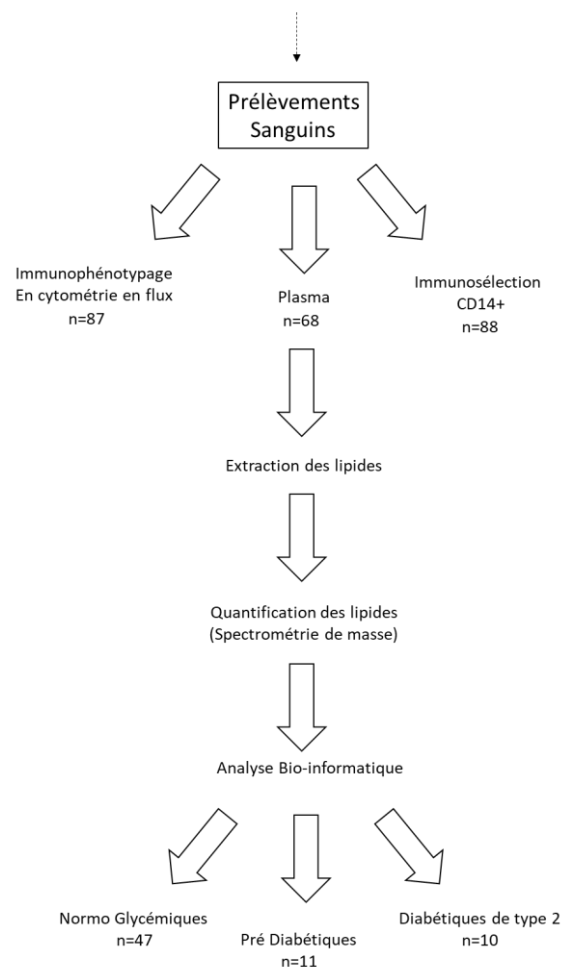


Figure 11 : Schéma de la partie lipidomique de l'étude Epitherapie

a) Analyse totale

L'analyse en composantes principales du lipidome de ces femmes ne montre pas de clusterisation franche des trois groupes représentés. (**Figure 12A**).

L'ANOVA réalisée retrouve dix espèces lipidiques dont les concentrations varient significativement entre les 3 groupes étudiés (**Figure 12B**). Il s'agit de trois phosphatidyléthanolamines (PE), de trois phosphatidylglycérols (PG), d'une phosphatidylcholine (PC), d'une sphingomyéline (SM) et de deux céramides (Cer).

La transition de la normo-glycémie vers le pré diabète est marquée par des modifications de concentrations de 5 espèces lipidiques. Il existe ainsi une augmentation de deux classes de céramides (d18:2-20:0 et d18:2-20:1) chez les patientes prédiabétiques, associée à une diminution de 3 glycérophospholipides (PC (36 :0), PE (38:4) et PG(36 :2)).

La transition du pré diabète vers le diabète est caractérisée ici par la diminution en un PE (16:0p/20:1) et un di-hydrocéramide (d18 :2-14 :0). A l'inverse, cinq PE (40:6; 34:2; 38:3; 36:4; 38:4), deux PG (34:1 ; 36:2) et un di-hydrocéramide (d18:0-24:1) sont associés positivement à la présence du diabète.

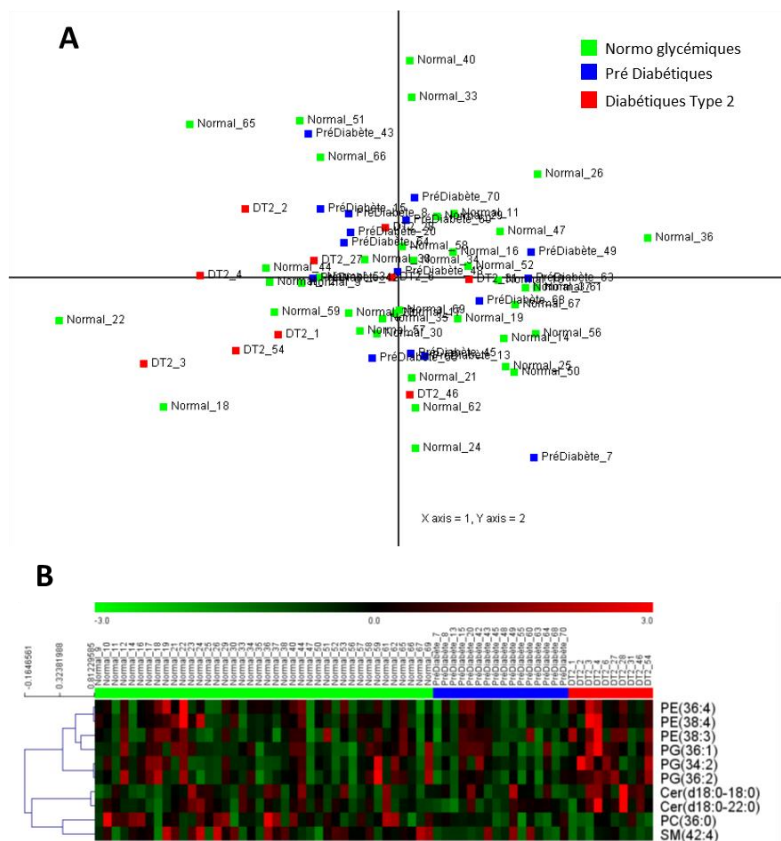


Figure 12 : A. Analyse en composantes principales du lipidome totale des 68 patientes issues de la cohorte Epithérapie ; B. HeatMap des dix espèces lipidiques différenciellement enrichies (ANOVA) entre les 3 groupes de tolérance glucidique des 68 patientes issues de la cohorte Epithérapie ;

Les analyses des familles lipidiques globales montrent une diminution globale des SM (**Figure 13C**) et du ratio molaire PC/PE (**Figure 13B**) entre les normo glycémiques et les diabétiques, une augmentation globale des PE entre les états pré diabétiques et diabétiques (**Figure 13A**), et une diminution du ratio molaire entre les états pré-diabétiques et diabétiques (**Figure 13D**).

L'ensemble des résultats de cette analyse totale est résumé dans la **Figure 14**.

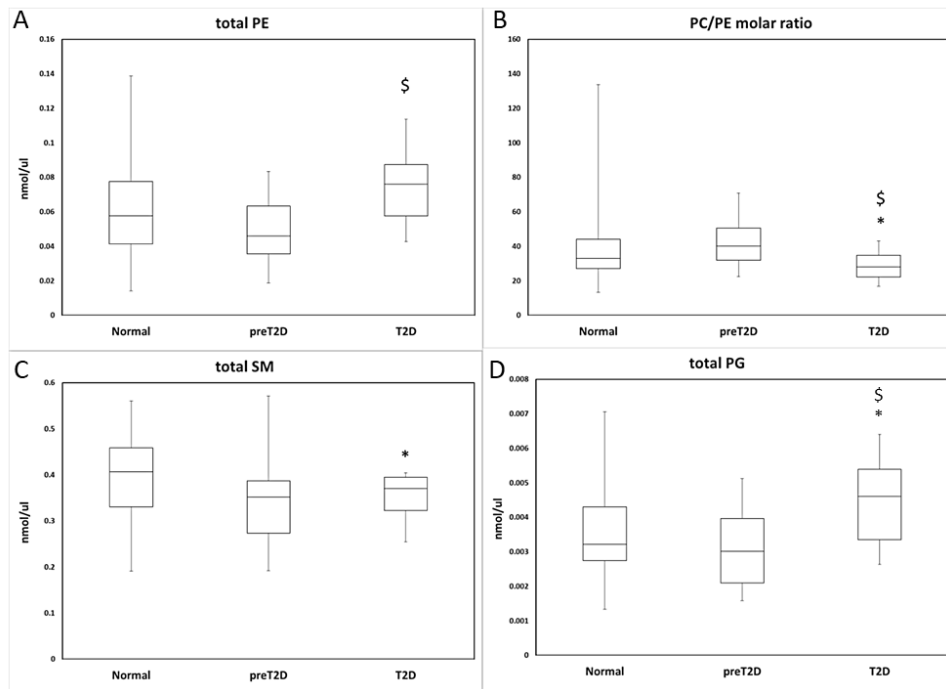


Figure 13: Analyse des différences de concentration de 4 familles lipidiques (A. PE ; B. PC/PE ; C. SM ; D. PG) entre la normo glycémie et le diabète de type 2, et entre le pré-diabète et le diabète de type 2 ; t-test FDR, * p<0.05 comparé à normal, \$p<0.05 comparé à pré-diabétique (preT2D).

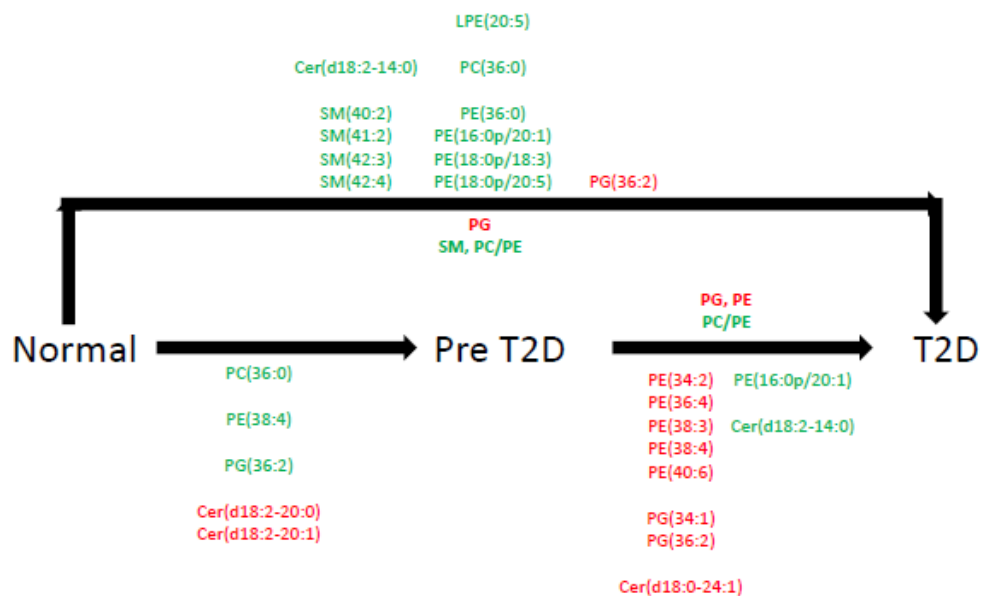


Figure 14 : résumé de l'analyse de l'enrichissement des Glycérophospholipides et des Sphingolipides entre les différents stades de tolérance glucidique, sur l'ensemble des 68 patients issues de la cohorte Epithérapie.

2. Weighted Correlation Network Analysis (WGCNA)

Aucun module lipidique n'est associé à l'HbA1c et aux variables cliniques listées précédemment. **(Figure 15)**

Le module vert était associé négativement avec le pourcentage de monocytes intermédiaires ($r=-0.28$; $p=0.02$) déterminé par immunophénotypage. Le pourcentage de monocytes intermédiaires n'était associé à aucun autre module, tout comme aucun autre pourcentage de monocytes (totaux, classiques et non classiques) n'était associé à un des six modules lipidiques. **(Figure 15)**

Le module gris était associé négativement au pré-diabète ($r= -0.28$; $p= 0.02$). **(Figure 15)**

Enfin le module bleu était associé positivement à l'état diabétique par rapport au pré-diabète ($r=0.34$; $p=0.004$). **(Figure 15)**

L'association entre le module bleu et l'état diabétique étant la plus forte et la plus significative des associations identifiées, nous avons étudié la composition en lipides de ce module, et le poids de chaque lipide du module dans cette association **(Figure 16)**. Les PG (36:2 ; 34:2 ; 36:1 et 34:1), les PE (36:2 ; 34:2 ; 38:4 ; 32:1 ; 36:4 ; 34:1) et le palmitoylethanolamide (Pea) sont les espèces lipidiques expliquant le plus la relation entre le module bleu et l'état diabétique.

Aucun de ces modules n'était associé à la fois à la répartition des monocytes et à un état de tolérance glucidique. Nous n'avons donc pas pu identifier, par cette analyse spécifique, d'ensemble(s) de lipides permettant d'expliquer les modifications monocytaires (augmentation du pourcentage des monocytes classiques) constatées lors de la progression de la normo glycémie vers l'état diabétique. Il serait intéressant par la suite de tester les interactions entre le module vert et les modules bleus et gris.

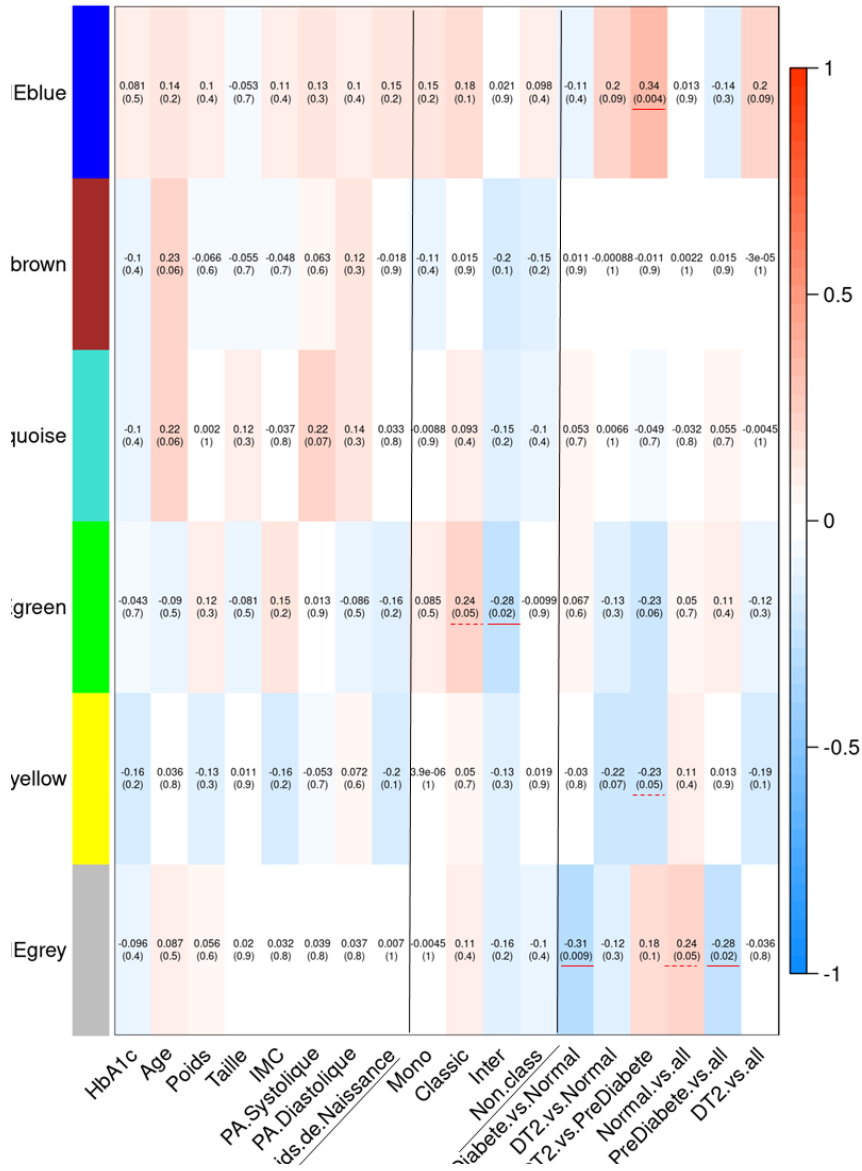


Figure 15: HeatMap représentant la corrélation entre chaque module d'espèces lipidiques et des données cliniques, d'immuno-phénotypage, et de tolérance glucidique.

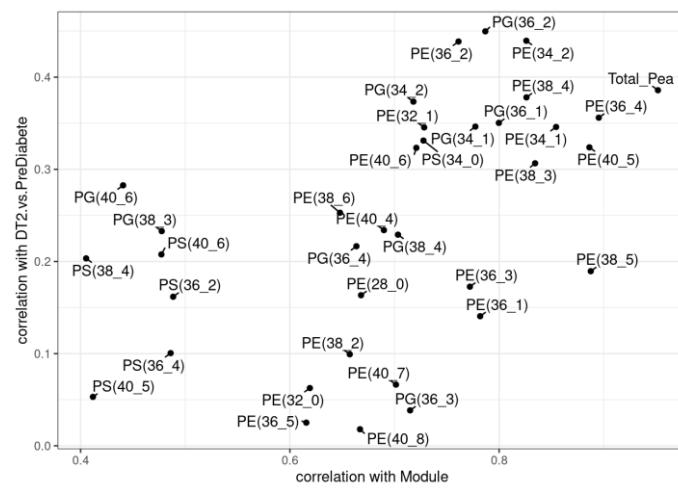


Figure 1 : Représentation des espèces lipidiques du module bleu, en fonction en abscisse de leur poids dans le module et en ordonnées de leur poids dans la corrélation avec le diabète de type 2

5. Discussion

Dans notre population, les trois groupes étant comparables sur les plans du sexe, de l'âge, de l'IMC, du tabagisme et des traitements, les modifications immunitaires et lipidomiques observées peuvent être rattachées directement au statut glycémique.

La progression vers le diabète est associée à une modification de la répartition des monocytes circulants, avec une augmentation de la part des monocytes classiques. Dans la littérature, le diabète est habituellement associé à une diminution des monocytes classiques et à une augmentation des intermédiaires et non classiques (204-207). Plusieurs éléments peuvent expliquer cette différence.

- D'abord la méthodologie de l'immunophénotypage, puisque l'utilisation dans certaines études de billes d'immunosélection pourraient entraîner l'activation des monocytes, contrairement à notre protocole sur sang total.
- Ensuite, le modèle de diabète gestationnel permet possiblement de ne sélectionner qu'un seul sous-type de diabète et donc d'avoir une population très homogène, contrairement aux précédentes études qui mélangeaient tous les diabètes non auto-immuns. S'il existe plusieurs sous-type de diabètes non auto-immuns, ils pourraient avoir des signatures inflammatoires et monocytaires différentes.
- De plus, l'absence de différence d'IMC et d'âge entre nos trois groupes est unique dans la littérature, tout comme l'étude exclusive d'une population féminine. Toutes les études précédentes portaient sur des populations mixtes, avec des patients diabétiques plus vieux et avec un IMC supérieur aux contrôles. Dans ces études, les modifications de répartition des monocytes pourraient être influencé par l'un de ces facteurs.
- Le facteur ethnique pourrait aussi jouer un rôle dans cette disparité, puisque la population de notre cohorte est, à l'image de celle de notre hôpital, hautement cosmopolite. Néanmoins l'origine ethnique de chacune de nos patientes n'a pas été collectée prospectivement, et nous n'avons donc pas la possibilité d'ajuster nos résultats sur ce paramètre.
- Enfin, notre population contrôle est normo glycémique mais probablement déjà engagée dans la voie du diabète, comme en témoigne le diabète gestationnel récent et le risque très élevé de diabète à 10 ans. En conséquence, le recrutement d'une population saine de femmes ayant accouchées récemment, n'ayant eu ni diabète gestationnel ni HGPO de dépistage (donc sans critère de risque de diabète gestationnel), et ayant une HGPO post-partum normale est en cours. Cette population nous permettra de confirmer ou non l'augmentation progressive du pourcentage de MC au cours de la pathogénèse du diabète, indépendamment de l'âge, du poids et du sexe des sujets.

Dans notre cohorte, la progression vers le diabète était aussi associée à des modifications lipidomiques.

- Ainsi les patientes diabétiques présentaient une plus forte concentration en PE que les patientes pré-diabétiques, ce qui est concordant avec les résultats de l'étude

PREDIMED dans laquelle les patients devenant diabétiques au cours du suivi avaient des concentrations en PE supérieures au départ de l'étude à ceux restant non diabétiques (208). Cette élévation est aussi retrouvée chez des patientes obèses non diabétiques présentant une NASH (209) ; il serait intéressant d'explorer le foie de nos patientes afin de déterminer si nos patientes diabétiques présentent plus de stéatose ou de stéato-hépatite que les pré-diabétiques ou normo glycémiques. L'analyse WGCNA a par ailleurs identifié PE (36-2) comme un des lipides les plus associés à la transition du pré-diabète vers le diabète ; cette espèce lipidique faisait partie des trois espèces lipidiques (comprenant aussi PS (38-4) que nous retrouvons aussi dans la **figure 16**, et CE (20 :4) qui n'a pas été quantifié ici) dont les concentrations sériques, chez des femmes venant d'accoucher après un diabète gestationnel, étaient des facteurs de risque de développer un diabète dans les 10 ans (210).

- En lien avec cette augmentation des PE, le ratio PC/PE est diminué chez nos patientes diabétiques par rapport à nos patientes normo-glycémiques ou pré-diabétiques. Comme exposé dans la revue de la littérature de J van der Veen (211), l'augmentation et la diminution de ce ratio sont associées à des modifications du métabolisme énergétique dans les différents tissus. Ainsi, au niveau mitochondrial, cette variation pourrait entraîner une dysfonction de la chaîne respiratoire, elle-même impliquée dans la pathogénèse du syndrome métabolique et du diabète (212–213). Au niveau musculaire, l'élévation du ratio PC/PE est associée à une diminution de l'insulino-sensibilité (214). Enfin, comme pour les PE, le rapport PC/PE est aussi associé aux hépatopathies stéatosiques non-alcooliques (215).
- A l'inverse, les patientes diabétiques avaient, par rapport aux patientes normo-glycémiques, une sous-représentation des SM dans leur lipidome. Cette relation inverse concorde avec les données de l'étude PREDIMED citées plus haut (208), mais aussi de l'étude de Sui et al. (216) qui en comparant les lipidomes de 245 patients normo glycémiques, pré diabétiques ou diabétiques retrouve cette diminution progressive des SM entre les trois stades de tolérance glucidique. De manière comparable, l'analyse de la concentration sérique en SM de patients diabétiques et non diabétiques obèses avant la réalisation d'un ByPass gastrique montrait un plus faible taux chez les diabétiques. Deux ans après la chirurgie, les concentrations en SM n'étaient plus différentes (indépendamment de la rémission du diabète), mais de manière inattendue cela était dû à la diminution de la concentration en SM du groupe non diabétique, alors que le groupe diabétique ne voyait pas son taux augmenter. (217)
- Nous avons aussi constaté une augmentation des PG chez les patientes diabétiques. Les PG sont habituellement connus pour leurs rôles de précurseurs dans la synthèse de cardiolipine, un phospholipide essentiel pour le bon fonctionnement mitochondrial (218–221). De plus les PG auraient la capacité de bloquer l'activation des voies TLR2 et TLR4 dans les macrophages (222). Les PG semblent donc plutôt bénéfiques, puisqu'anti-inflammatoires et nécessaires pour un bon fonctionnement métabolique. Leur augmentation chez nos patientes diabétiques ne semble donc pas impliquée dans la pathogénèse de ces diabètes.

- Enfin, le plasma des patientes diabétiques est enrichi en di-hydrocéramides (18:0-24:1) par rapport à celui des patientes pré-diabétiques ; ce résultat est concordant avec celui de Wigger et al. (223) qui a montré que ce céramide était associé au risque de développer un diabète de type 2 après 9 ans de suivi.

Un seul module lipidique identifié lors de l'analyse WGCNA a montré une association avec les résultats de l'immunophénotypage des monocytes. Il s'agit du module vert qui est associé positivement au taux de monocytes classiques et négativement au taux de monocytes intermédiaires. Ce module comprend principalement des PEp et des LPE.

- Les plasmalogènes sont des lipides connus pour leurs fonctions anti-oxydantes (224–225). Ils sont retrouvés diminués dans le sérum des patients avec NASH, cardiopathies ischémiques ou maladie d'Alzheimer (226–228). Ils sont aussi diminués dans le serum des sujets âgés, même sans comorbidité (229). Il n'existe pas de données concernant la relation entre la concentration plasmatique en PEp et l'activation des monocytes ou le risque de diabète.

Aucun module n'a en revanche été identifié comme associé à la fois au profil monocyttaire et au statut glycémique.

En conclusion, nous avons mis en évidence des modifications de répartition des monocytes au cours de la progression vers le diabète, mais nous n'avons pas d'argument à ce stade pour valider l'hypothèse que des variations de lipidomes soient impliquées dans ces modifications. Les données transcriptomiques et épigénomiques à venir devraient apporter des réponses sur les déterminants de ces modifications.

Chapitre 3 : Etude de l'influence de l'inflammation dans les formes sévères d'infection à COVID-19

Depuis Décembre 2019, un nouveau virus appartenant à la famille des Coronaviridae est responsable d'une pandémie mondiale. Il a été nommé « coronavirus-2 du syndrome respiratoire aigu sévère » (SARS-CoV-2). La maladie respiratoire causée par SARS-CoV-2 a été appelée par l'OMS « COVID-19 ». La grande majorité des patients atteints du COVID-19 ont un bon pronostic, mais certains malades ont dû être hospitalisés en soins critiques et une partie est même décédée (230). Le virus étant hautement contagieux, ce faible pourcentage de cas graves représente en réalité des nombres d'hospitalisations et de décès liés au SARS-CoV2 importants. La cause de cette morbi-mortalité était une pneumopathie hypoxémiant rapidement progressive, dont la compréhension de la physiopathologie reste encore incomplète. Les nombreuses études publiées sur le sujet pointent le rôle d'atteintes vasculaires, de thromboses et d'une inflammation excessive et dérégulée.

En effet, une fois que le virus a pénétré les cellules épithéliales alvéolaires de type 2 via le récepteur hôte ACE-2 et commence à se répliquer, les pneumocytes chargés de virus vont libérer de nombreuses cytokines et marqueurs inflammatoires différents tels que les interleukines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-120 et IL-12), le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'IFN- λ et IFN- β , CXCL-10, la protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1) et la protéine inflammatoire des macrophages-1 α (MIP-1 α). Ces cytokines vont entraîner le recrutement de macrophages et de monocytes qui d'une part vont phagocyter les débris cellulaires et les cellules apoptotiques localement, et d'autre part, vont à leur tour libérer des cytokines puis activer les cellules de l'immunité adaptative, comme les lymphocytes B et T (231–232)

Dans la plupart des cas, ce processus est capable de résoudre l'infection, entraînant une diminution de la réponse immunitaire et le rétablissement du patient. Cependant, dans certains cas, une réponse immunitaire dysfonctionnelle se produit, entraînant un orage cytokinique responsable d'une hyper inflammation pulmonaire généralisée et d'une désaturation clinique.

Dès le début de la pandémie de COVID-19, le diabète de type 2 (DT2) est apparu comme un facteur de risque de forme sévère et de mortalité (233). Le rôle de l'inflammation et notamment des monocytes dans la progression de ces deux pathologies, au sur-risque de forme sévère de COVID-19 chez les patients diabétiques de type 2, a fait émerger l'hypothèse d'un lien entre les anomalies monocytaires chroniques des patients diabétiques et leurs réponses altérées à l'infection par le SARS-CoV-2.

De plus, l'identification des groupes à risque de formes graves de COVID-19, sur la base des signatures immuno-inflammatoires, serait précieuse pour individualiser la prise en charge et développer des cibles potentielles pour une thérapie de précision.

Dans cette étude observationnelle, nous avons voulu caractériser la variation immunophénotypique associée à la gravité du COVID-19 dans le DT2.

Nous avons constitué une cohorte de patients hospitalisés à l'hôpital Lariboisière pour des formes sévères de COVID-19, avec ou sans diabète de type 2.



Ces patients ont bénéficié

- D'un immunophénotypage à large spectre, déjà présenté dans les chapitres 1 et 2, permettant de quantifier 16 populations de leucocytes circulants.
- De l'étude par qPCR de l'expression de gènes de l'inflammation dans les PBMC.

Les résultats de cette recherche sont présentés dans l'étude ci-dessous.

SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESS

Monocytopenia, monocyte morphological anomalies and hyperinflammation characterise severe COVID-19 in type 2 diabetes

Fawaz Alzaid^{1,*†} , Jean-Baptiste Julla^{1,2,†}, Marc Diedisheim^{1,3}, Charline Potier¹, Louis Potier^{1,4}, Gilberto Velho¹, Bénédicte Gaborit^{5,6}, Philippe Manivet⁷, Stéphane Germain⁸, Tiphaine Vidal-Trecan², Ronan Roussel^{1,4}, Jean-Pierre Riveline^{1,2}, Elise Dalmás¹, Nicolas Venteclef¹ & Jean-François Gautier^{1,2,**} 

Abstract

Early in the COVID-19 pandemic, type 2 diabetes (T2D) was marked as a risk factor for severe disease and mortality. Inflammation is central to the aetiology of both conditions where variations in immune responses can mitigate or aggravate disease course. Identifying at-risk groups based on immunoinflammatory signatures is valuable in directing personalised care and developing potential targets for precision therapy. This observational study characterised immunophenotypic variation associated with COVID-19 severity in T2D. Broad-spectrum immunophenotyping quantified 15 leucocyte populations in peripheral circulation from a cohort of 45 hospitalised COVID-19 patients with and without T2D. Lymphocytopenia and specific loss of cytotoxic CD8⁺ lymphocytes were associated with severe COVID-19 and requirement for intensive care in both non-diabetic and T2D patients. A morphological anomaly of increased monocyte size and monocytopenia restricted to classical CD14^{Hi} CD16⁻ monocytes was specifically associated with severe COVID-19 in patients with T2D requiring intensive care. Increased expression of inflammatory markers reminiscent of the type 1 interferon pathway (IL6, IL8, CCL2, INF1B) underlaid the immunophenotype associated with T2D. These immunophenotypic and hyperinflammatory changes may contribute to increased voracity of COVID-19 in T2D. These findings allow precise identification of T2D patients with severe COVID-19 as well as provide evidence that the type 1 interferon pathway may be an actionable therapeutic target for future studies.

Keywords COVID-19; inflammation; monocyte; SARS-CoV-2; type 2 diabetes

Subject Categories Immunology; Metabolism; Microbiology, Virology & Host Pathogen Interaction

DOI 10.15252/emmm.202013038 | Received 30 June 2020 | Revised 17 August 2020 | Accepted 19 August 2020 | Published online 11 September 2020

EMBO Mol Med (2020) 12: e13038

Introduction

Coronavirus disease 19 (COVID-19), an infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)-2, was first identified in Wuhan, China, in December 2019. SARS-CoV-2 induces strong systemic inflammation and acute injury of the lung and potentially other organs (Merad & Martin, 2020). As of 30 June 2020, over 10 million cases have been reported worldwide, with an estimated mortality of 5–6% (Dong *et al.*, 2020). Early reports stated that individuals with diabetes are at high risk of complications or death from severe COVID-19 (Zhu *et al.*, 2020). Later studies indicated that factors such as age, obesity or hypertension, although commonly associated with diabetes, independently increase risk (Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). The complex aetiologies of these conditions and of type 2 diabetes (T2D) make deciphering the mechanisms that increase severity of COVID-19 a complex task.

Recent reports have found important links between systemic metabolism, glucose homeostasis and responses to COVID-19. Notably, studies have shown that glycaemic variability strongly influences outcome in COVID-19, where poorly controlled blood glucose was associated with markedly higher mortality compared to patients with well-controlled blood glucose (Zhu *et al.*, 2020).

1 Cordeliers Research Centre, INSERM, IMMEDIAB Laboratory, Sorbonne Université, Université de Paris, Paris, France

2 Department of Diabetes, Clinical Investigation Centre (CIC-9504), Lariboisière Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

3 Department of Diabetology, Cochin Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université de Paris, Paris, France

4 Department of Diabetology, Endocrinology and Nutrition, Bichat Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France

5 INSERM, INRA, Aix Marseille University, C2VN, Marseille, France

6 Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition Department, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

7 Centre de Ressources Biologique "biobank Lariboisière", BB-0033-00064, APHP, Nord, Université de Paris, Paris Diderot, Hôpital Lariboisière, Paris, France

8 Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France – Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris Sciences et Lettres (PSL) Research University, Paris, France

*Corresponding author (lead contact). Tel: +33 1 44 27 81 08; E-mail: fawaz.alzaid@gmail.com

**Corresponding author. Tel: +33 1 44 27 81 08; E-mail: jean-francois.gautier@aphp.fr

† These authors contributed equally to this work as first authors

Similarly, high glycosylated haemoglobin (HbA1c), a proxy of glycaemic instability, has been associated with low oxygen saturation, inflammation and hypercoagulability in patients with COVID-19 (Wang *et al*, 2020b). More recently, mechanistic studies have shown that the elevated glucose that sustains inflammatory metabolism in immune cells directly promotes viral replication and cytokine production in SARS-CoV-2 infection (Codo *et al*, 2020). Other potential immune-mediated mechanisms increasing severity of COVID-19 in patients with T2D include (i) higher affinity cellular binding and efficient virus entry, (ii) decreased viral clearance and (iii) altered immune responses leading to hyperinflammation and aggravated cytokine storm syndrome.

Deregulation of the viral immune response in T2D is a plausible hypothesis. Lymphopenia has been consistently reported as one of the most frequent immune abnormalities in Chinese populations suffering severe COVID-19 (Tan *et al*, 2020). Peripheral lymphocyte counts are low, with a higher proportion of pro-inflammatory Th17 CD4⁺ T cells, as well as elevated cytokine levels. In addition to altered T-cell dynamics, studies revealed altered monocyte phenotypes in severe forms of COVID-19 (Zhang *et al*, 2020). The important implication of the innate immune system in COVID-19 aetiology is also evidenced by aberrant macrophage activation at the site of infection and in peripheral tissues (Park, 2020).

Previous studies in T2D have highlighted abnormalities in monocyte phenotypic transition states related to disease severity and cardiovascular risk (Rogacev *et al*, 2012; Menart-Houtermans *et al*, 2014). Interactions between the heightened immunoinflammatory states in T2D and in COVID-19 cases may well be at the root of increased susceptibility of T2D patients to severe COVID-19. Deregulation of T-cell or monocyte frequency and function may result in unchecked innate and adaptive immune responses. Such responses lead to the uncontrolled and sustained inflammation observed in severe COVID-19 and at higher risk of mortality.

Herein, the immunophenotypic profile of diabetic and non-diabetic COVID-19 patients revealed specific phenotypic and morphological alteration of monocytes in T2D patients. Interestingly, the type 1 interferon sensitive transcription factor, the interferon regulatory factor (IRF)-5, is associated with altered monocyte fate in T2D. Finally, we provide evidence that a loss of CD8⁺ T cells and classical monocytes concomitant to increased IRF5 expression dictate severity of COVID-19 in T2D patients.

Results

Type 2 diabetes is associated with decreased monocyte frequency and phenotypic alterations in COVID-19 patients

To characterise the influence of pre-existing diabetes in COVID-19 patients, we recruited a cohort of 45 COVID-19 patients from Lariboisière Hospital's University Centre for Diabetes and its Complications including 30 patients with T2D and 15 non-diabetic (ND) patients. When comparing T2D to ND patients, we have no differences in clinical or demographic criteria, with the exception of increased HbA1c and hypertension in T2D relative to ND (Table 1). HbA1c % was fourfold higher, and prevalence of hypertension was 1.3-fold higher in T2D with COVID-19 relative to ND patients with COVID-19.

Table 1. Characteristics of COVID-19 patients in the non-diabetic (ND) and type 2 diabetic (T2D) groups.

	ND (n = 15)	T2D (n = 30)	P-value
Age (y)	62 (52–77)	64 (54–77)	0.842
Sex M	8 (53)	23 (79)	0.073
COVID duration at inclusion (d)	14 (5–17)	11 (7–17)	0.814
Risk factors for severe COVID-19			
BMI (kg/m ²)	22 (21–22)	28 (24–32)	0.078
Hypertension (%)	2 (13)	8 (62)	0.003
HbA1c (%)	5.8 (5.4–6)	7.8 (7.3–10.3)	< 0.0001
Severe COVID-19 indicators			
Intensive care (%)	4 (27)	10 (34)	0.7384
CRP (mg/l)	138 (51–211)	146 (86–248)	0.725
Minimum lymphocytes (10 ⁹ /l)	0.75 (0.6–1.04)	0.9 (0.67–1.12)	0.590
D-dimers (µg/l)	2,095 (1,093–3,133)	1,740 (755–4,505)	0.971

Median (IQR) and Mann–Whitney for qualitative data; n (%) and chi-squared or Fisher's exact test for quantitative data. P-values in bold represent statistically significant differences between groups ($p < 0.05$). CRP, C-reactive protein; HbA1c, glycated haemoglobin; ND, non-diabetics; T2D, type 2 diabetes.

To address our initial hypothesis of hyperinflammation and a dysregulated immune response to COVID-19 in patients with T2D, we carried out broad-spectrum immunophenotyping of venous blood by multiparametric flow cytometry. Our approach quantifies 15 major innate and adaptive immune populations and subpopulations through lineage (CD45, CD3, HLA-DR, CD14, CD56 and CD20) and phenotypic markers (CD8, CD4, CD16, CD123, CD11c) in a single assay (Appendix Fig S1A). Upon quantification of major immune populations, we confirmed COVID-19-associated lymphopenia (< 20% CD45⁺ leucocytes) in both ND and T2D patients (Fig 1A and Appendix Fig S1B) (Melzer *et al*, 2015). Unexpectedly, we found a 1.3-fold decrease in CD14⁺ monocyte frequency in COVID-19 patients with T2D relative to ND patients (Fig 1A and Appendix Table S2). Of note, decreased monocyte frequency was not observed in T2D patients without COVID-19 (Appendix Fig S1B and Table S3). We did not find differences in lymphocyte, natural killer (NK), B cell, granulocyte nor DC frequency between T2D and ND COVID-19 patients. Clinical laboratory full blood count (FBC) records corroborated these findings, with lymphopenia (< $1.5 \times 10^9/l$ or < 20% leucocyte count) in ND and T2D COVID-19 patients and a 1.5-fold decrease in monocyte counts in T2D relative to ND COVID-19 patients (Appendix Table S1).

We next quantified monocyte subtypes, to establish whether a specific subtype is affected in T2D patients with COVID-19. Amongst CD14⁺ monocytes, we found that a 1.4-fold decrease in classical monocyte (CD14^{Hi}, CD16⁻) frequency specifically accounted for the decrease in total monocytes in T2D relative to ND COVID-19 patients (Fig 1B). Of note, a similar trend of decreased (1.5-fold; $P = 0.07$) classical monocyte frequency was also observed in T2D COVID-19 patients when compared to T2D patients without COVID-

19 (Appendix Fig S1C). We did not find any differences in the frequencies of lymphocytic, NK or DC subpopulations between ND and T2D COVID-19 patients, whilst COVID-19-associated lymphopenia was represented across all lymphocyte subtypes in ND and T2D patients (Appendix Fig S1C).

Following these findings, we confirmed with principal component analysis (PCA) including variant immune population frequencies (lymphocyte and monocyte subpopulations) that three distinct clusters of patients emerged corresponding to ND COVID-19, T2D COVID-19 and T2D non-COVID-19 patients (Fig 1C). When the PCA was restricted to monocytic subpopulation frequencies, ND COVID-19 and T2D COVID-19 patients also show robust separation (Appendix Fig S1D). With multivariate ANOVA (MANOVA), integrating previously reported severe COVID-19 risk factors (gender, age, BMI, hypertension and diabetic status), we confirmed that lymphocyte and monocyte subpopulation variance is independently associated with patients with COVID-19 ($P < 0.01$) and T2D ($P < 0.05$; Appendix Table S4).

Morphologically altered monocytes in type 2 diabetic COVID-19 patients are associated with an aberrant inflammatory response and increased disease severity

To further characterise the monocyte pool, we quantified expression of monocyte activation markers CD16 and CD14, and of the functional pan-antigen-presenting cell (APC) marker HLA-DR. We observed no difference in expression of CD16 nor HLA-DR between

ND and T2D COVID-19 patients. However, T2D COVID-19 patients had 1.5-fold decreased expression of CD14 in their monocytes (Fig 2A and Appendix Fig S2A). These data indicate that monocytes, between both groups of patients, have retained a similar antigen presentation capacity (HLA-DR) and have transitioned away from classical activation (CD16) at the same rate. Monocytes from patients with COVID-19 and T2D have a pronounced loss of CD14, indicating an increased rate of commitment to non-classical activation.

Importantly, we observed a difference in monocyte size, as indicated by forward scatter (FSC) statistics, between T2D and ND patients with COVID-19. Monocyte size was significantly higher in T2D relative to ND patients with COVID-19 (1.4-fold increase; Fig 2A). This unexpected increase in cell size was specific to CD14⁺ monocytes, as we next compared FSC statistics in CD14 and CD3 bifurcate gates and found no differences between T2D and ND COVID-19 patients in CD14⁻, CD3⁺ nor CD3⁻ cells (Appendix Fig S2B). We next quantified the frequencies of the two distinct populations of FSC-Lo (conventional) and FSC-Hi (large) monocytes in our cohort and corroborated a 1.8-fold higher frequency of FSC-Hi monocytes in T2D relative to ND COVID-19 patients (Fig 2B and Appendix Fig S2C).

To characterise this atypical population of FSC-Hi monocytes, we quantified expression of other known lineage markers (CD20, CD56, CD3) independently of patient status. We found no differences in the expression of non-monocyte markers (CD20, CD56, CD3) between FSC-Lo and FSC-Hi monocytes (Appendix Fig S2D).

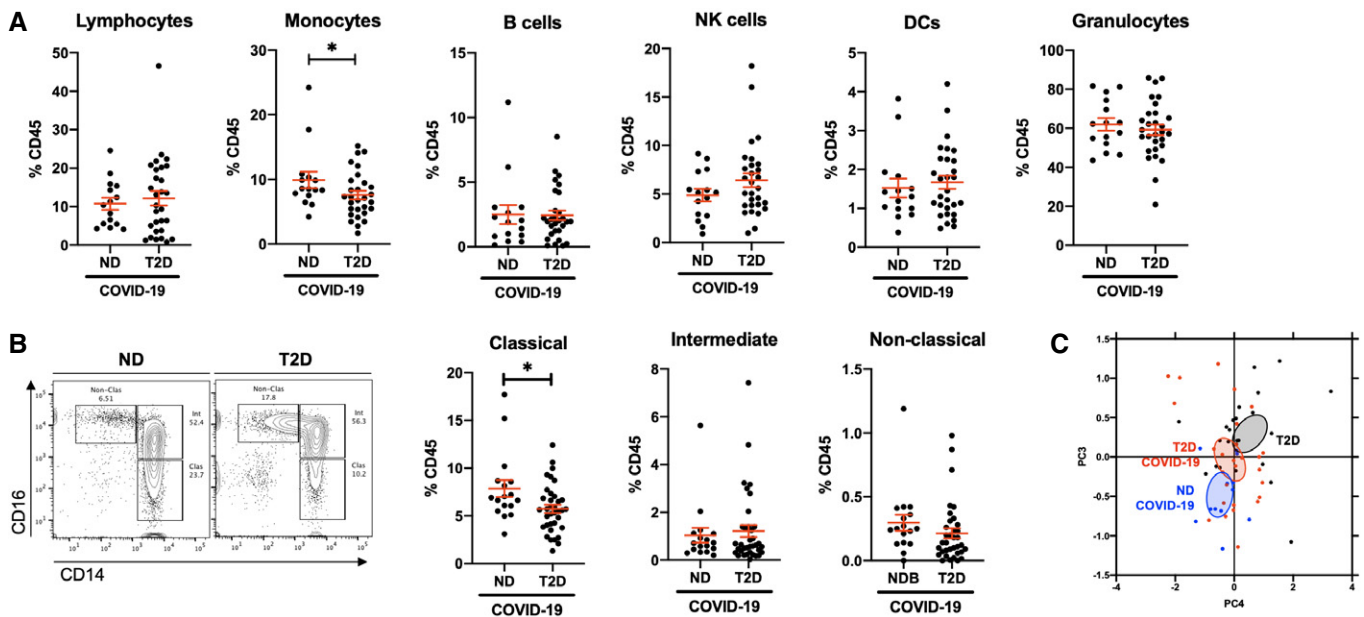


Figure 1. Type 2 diabetes is associated with decreased monocyte frequency and phenotypic alterations in COVID-19 patients.

A Flow cytometric quantification of lymphocytes, monocytes, B cells, natural killer (NK) cells, dendritic cells (DCs) and granulocytes in peripheral venous blood samples from non-diabetic (ND) and type 2 diabetic (T2D) patients with COVID-19.

B Quantification of monocyte subpopulation phenotypes as classical (CD14^{hi} CD16⁻), intermediate (CD14^{hi} CD16⁺) or non-classical (CD14^{lo} CD16⁺).

C Principal component analysis of lymphocyte and monocyte population frequencies in ND and T2D COVID-19 patients and in T2D patients without COVID-19.

Data information: Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were evaluated with unpaired t-test. * $p < 0.05$. See also Appendix Fig S1 and Tables S1–S3. Sample size and exact P -value in Appendix Table S5.

Source data are available online for this figure.

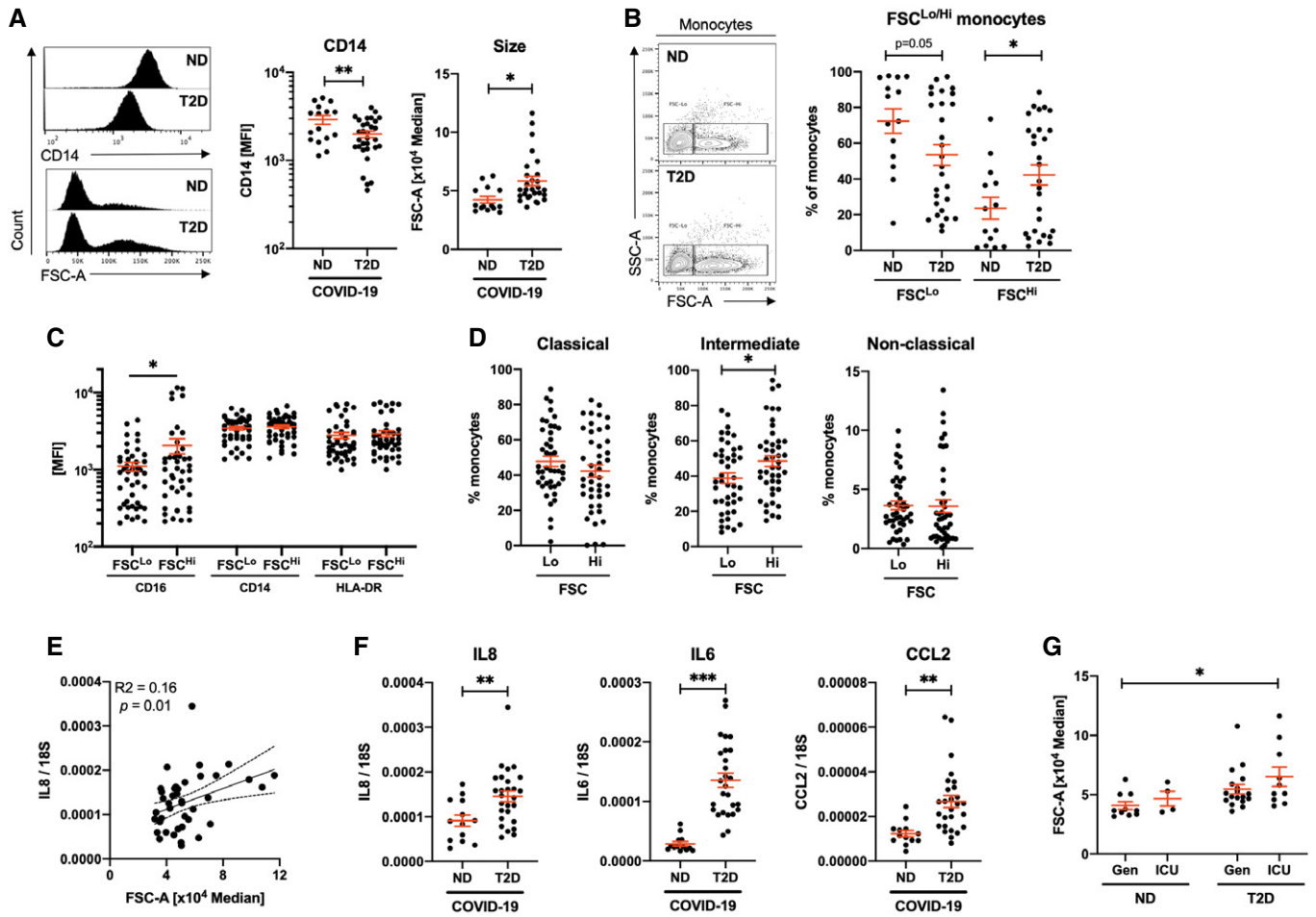


Figure 2. Morphologically altered monocytes in type 2 diabetic COVID-19 patients are associated with an aberrant inflammatory response and increased disease severity.

- A Quantification of CD14 expression and size (FSC) in monocyte populations from non-diabetic (ND) and type 2 diabetic (T2D) COVID-19 patients.
 B Frequency of conventional (FSC^{Lo}) and large (FSC^{Hi}) monocytes in ND and T2D COVID-19 patients.
 C Expression of CD16, CD14 and HLA-DR in FSC^{Lo} and FSC^{Hi} monocytes from COVID-19 patients.
 D Proportions of classical, intermediate and non-classical monocytes within FSC^{Lo} and FSC^{Hi} monocytes from COVID-19 patients.
 E Correlative analyses of IL8 expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to monocyte FSC.
 F IL8, IL6 and CCL2 mRNA expression in PBMCs from ND and T2D COVID-19 patients.
 G Monocyte size quantified in ND and T2D COVID-19 patients treated in general wards (Gen) or in the intensive care unit (ICU).

Data information: Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were evaluated with unpaired *t*-test (except for (C) and (D) where paired by patient). Analysis of variance (ANOVA) or analysis of covariance (ANCOVA) was used for multiple group comparisons. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001. For correlative analysis, Spearman's test was carried out calculating a 2-tailed *P*-value. See also Appendix Fig S2. Sample size and exact *P*-value in Appendix Table S5. Source data are available online for this figure.

Monocyte activation and functional marker analyses revealed 1.9-fold increased expression of CD16 in FSC-Hi monocytes relative to FSC-Lo monocytes (Fig 2C). CD16 positivity is associated with intermediate and non-classical monocyte class switch. We next quantified the proportions of each monocyte class within FSC-Hi and FSC-Lo populations and found 1.2-fold higher frequency of CD16⁺ intermediate monocytes in the FSC-Hi population relative to FSC-Lo (Fig 2D).

Increased phenotypically switched FSC-Hi monocytes and decreased CD14 expression in the T2D monocyte pool (Fig 1B) indicate that patients with COVID-19 and T2D present a

hyperinflammatory phenotype due to exacerbated loss of classical monocytes. To evaluate the extent of the inflammatory response associated with monocyte size and T2D in COVID-19, we carried out gene expression analyses on PBMCs from the patients included in our cohort. Monocyte size was significantly and positively correlated to expression of the pro-inflammatory marker interleukin (IL)-8, whilst other inflammatory markers (IL6, CCL2) trended towards positive correlation to monocyte size (Fig 2E and Appendix Fig S2E). When COVID-19 patients are stratified based on diabetic status, the expression of multiple inflammatory markers is drastically increased in the presence of T2D (1.6- to 4.8-fold increase;

Fig 2F). Corroborating gene expression, circulating levels of IL-8 were also higher in T2D confirming a more pronounced inflammatory state (Appendix Fig S2H). Circulating concentrations, however, did not correlate to mRNA expression in PBMC (Appendix Fig S2I), indicating that IL-8 in circulation is not restricted to that produced by PBMCs, circulating IL-8 may originate from the site of infection. We also investigated IL1B mRNA expression as a marker of inflammation linked to NLRP3 inflammasome activity. We found that although induced in COVID-19, IL1B expression was not different between ND and T2D patients (Appendix Fig S2F), whereas other inflammatory markers related to the type 1 interferon signature were increased in COVID-19 and further increased with comorbid T2D (Appendix Fig S2F).

Given the above findings, we hypothesised that monocyte size would be of prognostic value at presentation. Thus, we stratified patients based on admission to the intensive care unit (ICU) or care in general wards for non-critical patients (Gen). We found monocyte size to be increased by 1.6-fold in T2D patients admitted to the ICU relative to ND patients that did not require ICU admission (Fig 2G). When comparing ICU to Gen, disregarding diabetic status, we did not detect a statistically significant difference in monocyte size (Appendix Fig S2G).

IRF5 expression is associated with monocyte activation and morphological adaptation in COVID-19 patients

Given the described aetiology of COVID-19 and the patterns of inflammatory marker expression, we hypothesised that the type 1 interferon response is engaged and likely dysregulated in T2D patients. The transcriptional mediator of this pathway is the interferon regulatory factor (IRF)-5, controlling expression of such genes as IL6 and IFNB1. It is highly expressed in the myeloid compartment, is canonically responsive to viral stimuli (Weiss *et al*, 2015; Forbester *et al*, 2020) and is involved in regulating metabolic inflammation (Dalmas *et al*, 2015; Alzaid *et al*, 2016).

We quantified mRNA expression of IRF5 and of its target type 1 interferon, IFNB1, in PBMCs from our cohort. We found IRF5 and IFNB1 to be induced in ND COVID-19 (respectively, 7.3- and 1.8-fold increase relative to non-COVID-19 patients with T2D; Appendix Fig S3A) and with an exaggerated increase in T2D COVID-19 patients (respectively, 1.5- and 2.0-fold increase relative to ND COVID-19 patients; Fig 3A). Furthermore, expression of IFNB1 correlates to that of IRF5, indicating likely dependent expression in this sample (Fig 3A). Then, we quantified IRF5 expression in circulating cells by FACS and found its highest levels to be in monocytes and other populations with myeloid compartments (DC, NK; Fig 3B and Appendix Fig S3B). Whilst IRF5 expression was not variant in the total monocyte pool between patient groups (Fig 3C and Appendix Fig S3C), we found its expression to increase throughout monocyte activation (Fig 3D). IRF5 expression is increased by twofold in intermediate monocytes of T2D patients relative to ND patients, with a similar trend in non-classical monocytes (Fig 3E and Appendix Fig S3D).

Correlative analyses to monocyte phenotypic and functional markers revealed a positive correlation between IRF5 and HLA-DR, with no correlation to CD14, CD16 nor FSC (Fig 3F and Appendix Fig S3E). These data indicate that IRF5 does not directly regulate monocyte class switch nor morphological changes; however, a dependent relationship exists between IRF5 and HLA-DR.

To evaluate whether the inflammatory response mediated by IRF5 could infer protection or severity in COVID-19, we stratified our patients based on their admission to the ICU. In the monocyte pool, we observed a 2.1-fold increase in expression in patients admitted to the ICU, significant only amongst ND COVID-19 patients (Fig 3G). Interestingly, in monocyte subpopulations we observed a specific signature associated with ICU admission taking into account patient diabetic status. Classical monocyte expression of IRF5 is specifically increased by 2.1-fold in patients admitted to the ICU, whereas intermediate monocyte expression of IRF5 is only increased in T2D patients admitted to the ICU (respectively, 3.3- and 1.7-fold relative to ND and T2D not requiring ICU admission; Fig 3H).

Severity of COVID-19 is associated with loss of CD8⁺ lymphocytes and loss of classical monocytes in patients with T2D

Despite the majority of ICU admissions from our cohort being patients with T2D, the proportions of ICU admissions within ND patients were comparable (26.7% of ND versus and 34.5% of T2D; Fig 4A). To decipher the immunophenotypic and inflammatory signatures more specifically associated with COVID-19 severity in T2D, we compared mild–moderate and severe–critical cases of COVID-19 in this patient group.

When patients with T2D are stratified based on ICU admission, we observe a significant 1.6-fold decrease in monocyte frequency and a trend to decreased lymphocyte frequency (1.8-fold) in T2D patients requiring ICU admission relative to those treated in general wards (Gen; Fig 4B). The decrease in lymphocyte and monocyte proportions is corroborated by hospital-issued FBCs (Appendix Fig S4A). Quantification of immune subpopulations revealed concomitant decreases in CD8⁺ T cells (2.0-fold) and classical monocytes (1.3-fold) in ICU, the latter of which confirms monocytopenia, specific to classical monocytes, as a hallmark of COVID-19 infection in patients with T2D (Fig 4C). A further loss of classical monocytes is indicative of severity in T2D. No other populations in circulation were significantly affected in the ICU group (Appendix Fig S4B and C).

We next applied unsupervised analyses to our cytometry data, consisting of dimensional reduction by the t-SNE algorithm (van der Maaten & Hinton, 2008). Marker mapping was performed by projecting known lineage markers to the t-SNE map and we evaluated variation between patients in this analyses. Visual analysis of t-SNE maps confirmed the monocyte and lymphocyte dynamics associated with T2D and with COVID-19 severity, notably a marked loss of CD14⁺ monocytes and CD8⁺ lymphocytes in T2D patients with severe COVID-19, versus a specific loss of CD8⁺ lymphocytes in ND patients with severe COVID-19 (Fig 4D). When projecting IRF5 expression over the t-SNE maps, we confirm monocyte-specific expression, maintained at a high level despite marked monocytopenia in severe COVID-19 with T2D.

Discussion

2020 has been marred by the emergence of SARS-CoV-2 affecting over 4.5 million people globally. The resulting coronavirus disease (COVID)-19 has placed unprecedented strain on health services and claimed over 300 thousand lives (Dong *et al*, 2020). With diabetic patients accounting for approximately 10% of COVID-19 deaths,

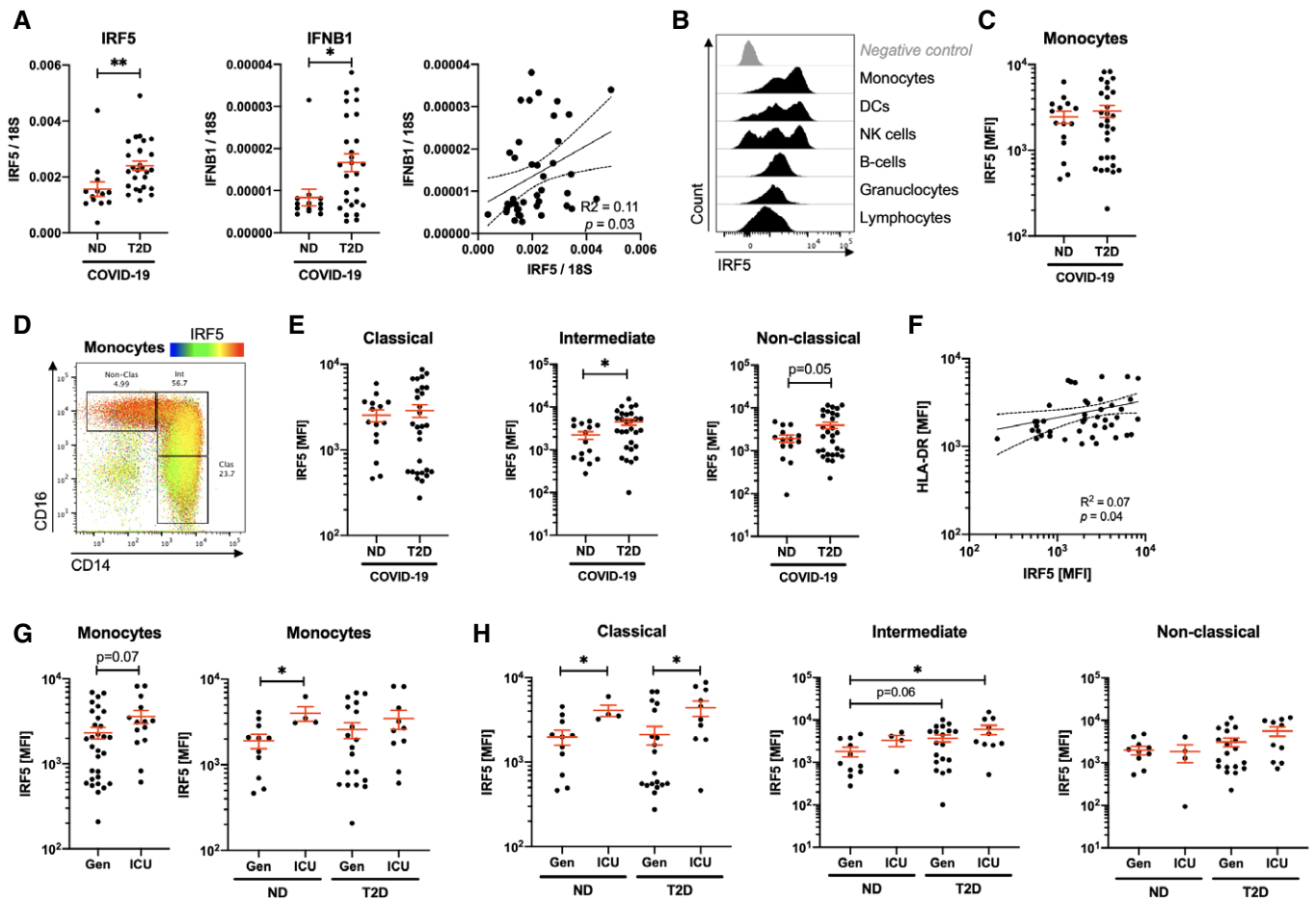


Figure 3. IRF5 expression is associated with monocyte activation and morphological adaptation in COVID-19 patients.

A Quantification of IRF5 and IFNB1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of non-diabetic (ND) and type 2 diabetic (T2D) COVID-19 patients.

B Histograms of IRF5 expression on different populations analysed by flow cytometry on venous blood samples.

C IRF5 median fluorescence intensity (MFI) in monocytes of ND and T2D patients with COVID-19.

D IRF5 expression overlaid onto monocyte phenotypic gating.

E IRF5 expression (MFI) in monocyte subtypes from ND and T2D COVID-19 patients.

F HLA-DR and IRF5 expression in monocytes from COVID-19 patients.

G IRF5 expression in monocytes of ND or T2D COVID-19 patients admitted to the intensive care unit (ICU) or treated exclusively in general wards (Gen).

H IRF5 expression in monocytes of ND or T2D COVID-19 patients admitted to the ICU or treated exclusively in Gen.

Data information: Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were evaluated with unpaired t-test. Analysis of variance (ANOVA) was used for multiple group comparisons. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. For correlative analysis, Spearman's test was carried out calculating a 2-tailed P -value. See also Appendix Fig S3. Sample size and exact P -value in Appendix Table S5.

Source data are available online for this figure.

urgent mobilisation of diabetologists and diabetes researchers is required to define criteria that confer risk. An example of such valuable work has found that appropriate glycaemic control is a key determinant of survival amongst T2D patients with COVID-19 (Zhu *et al*, 2020). Our current study investigates inflammation and immune cell dynamics as possible mechanisms conferring risk of severe COVID-19 in patients with T2D.

In COVID-19 patients with or without T2D, we carried our broad-spectrum immunophenotyping of 15 leucocyte populations and subpopulations in peripheral circulation, evaluating changes associated with diabetic status and disease severity. We found that T2D patients with COVID-19 are characterised by monocytopenia,

specific to quiescent monocytes. Monocyte loss was accompanied by morphological alterations and a hyperinflammatory expression profile consistent with the type 1 interferon response. These phenomena, alongside a marked loss of CD8⁺ T cells in peripheral circulation, characterise severe COVID-19 in pre-existing T2D.

Lymphopenia, monocytopenia and phenotypic variation in COVID-19 with pre-existing T2D

In keeping with recent reports, we confirmed lymphopenia as a hallmark of COVID-19 (Tan *et al*, 2020). What we were astounded to observe was the added monocytopenia in patients with T2D. To our

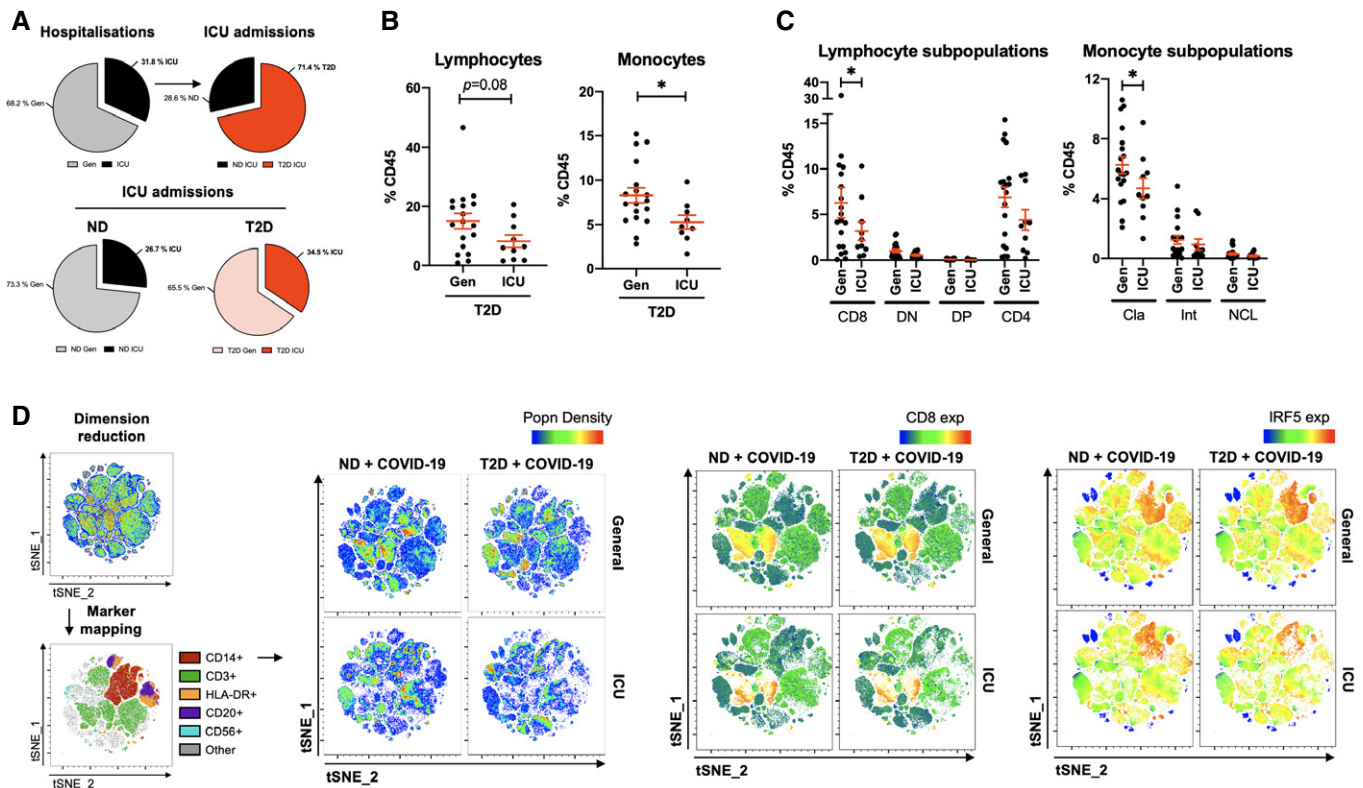


Figure 4. Severe COVID-19 is associated with loss of CD8⁺ lymphocytes and loss of classical monocytes in patients with T2D.

A Pie charts of COVID-19 hospitalisation that were exclusively treated in general wards (Gen) or that required intensive care (ICU). Proportions of patients admitted to the ICU that were non-diabetic (ND) or with type 2 diabetes (T2D).

B Proportions of lymphocytes and monocytes in peripheral venous blood from T2D patients with COVID-19 either treated in Gen or requiring ICU admission.

C Phenotypic analysis of lymphocyte and monocyte subpopulations in peripheral venous blood from T2D COVID-19 patients treated in Gen or requiring ICU treatment.

D t-SNE mapping of all cytometric acquired data with projections of population density, CD8 or IRF5 expression. Maps are of representative profiles from each group.

Data information: Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were evaluated with unpaired t-test or non-parametric Mann–Whitney *U*-test.

* $p < 0.05$. See also Appendix Fig S4. Sample size and exact *P*-value in Appendix Table S5.

Source data are available online for this figure.

knowledge, ours is the first report of monocytopenia specific to T2D patients suffering a coronavirus infection, and such is likely to be a particularity of COVID-19. Monocytopenia has been previously associated with acute infection (Jardine *et al*, 2019), whilst, in our current study, duration of COVID-19 was not different between groups and thus monocytopenia is likely specifically related to patient diabetic status. Of note, monocyte loss detected by flow cytometry is corroborated by clinical FBC and thus could serve as an additional COVID-19 screening tool for diabetology practice, with lymphopenia as an established indicator of severity in the general population.

Beyond the quantitative analyses, we identified an exaggerated phenotypic class switch of monocyte subpopulations in COVID-19 patients with T2D. As monocytes undergo activation, they transition from their classical phenotype to intermediate and non-classical phenotypes gaining expression of CD16 and gradually lowering expression of CD14 (Hijdra *et al*, 2013). We demonstrate an increased rate of transition from the classical phenotype, towards CD16⁺ intermediate monocytes, and an accelerated loss of CD14 towards the non-classical phenotype in T2D. Both chronic

inflammation and viral infection (in particular, influenza viruses) are associated with switching monocyte class (Hoeve *et al*, 2012; Friedrich *et al*, 2019). Importantly, monocyte expression of CD16 increases potency of inducing CD4⁺ T-cell polarisation compared to quiescent (classical) monocytes that are CD16⁻ (Sanchez-Torres *et al*, 2001). This could in part explain the hyperinflammatory response in patients with T2D that have accelerated monocyte activation and a marked loss of quiescent monocytes.

A specific loss of classical monocytes may indeed be due to increased apoptosis when confronted with a viral challenge, as has been reported in *in vitro* modelling (Hoeve *et al*, 2012). Alternatively, monocytes in T2D patients may be primed to transition towards their activated damage-seeking state more rapidly than in ND patients. Of note, the accumulation of intermediate and non-classical monocytes is associated with increased rate of infection and a largely maladaptive response (Hoeve *et al*, 2012; Coates *et al*, 2018; Vangeti *et al*, 2019). Moreover, non-classical monocytes have recently been reported to important drivers of pulmonary hypertension in T2D patients (Yu *et al*, 2020). Taken together, these data are coherent in explaining, in part,

increased risk of severe disease or mortality in COVID-19 patients with T2D.

Morphological alterations and hyperinflammation in COVID-19 patients with T2D

A recent pre-print reported that monocyte morphological alterations are associated with COVID-19 (Zhang *et al*, 2020). These alterations consisted of increased monocyte size (FSC^{Hi} monocytes) in a subset of COVID-19 patients. Interestingly, altered monocyte size has also been reported in infections of influenza virus (Hoeve *et al*, 2012). A major novelty of our investigation is the characterisation of these morphologically altered monocytes in T2D. We corroborate the recent pre-print report of FSC^{Hi} monocytes in COVID-19, and we demonstrate an increased frequency of FSC^{Hi} monocytes in T2D. Moreover, we demonstrate that monocyte size is associated with a hyperinflammatory gene expression profile in PBMCs and with admission to ICU of patients with T2D. Surprisingly, little is known with regard to the regulation of monocyte morphology; further basic research is required to decipher the natural history and functional implications of such phenomena.

Exacerbated IRF5-linked hyperinflammation in T2D patients with COVID-19

With prior knowledge of pathways engaged in both viral and diabetic contexts, we targeted a factor that controls transcription of type 1 interferons, IRF5. Previous studies have well-characterised the pro-inflammatory function of IRF5 in tissue macrophages, the progeny of circulating monocytes (Dalmas *et al*, 2015; Weiss *et al*, 2015). In the current study, we demonstrate that IRF5 expression in circulating cells is induced in COVID-19 and is increased in activated monocytes of patients with T2D relative to ND patients. Indeed, expression is correlated to that of inflammatory markers. A specific increase in activated subtypes of monocytes is in agreement with previous reports that IRF5 drives monocyte damage-seeking behaviour and differentiation to inflammatory macrophages (Yang *et al*, 2012; preprint: Corbin *et al*, 2019). Whilst IRF5 expression did not correlate to monocyte activation markers, we did observe a positive correlation between IRF5 and HLA-DR. A positive correlation indicates a possible dependent relationship where HLA-DR may form part of a mechanism feeding back to increase IRF5 expression; alternatively, IRF5 may impact monocyte antigen presentation capacity or other HLA-DR-associated functions. Moreover, increased expression of IRF5 in different compartments of the monocyte pool also marked those patients that required intensive care.

The molecular mechanisms linking hyperglycaemia and cellular glucose metabolism directly to an IRF5-dependent cytokine storm have recently been described in the case of influenza A virus (IAV) infection, of which some mechanisms may be shared with COVID-19 (Wang *et al*, 2020a). Indeed, increased glucose consumption is characteristic of inflammatory effector function of macrophages, where glucose shuttling to the hexosamine biosynthesis pathway provides a substrate for O-GlcNAcylation of IRF5 on serine-430 and its subsequent K63-linked ubiquitination. These post-translational modifications allow the downstream processing of IRF5 and the engagement of its pro-inflammatory transcriptional activities. IRF5 O-GlcNAcylation in human PBMC and subsequently increased IL8

and IL6 levels in circulation were associated with increased blood glucose in IAV-infected patients (Wang *et al*, 2020a). The IRF5 expression and cytokine profile reported in IAV infection are similar to what we observe in PBMC from SARS-CoV-2-infected patients, comforting our hypothesis that similar mechanisms are at play. Importantly, the K63-linked ubiquitination of IRF5, required for its nuclear translocation, is an indispensable mechanism in macrophages that mediate metabolic inflammation and loss of glycaemic homeostasis in T2D (independently of viral infection) (Kim *et al*, 2017). A recent report has also dissociated IRF5-mediated cytokine production from an inhibitory effect on viral replication in IAV. These studies, and a recent pre-print implicating impaired type 1 interferon signalling in severity of COVID-19 cases, strongly support a key role for IRF5 and the type 1 interferon response in increased severity in T2D (Forbester *et al*, 2020; preprint: Hadjadj *et al*, 2020).

Taken together, our data and previous reports indicate that basal levels of IRF5, preceding SARS-CoV-2 infection, are dysregulated in T2D patients; our supposition is comforted by a recent opinion article describing the hypothetical molecular mechanisms (Laviada-Molina *et al*, 2020). Monocytopenia and rapid class switch of monocytes in T2D with COVID-19 may be the result of an exuberant viral response from an immune system primed on an inflammatory background. IRF5-linked hyperinflammation will induce eager damage-seeking behaviour, antigen presentation and cytokine release, without affecting viral replication, thus contributing to the cytokine storm syndrome that characterises severe COVID-19 (Gruber, 2020).

CD8⁺ T-cell loss and monocytopenia are hallmarks of severe COVID-19 in T2D

In our cohort, as in others, not all COVID-19 patients with T2D require intensive care, approximately 10% more T2D patients required admission to ICU than ND patients. The immunophenotype of patients with T2D that required ICU admission was marked by an exacerbated monocytopenia and lymphopenia; in the case of lymphocyte phenotypes, we were surprised to find that cytopenia was specific to CD8⁺ T cells. A recent correspondence also highlighted a loss of CD8⁺ cytotoxic lymphocytes (CTLs) in patients with COVID-19, both severe and mild forms (Zheng *et al*, 2020). The CTL population is known to play a crucial role in recognising and killing virally infected cells (Koutsakos *et al*, 2019). This study by Koutsakos *et al* demonstrates that CTLs are important in conferring cross-reactivity across a number of viral strains, in effect a key target population that holds important clues for neutralising vaccine development. It is thus not surprising that those patients with under-represented CD8⁺ T cells develop a more severe form of disease. A higher frequency of CD8⁺ T cells and their efficient interactions with APCs, such as monocytes, may be a key process in mitigating severe disease.

Finally, unsupervised clustering of immune populations based on expression data also mapped a marked loss CD8⁺ T cells to ICU admission of both T2D and ND patients with COVID-19, as well as a loss of monocytes in T2D patients with severe disease. Importantly, when IRF5 is projected onto these clusters, we observe a sustained high level of expression specific to monocytes, even amongst populations that decrease in frequency. These data indicate that in T2D, exuberant inflammation, likely mediated by IRF5 in monocytes,

may be responsible for increased mobilisation of these cells. Their increased mobilisation decreases their abundance in peripheral circulation or at sites of interaction with lymphocytic populations. A mismatched ratio of antigen-presenting monocytes to CD8⁺ T cells is a tempting mechanism for the descent from mild–moderate COVID-19 to severe–critical COVID-19. Once patients are identified as at-risk at admission, well-timed and well-targeted immunosuppressive intervention may prevent the uncontrolled and persistent inflammatory response in severe or mortal COVID-19.

Limitations

A main limitation of our study is the sample size and diversity; inclusion of veritable mild cases that did not require hospitalisation would help support and extend our conclusions with regard to the factors that increase COVID-19 severity. Increasing sample size and diversity within the T2D group would also allow the further stratification of patients based on severity of diabetes, in terms of glycaemic control or the existence of complications or comorbidities. Although the current study hypothesised that T2D itself was a risk factor through increasing systemic inflammation, thus, we aimed and achieved the recruitment of groups comparable in terms of age, BMI, gender and disease duration (as well as clinical factors that indicate severity such as CRP and D-dimers). Lastly, the *cytokine storm* syndrome was not documented in this cohort; however, several publications have very concretely established its presence in COVID-19 cases. Given the time-sensitive nature of this public health problem, we privileged novel analyses to directly address the hypothesis.

Materials and Methods

Human populations

All consecutive patients hospitalised in April 2019 for COVID-19 infection in the dedicated University Centre of Diabetes and its Complications, Lariboisière Hospital, Paris, France, were prospectively included in the study. Clinical and anthropometric data are summarised in Table 1. COVID-19 diagnosis was based on positive oropharyngeal swab RT–PCR. Exclusion criteria were type 1 diabetes, immunotherapy for previous transplantation and treatment of COVID-19 by corticotherapy or immunotherapy before inclusion. For the analysis, patients were divided into two groups: with or without T2D. Patients with T2D are patients already known to have it before hospitalisation or patients for which diabetes has been discovered during hospitalisation (HbA1c > 6.5% or two fasted glycaemia above 7 mmol/l). The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and was registered in a public trial registry (ClinicalTrials.gov; NCT02671864). This study was approved by local institutions and ethical committees, and the Ethics Committee of CPP Ile-de-France granted approval for all individuals (Ile de France V number 15070). Non-COVID-19 T2D patients were included from the same clinical service prior to the COVID-19 pandemic as part of an ongoing observational study (NCT02671864); patients were matched to the T2D COVID-19 cohort in terms of age, gender, BMI, hypertension and HbA1c. All patients provided informed consent indicating that they understood the

nature of their participation in the study (NCT02671864). The principal investigator of this clinical trial is Prof. Gautier Jean-François: jean-francois.gautier@aphp.fr.

Data collection

Sampling, clinical data (age, gender, BMI, diabetes duration, history of HTA, COVID duration since 1s symptoms) and biological data (HbA1c, CRP, lymphopenia, D-dimer) were collected at inclusion in a standardised manner; events like introduction of COVID-19 specific treatments, transfer in intensive care unit (ICU) and death were collected at the end of the hospitalisation. Minimum lymphocyte count and maximal CRP were collected at the end of the hospitalisation.

Immunophenotyping by flow cytometry

Blood cells were obtained from 1 ml of venous blood, after red blood cell lysis, and resuspended into FACS buffer as previously described (Julla et al, 2019). After 10-min incubation with an Fc blocker (120-000-422; Miltenyi), cells were stained for surface markers with the appropriate antibodies and a Live/Dead viability dye (L34957; Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocol. The following antibodies were used: anti-HLA-DR (AC122) and anti-CD8 (BW135/80) from Miltenyi; anti-CD14 (MΦP9), anti-CD3 (UCHT1) and anti-CD123 (7G3) from BD Biosciences; anti-CD16 (3G8), anti-CD56 (HCD56), anti-CD20 (2H7) and anti-CD11c (3.9) from BioLegend; and anti-CD4 (S3.5) and anti-CD45 (HI20) from Thermo Fisher Scientific. After washing, cells were fixed and stained using the Foxp3-staining kit (00-5523-00; Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol and using the anti-IRF5 (ab21689; Abcam) antibody for 1 h at 4°C in the dark, followed by the donkey-anti-rabbit-PE (12-4739-81; Thermo Fisher Scientific) secondary antibody for 20 min at 4°C in the dark. Antibodies were diluted in the following ratios: 1:200 for anti-HLA-DR, anti-CD14, anti-CD45, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD20, anti-CD4, anti-CD8 and anti-IRF5; 1:100 for anti-CD56 and anti-CD123; and 1:50 for anti-CD11c and for the secondary PE antibody. Viability dye was diluted at 1:1,000 following the manufacturer's protocol. Acquisition was performed on a LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analysed with FlowJo software (Tree Star). Immune lineage markers and antibodies were chosen based on the Immunological Genome Consortium guidelines, and gating strategies have been previously published (Heng & Painter, 2008; Autissier et al, 2010; Melzer et al, 2015).

RT–qPCR analysis

RNA was extracted from blood cells (PBMCs) using the RNeasy RNA Mini Kit (Qiagen). Complementary DNAs were synthesised using SuperScript Kit (Promega). RT–qPCR was performed using the QuantStudio 3 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific). 18S was used for normalisation to quantify relative mRNA expression levels. Relative changes in mRNA expression were calculated using the comparative cycle method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Primer sequences were designed using Primer3 (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser et al, 2012) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) used: IL8 (F: AGACAGCAGACACAAGC; and R: ATGGTTCCTCCGGTGGT), CCL2

(F: TTCTGTGCCTGCTGCTCAT; and R: GGGGCATTGATTGCATCT), IRF5 (F: GATGGGGACAACACCATCTT; and R: GGCTTTTGTTAAGG GCACAG), IL6 (F: GCCCAGCTATGAACTCCTTCT; and R: GAAGGC AGCAGGCAACAC), IFN β 1 (F: GGAAAGAGGAGAGTGACAGAAAA; and R: TTGGATGCTCTGGTCATCTTTA) and 18S (F: TTCGAACGTC TGCCCTATCAA; and R: ATGGTAGGCACGGCGACTA).

Statistical analyses

Data are expressed as mean or median \pm SD or SEM as indicated in the text, tables and figures. For quantitative data, differences between groups were evaluated with non-parametric Mann–Whitney *U*-test, and categorical and binary variables were tested by the two-tailed Pearson chi-square test or Fisher exact test if more than 20% of the cells in the frequency tables had an expected frequency below 5. Analysis of variance (ANOVA) or analysis of covariance (ANCOVA) was used for group comparisons. Repeated measures multivariate analyses of variance (MANOVA) was employed to compare the variance of monocyte populations taking into consideration gender, BMI, hypertension and diabetic status. Statistical analyses were carried out using JMP (SAS Institute Inc, Cary, NC), XLSTAT 2014 (Addinsoft, Brooklyn, NY), GraphPad Prism (GraphPad), SPSS Statistics (SPSS corporation) and R Software 3.6.0 (<http://www.r-project.org>). Statistical significance was set at $P < 0.05$. Principal component analysis (PCA) was performed from total lymphocyte and monocyte subpopulation FACS quantification with FactoMineR R package (<https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>), and factoextra package (factoextra.bib) was used to construct graphics. Contribution of each individual was analysed to identify outliers biasing the PCA, leading to exclusion of 4 individuals for a technical bias or hospitalisation in the ICU prior to COVID-19 infection. Given the pressing circumstances during COVID-19 pandemic, a power study was not carried out prior to recruitment; sample size was judged sufficient when differences of immunophenotypic were observed. For detailed sample size and exact *P*-value per figure panel, see Appendix Table S5.

Data and software availability

The computer code and software tools used in this study are available:

R Software 3.6.0 (<http://www.r-project.org>). R Core Team (2013). FactoMineR R package (<https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>)
Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE). <https://jmlr.org/papers/v15/vandermaaten14a.html>
Raw and source data can be accessed through the Zenodo online data repository <https://doi.org/10.5281/zenodo.3987326> [Open access as of publication date].

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

FA. was supported by grants from the French National Agency of Research (ANR) for ANR MitoFLAME (ANR-19-CE14-0005) and the European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD)/Lilly grant (Characterisation of monocyte

The paper explained

Problem

COVID-19 severity is associated with progressive lymphocytopenia and systemic inflammation. Type 2 diabetes (T2D) is characterised by chronic low-grade inflammation and is a risk factor for severe COVID-19. Is COVID-19 severity in T2D associated with distinct inflammatory and immunophenotypic variations?

Results

COVID-19 and its severity with pre-existing T2D are associated with monocytopenia and altered morphology. Interferon-driven inflammation and monocyte phenotypes are also perturbed in COVID-19 with T2D. Severe COVID-19 is associated with lymphocytopenia of CD8⁺ cells in the general population, whilst monocytopenia of classical monocytes is a specific to patients with T2D.

Impact

Monocyte frequency and morphology are fast and reliable metrics to assess COVID-19 severity in patients with T2D. The inflammatory profile we observed supports the therapeutic application of anti-inflammatory drugs.

metabolism and bioenergetic responses in type-2 diabetes and risk of cardiovascular disease). N.V. was supported by grants from the French National Agency of Research (GLUTADIAB and ANGIOSAFE), the European Foundation for Diabetes (EFSD) and the European Union H2020 Framework (ERC-EpiFAT 725790). The human study was performed at the Clinical Investigation Centre (Groupe Hospitalier Saint-Louis/Lariboisière, Paris) and was supported by Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (ANR-DGOS Project AngioSafe T2D; J.-F.G., principal investigator) and ASSERADT (a non-profit patient association). E.D was supported by grants from the French and European Foundation for Diabetes (SFD and EFSD). The authors would like to thank Hélène Fohrer-Ting of the Centre for Cytometry, Histology and Cellular Imaging (CHIC) core facility of the Cordeliers Research Centre (CRC), for her guidance, patience and support. The authors thank the Unit   de Recherche Clinique of Lariboisière/Fernand Widal (Pr Eric Vicaud & Dr Véronique Jouis); the Délégation à la Recherche Clinique de Paris—Ile de France; and the Direction de la Recherche Santé de Marseille for their administrative support. The authors also thank Nassima Haddadi, Djamilia Bellili and Hanane Mersel for their technical support, and nurses and patients who accepted to be involved in these studies. The authors also thank Jagadeesh Bayry and Anupama Karnam for their generous gift of the IL-8 ELISA Kit.

Author contributions

FA, J-BJ, MD, ED, NV and J-FG designed research studies, analysed data and wrote the manuscript. J-BJ, TV-T, J-PR, J-FG, PM and BG carried out patient inclusion. FA, J-BJ, CP and NV conducted experiments, and acquired and analysed data. MD and GV carried out data and statistical analyses. BG, SG, LP, RR and J-PR helped with experimental design and scientific discussion.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Alzaid F, Lagadec F, Albuquerque M, Ballaire R, Orliaguet L, Hainault I, Blugeon C, Lemoine S, Lehuen A, Saliba DG *et al* (2016) IRF5 governs liver

- macrophage activation that promotes hepatic fibrosis in mice and humans. *JCI Insight* 1: e88689
- Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC (2010) Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: clarification on DC heterogeneity. *J Immunol Methods* 360: 119–128
- Coates BM, Staricha KL, Koch CM, Cheng Y, Shumaker DK, Budinger GRS, Perlman H, Misharin AV, Ridge KM (2018) Inflammatory monocytes drive influenza A virus-mediated lung injury in juvenile mice. *J Immunol* 200: 2391–2404
- Codo AC, Davanzo GG, Monteiro LB, de Souza GF, Muraro SP, Virgilio-da-Silva JV, Prodonoff JS, Carregari VC, de Biagi Junior CAO, Crunfli F et al (2020) Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /glycolysis-dependent axis. *Cell Metab* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.007>
- Corbin AL, Gomez-Vazquez M, Khoiratty TE, Berthold DL, Almuttaqi H, Attar M, Arnold IC, Powrie FM, Sansom SN, Udalova IA (2019) IRF5 promotes intestinal inflammation by guiding monocyte differentiation towards a pathogenic CD11c⁺ macrophage phenotype. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/601963> [PREPRINT]
- Dalmas E, Toubal A, Alzaid F, Blazek K, Eames HL, Lebozec K, Pini M, Hainault I, Montastier E, Denis RG et al (2015) Irf5 deficiency in macrophages promotes beneficial adipose tissue expansion and insulin sensitivity during obesity. *Nat Med* 21: 610–618
- Dong E, Du H, Gardner L (2020) An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis* 20: 533–534
- Forbester JL, Clement M, Wellington D, Yeung A, Dimonte S, Marsden M, Chapman L, Coomber EL, Tolley C, Lees E et al (2020) IRF5 promotes influenza virus-induced inflammatory responses in human induced pluripotent stem cell-derived myeloid cells and murine models. *J Virol* 94: e00121–20
- Friedrich K, Sommer M, Strobel S, Thrum S, Bluher M, Wagner U, Rossol M (2019) Perturbation of the monocyte compartment in human obesity. *Front Immunol* 10: 1874
- Gruber C (2020) Impaired interferon signature in severe COVID-19. *Nat Rev Immunol* 20: 353
- Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Pere H, Charbit B, Bondet V, Chenevier-Gobeaux C, Breillat P et al (2020) Impaired type I interferon activity and exacerbated inflammatory responses in severe Covid-19 patients. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.04.19.20068015> [PREPRINT]
- Heng TS, Painter MW; Immunological Genome Project C (2008) The immunological genome project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* 9: 1091–1094.
- Hijdra D, Vorseleers AD, Grutters JC, Claessen AM, Rijkers GT (2013) Phenotypic characterization of human intermediate monocytes. *Front Immunol* 4: 339
- Hoeve MA, Nash AA, Jackson D, Randall RE, Dransfield I (2012) Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PLoS ONE* 7: e29443
- Jardine L, Wiscombe S, Reynolds G, McDonald D, Fuller A, Green K, Filby A, Forrest I, Ruchaud-Sparagano MH, Scott J et al (2019) Lipopolysaccharide inhalation recruits monocytes and dendritic cell subsets to the alveolar airspace. *Nat Commun* 10: 1999
- Julla JB, Ballaire R, Ejlalmanesh T, Gautier JF, Ventecllef N, Alzaid F (2019) Isolation and analysis of human monocytes and adipose tissue macrophages. *Methods Mol Biol* 1951: 33–48
- Kim D, Lee H, Koh J, Ko JS, Yoon BR, Jeon YK, Cho YM, Kim TH, Suh YS, Lee HJ et al (2017) Cytosolic Pellino-1-mediated K63-linked ubiquitination of IRF5 in M1 macrophages regulates glucose intolerance in obesity. *Cell Rep* 20: 832–845
- Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23: 1289–1291
- Koutsakos M, Illing PT, Nguyen THO, Mifsud NA, Crawford JC, Rizzetto S, Eltahla AA, Clemens EB, Sant S, Chua BY et al (2019) Human CD8(+) T cell cross-reactivity across influenza A, B and C viruses. *Nat Immunol* 20: 613–625
- Laviada-Molina HA, Leal-Berumen I, Rodriguez-Ayala E, Bastarrachea RA (2020) Working hypothesis for glucose metabolism and SARS-CoV-2 replication: interplay between the hexosamine pathway and interferon RF5 triggering hyperinflammation. Role of BCG vaccine? *Front Endocrinol* 11: 514
- van der Maaten LJP, Hinton GE (2008) Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res* 9: 2579–2605
- Melzer S, Zachariae S, Bocsi J, Engel C, Loffler M, Tarnok A (2015) Reference intervals for leukocyte subsets in adults: results from a population-based study using 10-color flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 88: 270–281
- Menart-Houtermans B, Rutter R, Nowotny B, Rosenbauer J, Koliaki C, Kahl S, Simon MC, Szendroedi J, Schloot NC, Roden M et al (2014) Leukocyte profiles differ between type 1 and type 2 diabetes and are associated with metabolic phenotypes: results from the German Diabetes Study (GDS). *Diabetes Care* 37: 2326–2333
- Merad M, Martin JC (2020) Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* 20: 355–362
- Park MD (2020) Macrophages: a Trojan horse in COVID-19? *Nat Rev Immunol* 20: 351
- R Core Team (2013) *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing
- Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, Grosse-Dunker G, Heisel I, Hornof F, Jeken J et al (2012) CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 60: 1512–1520
- Sanchez-Torres C, Garcia-Romo GS, Cornejo-Cortes MA, Rivas-Carvalho A, Sanchez-Schmitz G (2001) CD16⁺ and CD16⁻ human blood monocyte subsets differentiate *in vitro* to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4⁺ T cells. *Int Immunol* 13: 1571–1581
- Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, Wang Q, Miao H (2020) Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther* 5: 33
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: e115
- Vangeti S, Gertow J, Yu M, Liu S, Baharom F, Scholz S, Friberg D, Starkhammar M, Ahlberg A, Smed-Sorensen A (2019) Human BLOOD AND TONSIL PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS DISPLAY SIMILAR GENE EXPRESSION PROFILES BUT EXHIBIT DIFFERENTIAL TYPE I IFN responses to influenza A virus infection. *J Immunol* 202: 2069–2081
- Wang Q, Fang P, He R, Li M, Yu H, Zhou L, Yi Y, Wang F, Rong Y, Zhang Y et al (2020a) O-GlcNAc transferase promotes influenza A virus-induced cytokine storm by targeting interferon regulatory factor-5. *Sci Adv* 6: eaaz7086
- Wang Z, Du Z, Zhu F (2020b) Glycosylated hemoglobin is associated with systemic inflammation, hypercoagulability, and prognosis of COVID-19 patients. *Diabetes Res Clin Pract* 164: 108214

- Weiss M, Byrne AJ, Blazek K, Saliba DG, Pease JE, Perocheau D, Feldmann M, Udalova IA (2015) IRF5 controls both acute and chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 11001–11006
- Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, Huang H, Zhang L, Zhou X, Du C et al (2020) Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med* 180: 1–11
- Yang L, Feng D, Bi X, Stone RC, Barnes BJ (2012) Monocytes from Irf5^{-/-} mice have an intrinsic defect in their response to pristane-induced lupus. *J Immunol* 189: 3741–3750
- Yu YA, Malakhau Y, Yu CA, Phelan SJ, Cumming RI, Kan MJ, Mao L, Rajagopal S, Piantadosi CA, Gunn MD (2020) Nonclassical monocytes sense hypoxia, regulate pulmonary vascular remodeling, and promote pulmonary hypertension. *J Immunol* 204: 1474–1485
- Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, Dai T, Zhang T, Lai Y, Wang J et al (2020) COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes, the severity of which correlate with patient outcome. *MedRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042655> [PREPRINT]
- Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, Xu Y, Tian Z (2020) Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 17: 533–535
- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X et al (2020) Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 395: 1054–1062
- Zhu L, She ZG, Cheng X, Qin JJ, Zhang XJ, Cai J, Lei F, Wang H, Xie J, Wang W et al (2020) Association of blood glucose control and outcomes in patients with COVID-19 and pre-existing type 2 diabetes. *Cell Metab* 31: 1068–1077



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

III.CONCLUSION

Le diabète est une maladie métabolique définie par une hyperglycémie chronique, et responsable de complications à long terme micro- ou macro-vasculaires. Le diabète de type 2 regroupe des patients de phénotypes très différents, possiblement liés à des différences de physiopathologie. L'une des différences phénotypiques concerne le risque de survenue de complications à long terme. Ces complications sont connues pour être associées à un état inflammatoire chronique de bas grade endothélial.

Notre hypothèse est qu'il existe un sous-groupe de diabète de type 2 pour lequel l'établissement de l'hyperglycémie chronique pourrait être associé au développement d'un état inflammatoire chronique de bas grade délétère, occasionnant un sûr-risque de complications à long terme.

Cette thèse s'interroge sur le rôle de cellules de l'immunité innée, les monocytes circulants, dans le développement et la chronicisation de cette inflammation de bas grade. Les monocytes peuvent être considérés soit dans leur globalité, soit divisés en trois sous-groupes présentant des réponses inflammatoires différentes.

Dans notre modèle de diabète post-diabète gestationnel, il existe au sein des leucocytes totaux (cellules CD45+ en cytométrie en flux) une augmentation significative du pourcentage d'un sous-type monocyttaire, les monocytes classiques, entre les patientes normo-glycémiques, pré-diabétiques et diabétiques. De la même manière, dans notre population de patients diabétiques hospitaliers, la progression du risque de survenue d'un événement cardiovasculaire est associée à une augmentation significative au sein des leucocytes totaux du pourcentage de monocytes classiques. Les monocytes classiques sont ceux qui sont produits et relâchés par la moelle osseuse, avant de se différencier en monocytes intermédiaires puis non classiques. Ces résultats concordants démontrent bien que dans ces deux cohortes, l'hyperglycémie chronique et une de ses complications, l'athérosclérose, entraînent une augmentation chronique de la production de monocytes par la moelle osseuse. Le niveau d'activation et les caractéristiques de ces monocytes, dans ces deux contextes, doivent encore être documentés par la réalisation complémentaire des transcriptomes et épigénomes des monocytes des différents patients.

En complément de ces deux parties, la survenue brutale de la pandémie de COVID-19, sa pathogénie liée à l'inflammation aigüe et le sûr-risque de morbi-mortalité observé chez les patients diabétiques, nous ont poussé à nous interroger, une fois encore, sur la place potentielle des monocytes dans ce tableau. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que parmi les patients hospitalisés pour pneumopathie hypoxémiante à COVID-19, les patients diabétiques avaient moins de monocytes que les patients non diabétiques ; et que cette différence était portée par un moindre pourcentage de monocytes classiques. Une hypothèse globale serait que l'augmentation chronique, observée précédemment, de la production par la moelle osseuse des monocytes classiques chez les patients diabétiques de type 2 épuiserait la moelle qui ne serait plus capable, face à une agression aigüe, d'augmenter encore plus sa production pour répondre à leur disparition (migration tissulaire, apoptose, différenciation en monocytes intermédiaires et non-classiques).

Nous avons donc montré que l'association entre les monocytes, le diabète et ses complications était réelle. Il reste notamment à mieux la décrire sur les plans transcriptomique et épigénétique, à en étudier le sens et à rechercher l'intérêt de cette connaissance dans la pratique médicale quotidienne (marqueur bio-médical d'un sous-type de diabète, thérapeutique ciblée, etc).

BIBLIOGRAPHIE

1. Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, Martinell M, Dorkhan M, Carlsson A, Vikman P, Prasad RB, Aly DM, Almgren P, Wessman Y, Shaat N, Spéjel P, Mulder H, Lindholm E, Melander O, Hansson O, Malmqvist U, Lernmark Å, Lahti K, Forsén T, Tuomi T, Rosengren AH, Groop L. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018 May;6(5):361-369. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30051-2. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29503172.
2. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121):840-6. doi: 10.1038/nature05482. PMID: 17167471.
3. Kavanagh K, Davis AT, Peters DE, LeGrand AC, Bharadwaj MS, Molina AJ. Regulators of mitochondrial quality control differ in subcutaneous fat of metabolically healthy and unhealthy obese monkeys. *Obesity (Silver Spring).* 2017 Apr;25(4):689-696. doi: 10.1002/oby.21762. Epub 2017 Feb 25. PMID: 28236433; PMCID: PMC5373959.
4. Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology.* 2018 Dec;155(4):407-417. doi: 10.1111/imm.13002. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30229891; PMCID: PMC6230999.
5. Ruggiero AD, Key CC, Kavanagh K. Adipose Tissue Macrophage Polarization in Healthy and Unhealthy Obesity. *Front Nutr.* 2021 Feb 17;8:625331. doi: 10.3389/fnut.2021.625331. PMID: 33681276; PMCID: PMC7925825.
6. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes.* 2007 Jun;56(6):1517-26. doi: 10.2337/db06-1749. Epub 2007 Mar 27. PMID: 17389330.
7. Lee P, Bova R, Schofield L, Bryant W, Dieckmann W, Slattery A, Govendir MA, Emmett L, Greenfield JR. Brown Adipose Tissue Exhibits a Glucose-Responsive Thermogenic Biorhythm in Humans. *Cell Metab.* 2016 Apr 12;23(4):602-9. doi: 10.1016/j.cmet.2016.02.007. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26972823.
8. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007 Jun 28;447(7148):1116-20. doi: 10.1038/nature05894. Epub 2007 May 21. PMID: 17515919; PMCID: PMC2587297.
9. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):175-84. doi: 10.1172/JCI29881. PMID: 17200717; PMCID: PMC1716210.
10. McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J Clin Invest.* 2017 Jan 3;127(1):5-13. doi: 10.1172/JCI88876. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28045397; PMCID: PMC5199693.
11. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin

- resistance. *Nat Med.* 2005 Feb;11(2):191-8. doi: 10.1038/nm1185. Epub 2005 Jan 30. PMID: 15685170.
12. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2005 Feb;11(2):183-90. doi: 10.1038/nm1166. Epub 2005 Jan 30. PMID: 15685173; PMCID: PMC1440292.
 13. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1793-801. doi: 10.1172/JCI29069. Erratum in: *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2308. PMID: 16823477; PMCID: PMC1483173.
 14. Yung JHM, Giacca A. Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Obesity and Type 2 Diabetes. *Cells.* 2020 Mar 13;9(3):706. doi: 10.3390/cells9030706. PMID: 32183037; PMCID: PMC7140703.
 15. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005 May;26(2):19-39. PMID: 16278749; PMCID: PMC1204764.
 16. Choi SM, Tucker DF, Gross DN, Easton RM, DiPilato LM, Dean AS, Monks BR, Birnbaum MJ. Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2010 Nov;30(21):5009-20. doi: 10.1128/MCB.00797-10. Epub 2010 Aug 23. PMID: 20733001; PMCID: PMC2953052.
 17. Unger RH. The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:333-47. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142622. Epub 2002 May 1. PMID: 12471167.
 18. Wende AR, Symons JD, Abel ED. Mechanisms of lipotoxicity in the cardiovascular system. *Curr Hypertens Rep.* 2012 Dec;14(6):517-31. doi: 10.1007/s11906-012-0307-2. PMID: 23054891; PMCID: PMC3491122.
 19. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003 Oct;52(10):2461-74. doi: 10.2337/diabetes.52.10.2461. PMID: 14514628.
 20. Kashyap SR, Belfort R, Berria R, Suraamornkul S, Pratipranawatr T, Finlayson J, Barrentine A, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K. Discordant effects of a chronic physiological increase in plasma FFA on insulin signaling in healthy subjects with or without a family history of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Sep;287(3):E537-46. doi: 10.1152/ajpendo.00541.2003. Epub 2004 May 4. PMID: 15126243.
 21. Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, DeFronzo RA, Jenkinson CP, Mandarino LJ. Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2005 Mar 18;280(11):10290-7. doi: 10.1074/jbc.M408985200. Epub 2004 Dec 14. PMID: 15598661.
 22. Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawatr T, Berria R, DeFronzo RA, Cusi K. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes.* 2005 Jun;54(6):1640-8. doi: 10.2337/diabetes.54.6.1640. PMID: 15919784.

23. Gillingham LG, Harris-Jan S, Jones PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*. 2011 Mar;46(3):209-28. doi: 10.1007/s11745-010-3524-y. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21308420.
24. Robinson LE, Mazurak VC. N-3 polyunsaturated fatty acids: relationship to inflammation in healthy adults and adults exhibiting features of metabolic syndrome. *Lipids*. 2013 Apr;48(4):319-32. doi: 10.1007/s11745-013-3774-6. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23456976.
25. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:219-46. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135846. PMID: 20148674.
26. Bilan PJ, Samokhvalov V, Koshkina A, Schertzer JD, Samaan MC, Klip A. Direct and macrophage-mediated actions of fatty acids causing insulin resistance in muscle cells. *Arch Physiol Biochem*. 2009 Oct;115(4):176-90. doi: 10.1080/13813450903079314. PMID: 19671019.
27. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):3015-25. doi: 10.1172/JCI28898. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17053832; PMCID: PMC1616196.
28. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM. 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*. 2007 Nov 30;282(48):35279-92. doi: 10.1074/jbc.M706762200. Epub 2007 Oct 4. PMID: 17916553.
29. Valma 2019
30. Austin 2018
31. Bouzakri K, Zierath JR. MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance. *J Biol Chem*. 2007 Mar 16;282(11):7783-9. doi: 10.1074/jbc.M608602200. Epub 2007 Jan 16. PMID: 17227768.
32. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF- α . *Arch Physiol Biochem*. 2008 Jul;114(3):183-94. doi: 10.1080/13813450802181047. Erratum in: *Arch Physiol Biochem*. 2009 May;115(2):117. PMID: 18629684.
33. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012 Mar 2;148(5):852-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.017. PMID: 22385956; PMCID: PMC3294420.
34. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1343-51. doi: 10.1172/JCI23621. PMID: 15864352; PMCID: PMC1087172.
35. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*. 2009 Feb 27;284(9):5637-44. doi: 10.1074/jbc.M807616200. Epub 2009 Jan 1. PMID: 19119140; PMCID: PMC2645822.

36. Hirsova P, Ibrahim SH, Gores GJ, Malhi H. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J Lipid Res.* 2016 Oct;57(10):1758-1770. doi: 10.1194/jlr.R066357. Epub 2016 Apr 5. Erratum in: *J Lipid Res.* 2017 Jan;58(1):299. [corrected to Ibrahim SH]. PMID: 27049024; PMCID: PMC5036373.
37. Ralston JC, Lyons CL, Kennedy EB, Kirwan AM, Roche HM. Fatty Acids and NLRP3 Inflammasome-Mediated Inflammation in Metabolic Tissues. *Annu Rev Nutr.* 2017 Aug 21;37:77-102. doi: 10.1146/annurev-nutr-071816-064836. PMID: 28826373.
38. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem.* 2009 May 29;284(22):14809-18. doi: 10.1074/jbc.M901488200. Epub 2009 Mar 30. PMID: 19332540; PMCID: PMC2685662.
39. Seifert EL, Estey C, Xuan JY, Harper ME. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 2010 Feb 19;285(8):5748-58. doi: 10.1074/jbc.M109.026203. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20032466; PMCID: PMC2820802.
40. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006 Sep;7(9):880-5. doi: 10.1038/sj.embor.7400779. PMID: 16953201; PMCID: PMC1559676.
41. Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, De Minicis S, Osterreicher CH, Schnabl B, Seki E, Brenner DA. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice. *Gastroenterology.* 2009 Oct;137(4):1467-1477.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2009.06.045. Epub 2009 Jun 21. PMID: 19549522; PMCID: PMC2757473.
42. Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC. Taurine prevents arsenic-induced cardiac oxidative stress and apoptotic damage: role of NF-kappa B, p38 and JNK MAPK pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Oct 1;240(1):73-87. doi: 10.1016/j.taap.2009.07.008. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19616567.
43. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007 Sep;56(9):2356-70. doi: 10.2337/db06-1650. Epub 2007 Jun 19. PMID: 17579207.
44. Lundberg M, Seiron P, Ingvast S, Korsgren O, Skog O. Insulinitis in human diabetes: a histological evaluation of donor pancreases. *Diabetologia.* 2017 Feb;60(2):346-353. doi: 10.1007/s00125-016-4140-z. Epub 2016 Oct 28. PMID: 27796420; PMCID: PMC6518093.
45. Hou X, Ling Z, Quartier E, Foriers A, Schuit F, Pipeleers D, Van Schravendijk C. Prolonged exposure of pancreatic beta cells to raised glucose concentrations results in increased cellular content of islet amyloid polypeptide precursors. *Diabetologia.* 1999 Feb;42(2):188-94. doi: 10.1007/s001250051138. PMID: 10064099.
46. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T, Nagai R. Saturated fatty acid and

- TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* 2012 Apr 4;15(4):518-33. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.023. Epub 2012 Mar 29. PMID: 22465073.
47. Kahn SE, D'Alessio DA, Schwartz MW, Fujimoto WY, Ensink JW, Taborsky GJ Jr, Porte D Jr. Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by beta-cells. *Diabetes.* 1990 May;39(5):634-8. doi: 10.2337/diab.39.5.634. PMID: 2185112.
 48. Stridsberg M, Sandler S, Wilander E. Cosecretion of islet amyloid polypeptide (IAPP) and insulin from isolated rat pancreatic islets following stimulation or inhibition of beta-cell function. *Regul Pept.* 1993 Jun 11;45(3):363-70. doi: 10.1016/0167-0115(93)90362-c. PMID: 8351401.
 49. Kahn Lancet 2017
 50. Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes.* 2003 Sep;52(9):2304-14. doi: 10.2337/diabetes.52.9.2304. PMID: 12941770.
 51. Westermarck P. Quantitative studies on amyloid in the islets of Langerhans. *Ups J Med Sci.* 1972;77(2):91-4. doi: 10.1517/03009734000000014. PMID: 4116019.
 52. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res.* 1988 Dec;9(4):151-9. PMID: 3073901.
 53. Maedler K, Sergeev P, Ehes JA, Mathe Z, Bosco D, Berney T, Dayer JM, Reinecke M, Halban PA, Donath MY. Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 25;101(21):8138-43. doi: 10.1073/pnas.0305683101. Epub 2004 May 12. PMID: 15141093; PMCID: PMC419570.
 54. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehes JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2007 Apr 12;356(15):1517-26. doi: 10.1056/NEJMoa065213. PMID: 17429083.
 55. Herder C, Dalmas E, Böni-Schnetzler M, Donath MY. The IL-1 Pathway in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2015 Oct;26(10):551-563. doi: 10.1016/j.tem.2015.08.001. PMID: 26412156.
 56. Igoillo-Esteve M, Marselli L, Cunha DA, Ladrière L, Ortis F, Grieco FA, Dotta F, Weir GC, Marchetti P, Eizirik DL, Cnop M. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2010 Jul;53(7):1395-405. doi: 10.1007/s00125-010-1707-y. Epub 2010 Apr 6. Erratum in: *Diabetologia.* 2012 Mar;55(3):863. PMID: 20369226.
 57. Böni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, Prazak R, Kerr-Conte J, Pattou F, Ehes JA, Schuit FC, Donath MY. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology.* 2009 Dec;150(12):5218-29. doi: 10.1210/en.2009-0543. Epub 2009 Oct 9. PMID: 19819943.
 58. Hui Q, Asadi A, Park YJ, Kieffer TJ, Ao Z, Warnock GL, Marzban L. Amyloid formation disrupts the balance between interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in

- human islets. *Mol Metab.* 2017 May 31;6(8):833-844. doi: 10.1016/j.molmet.2017.05.016. PMID: 28752047; PMCID: PMC5518725.
59. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012 Apr 6;336(6077):86-90. doi: 10.1126/science.1219179. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22442384.
 60. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity.* 2016 Mar 15;44(3):439-449. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.024. PMID: 26982352.
 61. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003 Jul;19(1):71-82. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00174-2. PMID: 12871640.
 62. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 1999 Dec;11(6):753-61. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80149-1. PMID: 10626897.
 63. Meshkani R, Vakili S. Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications. *Clin Chim Acta.* 2016 Nov 1;462:77-89. doi: 10.1016/j.cca.2016.08.015. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27570063.
 64. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014 Aug;14(8):571-8. doi: 10.1038/nri3712. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25033907; PMCID: PMC4638219.
 65. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol.* 2011 Oct 25;11(11):788-98. doi: 10.1038/nri3087. PMID: 22025056.
 66. Lee J, Breton G, Oliveira TY, Zhou YJ, Aljoufi A, Pühr S, Cameron MJ, Sékaly RP, Nussenzweig MC, Liu K. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J Exp Med.* 2015 Mar 9;212(3):385-99. doi: 10.1084/jem.20141442. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25687283; PMCID: PMC4354373.
 67. Patel AA, Yona S. Inherited and Environmental Factors Influence Human Monocyte Heterogeneity. *Front Immunol.* 2019 Nov 7;10:2581. doi: 10.3389/fimmu.2019.02581. PMID: 31787976; PMCID: PMC6854020.
 68. Bain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. *J Clin Pathol.* 1996 Aug;49(8):664-6. doi: 10.1136/jcp.49.8.664. PMID: 8881919; PMCID: PMC500612.
 69. Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas MM. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. *Am J Reprod Immunol.* 2004 Jul;52(1):19-26. doi: 10.1111/j.1600-0897.2004.00177.x. PMID: 15214938.
 70. Chen Y, Zhang Y, Zhao G, Chen C, Yang P, Ye S, Tan X. Difference in Leukocyte Composition between Women before and after Menopausal Age, and Distinct Sexual Dimorphism. *PLoS One.* 2016 Sep 22;11(9):e0162953. doi: 10.1371/journal.pone.0162953. PMID: 27657912; PMCID: PMC5033487.

71. Ben-Hur H, Mor G, Insler V, Blickstein I, Amir-Zaltsman Y, Sharp A, Globerson A, Kohen F. Menopause is associated with a significant increase in blood monocyte number and a relative decrease in the expression of estrogen receptors in human peripheral monocytes. *Am J Reprod Immunol*. 1995 Dec;34(6):363-9. doi: 10.1111/j.1600-0897.1995.tb00965.x. PMID: 8607941.
72. Metcalf TU, Cubas RA, Ghneim K, Cartwright MJ, Grevenynghe JV, Richner JM, Olagnier DP, Wilkinson PA, Cameron MJ, Park BS, Hiscott JB, Diamond MS, Wertheimer AM, Nikolich-Zugich J, Haddad EK. Global analyses revealed age-related alterations in innate immune responses after stimulation of pathogen recognition receptors. *Aging Cell*. 2015 Jun;14(3):421-32. doi: 10.1111/accel.12320. Epub 2015 Feb 27. PMID: 25728020; PMCID: PMC4406671.
73. Keller MF, Reiner AP, Okada Y, van Rooij FJ, Johnson AD, Chen MH, Smith AV, Morris AP, Tanaka T, Ferrucci L, Zonderman AB, Lettre G, Harris T, Garcia M, Bandinelli S, Qayyum R, Yanek LR, Becker DM, Becker LC, Kooperberg C, Keating B, Reis J, Tang H, Boerwinkle E, Kamatani Y, Matsuda K, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Liu S, Dehghan A, Felix JF, Hofman A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Franco OH, Longo DL, Singleton AB, Psaty BM, Evans MK, Cupples LA, Rotter JI, O'Donnell CJ, Takahashi A, Wilson JG, Ganesh SK, Nalls MA; CHARGE Hematology; COGENT; BioBank Japan Project (RIKEN) Working Groups. Trans-ethnic meta-analysis of white blood cell phenotypes. *Hum Mol Genet*. 2014 Dec 20;23(25):6944-60. doi: 10.1093/hmg/ddu401. Epub 2014 Aug 5. PMID: 25096241; PMCID: PMC4245044.
74. Khan IM, Pokharel Y, Dadu RT, Lewis DE, Hoogeveen RC, Wu H, Ballantyne CM. Postprandial Monocyte Activation in Individuals With Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Nov;101(11):4195-4204. doi: 10.1210/jc.2016-2732. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27575945; PMCID: PMC5095236.
75. Jordan S, Tung N, Casanova-Acebes M, Chang C, Cantoni C, Zhang D, Wirtz TH, Naik S, Rose SA, Brocker CN, Gainullina A, Hornburg D, Horng S, Maier BB, Cravedi P, LeRoith D, Gonzalez FJ, Meissner F, Ochando J, Rahman A, Chipuk JE, Artyomov MN, Frenette PS, Piccio L, Berres ML, Gallagher EJ, Merad M. Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool. *Cell*. 2019 Aug 22;178(5):1102-1114.e17. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.050. PMID: 31442403; PMCID: PMC7357241.
76. Shephard RJ. Development of the discipline of exercise immunology. *Exerc Immunol Rev*. 2010;16:194-222. PMID: 20839500.
77. Gabriel H, Urhausen A, Brechtel L, Müller HJ, Kindermann W. Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1994;69(2):179-81. doi: 10.1007/BF00609414. PMID: 7805676.
78. Born J, Lange T, Hansen K, Mölle M, Fehm HL. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol*. 1997 May 1;158(9):4454-64. PMID: 9127011.
79. Cuesta M, Boudreau P, Dubeau-Laramée G, Cermakian N, Boivin DB. Simulated Night Shift Disrupts Circadian Rhythms of Immune Functions in Humans. *J Immunol*. 2016 Mar 15;196(6):2466-75. doi: 10.4049/jimmunol.1502422. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26873990.

80. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW. Selective depletion of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol*. 1998 Jun;112(3):501-6. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00617.x. PMID: 9649222; PMCID: PMC1904988.
81. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558. Epub 2010 Jul 13. PMID: 20628149.
82. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011 Aug 4;118(5):e16-31. doi: 10.1182/blood-2010-12-326355. Epub 2011 Jun 7. PMID: 21653326.
83. Tak T, Drylewicz J, Conemans L, de Boer RJ, Koenderman L, Borghans JAM, Tesselaar K. Circulatory and maturation kinetics of human monocyte subsets in vivo. *Blood*. 2017 Sep 21;130(12):1474-1477. doi: 10.1182/blood-2017-03-771261. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28743715.
84. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, Bigley V, Flavell RA, Gilroy DW, Asquith B, Macallan D, Yona S. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med*. 2017 Jul 3;214(7):1913-1923. doi: 10.1084/jem.20170355. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28606987; PMCID: PMC5502436.
85. Varol C, Yona S, Jung S. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol*. 2009 Jan;87(1):30-8. doi: 10.1038/icb.2008.90. Epub 2008 Dec 2. PMID: 19048016.
86. Tamoutounour S, Guillemins M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, Pollet E, Ardouin L, Luche H, Sanchez C, Dalod M, Malissen B, Henri S. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*. 2013 Nov 14;39(5):925-38. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.004. Epub 2013 Oct 31. PMID: 24184057.
87. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat AM. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*. 2014 Oct;15(10):929-937. doi: 10.1038/ni.2967. Epub 2014 Aug 24. Erratum in: *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1090. PMID: 25151491; PMCID: PMC4169290.
88. Guillemins M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*. 2014 Aug;14(8):571-8. doi: 10.1038/nri3712. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25033907; PMCID: PMC4638219.
89. Menezes S, Melandri D, Anselmi G, Perchet T, Loschko J, Dubrot J, Patel R, Gautier EL, Hugues S, Longhi MP, Henry JY, Quezada SA, Lauvau G, Lennon-Duménil AM, Gutiérrez-Martínez E, Bessis A, Gomez-Perdiguero E, Jacome-Galarza CE, Garner H, Geissmann F, Golub R, Nussenzweig MC, Guermónprez P. The Heterogeneity of Ly6C^{hi} Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS⁺ Macrophages or

- Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity*. 2016 Dec 20;45(6):1205-1218. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.001. PMID: 28002729; PMCID: PMC5196026.
90. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 10;11(11):762-74. doi: 10.1038/nri3070. PMID: 21984070; PMCID: PMC3947780.
91. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, Chalasani G, Taboas JM, Lakkis FG, Metes DM. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One*. 2017 Apr 26;12(4):e0176460. doi: 10.1371/journal.pone.0176460. PMID: 28445506; PMCID: PMC5406034.
92. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, Schultze JL. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2019 Aug 30;10:2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035. PMID: 31543877; PMCID: PMC6728754.
93. Schmidl C, Renner K, Peter K, Eder R, Lassmann T, Balwierz PJ, Itoh M, Nagao-Sato S, Kawaji H, Carninci P, Suzuki H, Hayashizaki Y, Andreessen R, Hume DA, Hoffmann P, Forrest AR, Kreutz MP, Edinger M, Rehli M; FANTOM consortium. Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. *Blood*. 2014 Apr 24;123(17):e90-9. doi: 10.1182/blood-2013-02-484188. Epub 2014 Mar 26. PMID: 24671955.
94. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):375-86. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.012. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20832340; PMCID: PMC3063338.
95. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3536-42. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3536. PMID: 11907116.
96. Kussick SJ, Wood BL. Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Sep;127(9):1140-7. doi: 10.5858/2003-127-1140-UCFCTI. PMID: 12946231.
97. Xing Z, Han J, Hao X, Wang J, Jiang C, Hao Y, Wang H, Wu X, Shen L, Dong X, Li T, Li G, Zhang J, Hou X, Zeng H. Immature monocytes contribute to cardiopulmonary bypass-induced acute lung injury by generating inflammatory descendants. *Thorax*. 2017 Mar;72(3):245-255. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-208023. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27660037.
98. Grossmann V, Schmitt VH, Zeller T, Panova-Noeva M, Schulz A, Laubert-Reh D, Juenger C, Schnabel RB, Abt TG, Laskowski R, Wiltink J, Schulz E, Blankenberg S, Lackner KJ, Münzel T, Wild PS. Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Jul;38(7):1356-64. doi: 10.2337/dc14-3008. Epub 2015 Apr 15. PMID: 25877811.
99. Fiorentino TV, Hribal ML, Perticone M, Andreozzi F, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. Unfavorable inflammatory profile in adults at risk of type 2 diabetes identified by hemoglobin A1c levels according to the American Diabetes Association criteria. *Acta*

- Diabetol. 2015 Apr;52(2):349-56. doi: 10.1007/s00592-014-0647-2. Epub 2014 Sep 23. PMID: 25246028.
100. Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA, Cheng WJ, Maisa A, Landay AL, Jaworowski A, Crowe SM. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell*. 2012 Oct;11(5):867-75. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00851.x. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22708967.
 101. Appleby LJ, Nausch N, Midzi N, Mduluzza T, Allen JE, Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol Lett*. 2013 Apr;152(1):32-41. doi: 10.1016/j.imlet.2013.03.004. Epub 2013 Apr 1. PMID: 23557598; PMCID: PMC3684771.
 102. Ong SM, Hadadi E, Dang TM, Yeap WH, Tan CT, Ng TP, Larbi A, Wong SC. The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 15;9(3):266. doi: 10.1038/s41419-018-0327-1. PMID: 29449647; PMCID: PMC5833376.
 103. Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK, Nishanian P, Fahey JL. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp Gerontol*. 1999 Dec;34(8):959-70. doi: 10.1016/s0531-5565(99)00065-0. PMID: 10673149.
 104. Kühnert M, Strohmeier R, Stegmüller M, Halberstadt E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998 Feb;76(2):147-51. doi: 10.1016/s0301-2115(97)00180-2. PMID: 9481564.
 105. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Santema J, Faas MM. Endotoxin-induced cytokine production of monocytes of third-trimester pregnant women compared with women in the follicular phase of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Apr;188(4):1073-7. doi: 10.1067/mob.2003.263. PMID: 12712113.
 106. Melgert BN, Spaans F, Borghuis T, Klok PA, Groen B, Bolt A, de Vos P, van Pampus MG, Wong TY, van Goor H, Bakker WW, Faas MM. Pregnancy and preeclampsia affect monocyte subsets in humans and rats. *PLoS One*. 2012;7(9):e45229. doi: 10.1371/journal.pone.0045229. Epub 2012 Sep 13. PMID: 23028864; PMCID: PMC3441708.
 107. Faas MM, Spaans F, De Vos P. Monocytes and macrophages in pregnancy and preeclampsia. *Front Immunol*. 2014 Jun 30;5:298. doi: 10.3389/fimmu.2014.00298. PMID: 25071761; PMCID: PMC4074993.
 108. Angelo AGS, Neves CTC, Lobo TF, Godoy RVC, Ono É, Mattar R, Daher S. Monocyte profile in peripheral blood of gestational diabetes mellitus patients. *Cytokine*. 2018 Jul;107:79-84. doi: 10.1016/j.cyto.2017.11.017. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29241982.
 109. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep*. 2015 Sep 11;5:13886. doi: 10.1038/srep13886. PMID: 26358827; PMCID: PMC4566081.
 110. Slevin SM, Denny MC, Connaughton EP, Ribeiro A, Ceredig R, Griffin MD, Egan LJ. Infliximab Selectively Modulates the Circulating Blood Monocyte Repertoire in

- Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Dec;22(12):2863-2878. doi: 10.1097/MIB.0000000000000964. PMID: 27824651.
111. Kowal K, Moniuszko M, Dabrowska M, Bodzenta-Lukaszyk A. Allergen challenge differentially affects the number of circulating monocyte subsets. *Scand J Immunol*. 2012 May;75(5):531-9. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02685.x. PMID: 22260220.
 112. Wijngaarden S, van Roon JA, Bijlsma JW, van de Winkel JG, Lafeber FP. Fcγ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 May;42(5):681-8. doi: 10.1093/rheumatology/keg174. PMID: 12709546.
 113. Poitou C, Dalmas E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdenmour M, Kahn JF, Veyrie N, Rizkalla S, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Clément K, Cremer I. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Oct;31(10):2322-30. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.230979. Epub 2011 Jul 28. PMID: 21799175.
 114. Christou KA, Christou GA, Karamoutsios A, Vartholomatos G, Gartzonika K, Tsatsoulis A, Tigas S. Metabolically Healthy Obesity Is Characterized by a Proinflammatory Phenotype of Circulating Monocyte Subsets. *Metab Syndr Relat Disord*. 2019 Jun;17(5):259-265. doi: 10.1089/met.2018.0132. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30864887.
 115. Krinninger P, Ensenauer R, Ehlers K, Rauh K, Stoll J, Krauss-Etschmann S, Hauner H, Laumen H. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jul;99(7):2500-9. doi: 10.1210/jc.2013-2611. Epub 2014 Feb 25. PMID: 24606068.
 116. Devèvre EF, Renovato-Martins M, Clément K, Sautès-Fridman C, Cremer I, Poitou C. Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J Immunol*. 2015 Apr 15;194(8):3917-23. doi: 10.4049/jimmunol.1402655. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25786686.
 117. Chelombitko MA, Shishkina VS, Ilyinskaya OP, Kaminyi AI, Pavlunina TO, Samovilova NN, Gracheva EV, Tararak EM, Prokazova NV. A cytofluorometric study of membrane rafts in human monocyte subsets in atherosclerosis. *Acta Naturae*. 2014 Oct;6(4):80-8. PMID: 25558398; PMCID: PMC4273095.
 118. Williams H, Cassorla G, Pertsoulis N, Patel V, Vicaretti M, Marmash N, Hitos K, Fletcher JP, Medbury HJ. Human classical monocytes display unbalanced M1/M2 phenotype with increased atherosclerotic risk and presence of disease. *Int Angiol*. 2017 Apr;36(2):145-155. doi: 10.23736/S0392-9590.16.03661-0. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26871397.
 119. Xiang Y, Liang B, Zhang X, Zheng F. Lower HDL-C levels are associated with higher expressions of CD16 on monocyte subsets in coronary atherosclerosis. *Int J Med Sci*. 2020 Aug 1;17(14):2171-2179. doi: 10.7150/ijms.47998. PMID: 32922178; PMCID: PMC7484662.
 120. ADA-Diabetes Care 2020

121. Forouhi NG, Luan J, Hennings S, Wareham NJ. Incidence of Type 2 diabetes in England and its association with baseline impaired fasting glucose: the Ely study 1990-2000. *Diabet Med*. 2007 Feb;24(2):200-7. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02068.x. PMID: 17257284.
122. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, Zinman B; American Diabetes Association. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care*. 2007 Mar;30(3):753-9. doi: 10.2337/dc07-9920. PMID: 17327355.
123. Diabetes Prevention Program Research Group, Knowler WC, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, Brenneman AT, Brown-Friday JO, Goldberg R, Venditti E, Nathan DM. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*. 2009 Nov 14;374(9702):1677-86. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61457-4. Epub 2009 Oct 29. Erratum in: *Lancet*. 2009 Dec 19;374(9707):2054. PMID: 19878986; PMCID: PMC3135022.
124. DeFronzo RA, Tripathy D, Schwenke DC, Banerji M, Bray GA, Buchanan TA, Clement SC, Henry RR, Hodis HN, Kitabchi AE, Mack WJ, Mudaliar S, Ratner RE, Williams K, Stentz FB, Musi N, Reaven PD; ACT NOW Study. Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2011 Mar 24;364(12):1104-15. doi: 10.1056/NEJMoa1010949. Erratum in: *N Engl J Med*. 2011 Jul 14;365(2):189. Erratum in: *N Engl J Med*. 2011 Sep 1;365(9):869. PMID: 21428766.
125. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011 Jul 2;378(9785):31-40. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60679-X. Epub 2011 Jun 24. PMID: 21705069.
126. Katikireddi SV, Morling JR, Bhopal R. Is there a divergence in time trends in the prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes? A systematic review in South Asian populations. *Int J Epidemiol*. 2011 Dec;40(6):1542-53. doi: 10.1093/ije/dyr159. Epub 2011 Oct 26. PMID: 22158665.
127. IDF Diabetes Atlas 2011
128. Sattar N, McConnachie A, Ford I, Gaw A, Cleland SJ, Forouhi NG, McFarlane P, Shepherd J, Cobbe S, Packard C. Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):984-91. doi: 10.2337/db06-1256. PMID: 17395744.
129. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet*. 2009 Jun 27;373(9682):2215-21. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60619-X. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19515410; PMCID: PMC2726723.

130. Ferrannini E, Camastra S, Gastaldelli A, Maria Sironi A, Natali A, Muscelli E, Mingrone G, Mari A. beta-cell function in obesity: effects of weight loss. *Diabetes*. 2004 Dec;53 Suppl 3:S26-33. doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.s26. PMID: 15561918.
131. Mason CC, Hanson RL, Knowler WC. Progression to type 2 diabetes characterized by moderate then rapid glucose increases. *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):2054-61. doi: 10.2337/db07-0053. Epub 2007 May 1. PMID: 17473220.
132. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 1991 Dec;165(6 Pt 1):1667-72. doi: 10.1016/0002-9378(91)90012-g. PMID: 1750458.
133. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in basal hepatic glucose production and suppression during insulin infusion in normal pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 1992 Oct;167(4 Pt 1):913-9. doi: 10.1016/s0002-9378(12)80011-1. PMID: 1415425.
134. Hay WW Jr. Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2006;117:321-39; discussion 339-40. PMID: 18528484; PMCID: PMC1500912.
135. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 2007 Dec;50(4):938-48. doi: 10.1097/GRF.0b013e31815a5494. PMID: 17982337.
136. Yen SS, Tsai CC, Vela P. Gestational diabetogenesis: quantitative analyses of glucose-insulin interrelationship between normal pregnancy and pregnancy with gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*. 1971 Nov;111(6):792-800. doi: 10.1016/0002-9378(71)90490-x. PMID: 5124732.
137. Kalkhoff RK, Jacobson M, Lemper D. Progesterone, pregnancy and the augmented plasma insulin response. *J Clin Endocrinol Metab*. 1970 Jul;31(1):24-8. doi: 10.1210/jcem-31-1-24. PMID: 4316582.
138. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2207-13. doi: 10.2337/diabetes.51.7.2207. PMID: 12086951.
139. Gillmer MD, Oakley NW, Brooke FM, Beard RW. Metabolic profiles in pregnancy. *Isr J Med Sci*. 1975 Jun;11(6):601-8. PMID: 1158667.
140. Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*. 1990 Apr;162(4):1008-14. doi: 10.1016/0002-9378(90)91306-w. PMID: 2183610.
141. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30 Suppl 2:S112-9. doi: 10.2337/dc07-s202. Erratum in: *Diabetes Care*. 2007 Dec;30(12):3154. PMID: 17596458.

142. Fisher PM, Sutherland HW, Bewsher PD. The insulin response to glucose infusion in normal human pregnancy. *Diabetologia*. 1980 Jul;19(1):15-20. doi: 10.1007/BF00258304. PMID: 6993263.
143. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*. 1993 Feb;132(2):879-87. doi: 10.1210/endo.132.2.8425500. PMID: 8425500.
144. Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology*. 1995 Dec;136(12):5461-8. doi: 10.1210/endo.136.12.7588296. PMID: 7588296.
145. Drynda R, Peters CJ, Jones PM, Bowe JE. The role of non-placental signals in the adaptation of islets to pregnancy. *Horm Metab Res*. 2015 Jan;47(1):64-71. doi: 10.1055/s-0034-1395691. Epub 2014 Dec 15. PMID: 25506682.
146. Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS. β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab*. 2016 Sep;18 Suppl 1(Suppl 1):63-70. doi: 10.1111/dom.12716. PMID: 27615133; PMCID: PMC5384851.
147. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*. 2002 Oct;25(10):1862-8. doi: 10.2337/diacare.25.10.1862. PMID: 12351492.
148. Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2016 Sep;84:1-7. doi: 10.1016/j.vph.2016.05.013. Epub 2016 May 30. PMID: 27256928.
149. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):204-12. doi: 10.1038/ni.2001. PMID: 21321594.
150. Zerneck A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Nov;28(11):1897-908. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.161174. Epub 2008 Jun 19. PMID: 18566299.
151. Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 2000 Jul 21;87(2):153-9. doi: 10.1161/01.res.87.2.153. PMID: 10904000.
152. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Jul;31(7):1506-16. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221127. PMID: 21677293; PMCID: PMC3133596.
153. Ikeda U, Matsui K, Murakami Y, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol*. 2002 Apr;25(4):143-7. doi: 10.1002/clc.4960250403. PMID: 12000070; PMCID: PMC6654294.
154. Ylä-Herttua S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 15;88(12):5252-6. doi: 10.1073/pnas.88.12.5252. PMID: 2052604; PMCID: PMC51850.

155. Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age : current knowledge and future challenges. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S282-6. doi: 10.1194/jlr.R800066-JLR200. Epub 2008 Dec 11. PMID: 19074372; PMCID: PMC2674758.
156. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49982-8. doi: 10.1074/jbc.M209649200. Epub 2002 Oct 9. PMID: 12376530.
157. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. doi: 10.1038/nature01323. PMID: 12490960.
158. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 2005 Jan;85(1):1-31. doi: 10.1152/physrev.00048.2003. PMID: 15618476.
159. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Sep 20;46(6):937-54. doi: 10.1016/j.jacc.2005.03.074. PMID: 16168274.
160. Criqui MH, Denenberg JO, Ix JH, McClelland RL, Wassel CL, Rifkin DE, Carr JJ, Budoff MJ, Allison MA. Calcium density of coronary artery plaque and risk of incident cardiovascular events. *JAMA.* 2014 Jan 15;311(3):271-8. doi: 10.1001/jama.2013.282535. Erratum in: *JAMA.* 2015 Apr 7;313(13):1374. PMID: 24247483; PMCID: PMC4091626.
161. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* 1990 Mar 15;15(4):827-32. doi: 10.1016/0735-1097(90)90282-t. PMID: 2407762.
162. von Scholten BJ, Reinhard H, Hansen TW, Schalkwijk CG, Stehouwer C, Parving HH, Jacobsen PK, Rossing P. Markers of inflammation and endothelial dysfunction are associated with incident cardiovascular disease, all-cause mortality, and progression of coronary calcification in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *J Diabetes Complications.* 2016 Mar;30(2):248-55. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.11.005. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26651261.
163. Williams H, Cassorla G, Pertsoulis N, Patel V, Vicaretti M, Marmash N, Hitos K, Fletcher JP, Medbury HJ. Human classical monocytes display unbalanced M1/M2 phenotype with increased atherosclerotic risk and presence of disease. *Int Angiol.* 2017 Apr;36(2):145-155. doi: 10.23736/S0392-9590.16.03661-0. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26871397.
164. Chelombitko MA, Shishkina VS, Ilyinskaya OP, Kaminnyi AI, Pavlunina TO, Samoilova NN, Gracheva EV, Tararak EM, Prokazova NV. A cytofluorometric study of membrane rafts in human monocyte subsets in atherosclerosis. *Acta Naturae.* 2014 Oct;6(4):80-8. PMID: 25558398; PMCID: PMC4273095.
165. Xiang Y, Liang B, Zhang X, Zheng F. Lower HDL-C levels are associated with higher expressions of CD16 on monocyte subsets in coronary atherosclerosis. *Int J Med Sci.*

2020 Aug 1;17(14):2171-2179. doi: 10.7150/ijms.47998. PMID: 32922178; PMCID: PMC7484662.

166. Jaipersad AS, Shantsila A, Lip GY, Shantsila E. Expression of monocyte subsets and angiogenic markers in relation to carotid plaque neovascularization in patients with pre-existing coronary artery disease and carotid stenosis. *Ann Med*. 2014 Nov;46(7):530-8. doi: 10.3109/07853890.2014.931101. Epub 2014 Jul 11. PMID: 25012963.
167. Czepluch FS, Kuschicke H, Dellas C, Riggert J, Hasenfuss G, Schäfer K. Atheroprotective Krüppel-like factor 4 is downregulated in monocyte subsets of patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2013 Nov;110(5):1080-2. doi: 10.1160/TH13-05-0367. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23884216.
168. Czepluch FS, Kuschicke H, Dellas C, Riggert J, Hasenfuss G, Schäfer K. Increased proatherogenic monocyte-platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med*. 2014 Feb;275(2):144-54. doi: 10.1111/joim.12145. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24118494.
169. Shantsila E, Tapp LD, Wrigley BJ, Pamukcu B, Apostolakis S, Montoro-García S, Lip GY. Monocyte subsets in coronary artery disease and their associations with markers of inflammation and fibrinolysis. *Atherosclerosis*. 2014 May;234(1):4-10. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.009. Epub 2014 Feb 20. PMID: 24583499.
170. Tallone T, Turconi G, Soldati G, Pedrazzini G, Moccetti T, Vassalli G. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011 Apr;4(2):211-9. doi: 10.1007/s12265-011-9256-4. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21308491.
171. Shantsila E, Wrigley B, Tapp L, Apostolakis S, Montoro-Garcia S, Drayson MT, Lip GY. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *J Thromb Haemost*. 2011 May;9(5):1056-66. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04244.x. PMID: 21342432.
172. Zhou X, Liu XL, Ji WJ, Liu JX, Guo ZZ, Ren D, Ma YQ, Zeng S, Xu ZW, Li HX, Wang PP, Zhang Z, Li YM, Benefield BC, Zawada AM, Thorp EB, Lee DC, Heine GH. The Kinetics of Circulating Monocyte Subsets and Monocyte-Platelet Aggregates in the Acute Phase of ST-Elevation Myocardial Infarction: Associations with 2-Year Cardiovascular Events. *Medicine (Baltimore)*. 2016 May;95(18):e3466. doi: 10.1097/MD.0000000000003466. PMID: 27149446; PMCID: PMC4863763.
173. Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol*. 2015 Jun;27(6):269-80. doi: 10.1093/intimm/dxv013. Epub 2015 Mar 26. Erratum in: *Int Immunol*. 2017 May 1;29(5):243-244. PMID: 25813515.
174. Lillywhite HB. Water relations of tetrapod integument. *J Exp Biol*. 2006 Jan;209(Pt 2):202-26. doi: 10.1242/jeb.02007. PMID: 16391344.
175. Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci*. 2005 Feb;6(1):35-51. doi: 10.2174/1389203053027494. PMID: 15638767.
176. Romo *Immunology* 2015

177. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol.* 2018;1803:57-79. doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4_5. PMID: 29882133.
178. Roubille F, Cayla G, Picot MC, Pradet V, Massin F, Gervasoni R, Pasquie JL, Macia JC, Piot C, Leclercq F. Intérêt de la C-reactive protein (CRP) dans l'évaluation pronostique de l'infarctus du myocarde revascularisé [C-reactive protein (CRP) after revascularized STEMI: is CRP a prognostic factor?]. *Rev Med Interne.* 2008 Nov;29(11):868-74. French. doi: 10.1016/j.revmed.2008.01.026. Epub 2008 Apr 3. PMID: 18394761.
179. Combe B. Les facteurs de pronostic des rhumatismes inflammatoires au début de la maladie [Prognostic factors in early inflammatory arthritis]. *Rev Med Interne.* 1996;17(3):224-30. French. doi: 10.1016/0248-8663(96)81249-5. PMID: 8734144.
180. Schillaci G, Pirro M. C-reactive protein in hypertension: clinical significance and predictive value. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Oct;16(7):500-8. doi: 10.1016/j.numecd.2006.05.001. Epub 2006 Sep 18. PMID: 16979884.
181. Zhang Z, Ni H. C-reactive protein as a predictor of mortality in critically ill patients: a meta-analysis and systematic review. *Anaesth Intensive Care.* 2011 Sep;39(5):854-61. doi: 10.1177/0310057X1103900509. PMID: 21970129.
182. Avan A, Tavakoly Sany SB, Ghayour-Mobarhan M, Rahimi HR, Tajfard M, Ferns G. Serum C-reactive protein in the prediction of cardiovascular diseases: Overview of the latest clinical studies and public health practice. *J Cell Physiol.* 2018 Nov;233(11):8508-8525. doi: 10.1002/jcp.26791. Epub 2018 Jun 22. PMID: 29932219.
183. Butler CC, Gillespie D, White P, Bates J, Lowe R, Thomas-Jones E, Wootton M, Hood K, Phillips R, Melbye H, Llor C, Cals JWL, Naik G, Kirby N, Gal M, Riga E, Francis NA. C-Reactive Protein Testing to Guide Antibiotic Prescribing for COPD Exacerbations. *N Engl J Med.* 2019 Jul 11;381(2):111-120. doi: 10.1056/NEJMoa1803185. PMID: 31291514.
184. Jiang W, Zhang L, Lang R, Li Z, Gilkeson G. Sex differences in monocyte activation in systemic lupus erythematosus (SLE). *PLoS One.* 2014 Dec 8;9(12):e114589. doi: 10.1371/journal.pone.0114589. PMID: 25485543; PMCID: PMC4259347.
185. Qin Y, Peña G, Morcillo P, Singh S, Mosenthal AC, Livingston DH, Spolarics Z. X-Linked IRAK1 Polymorphism is Associated with Sex-Related Differences in Polymorphonuclear Granulocyte and Monocyte Activation and Response Variabilities. *Shock.* 2020 Apr;53(4):434-441. doi: 10.1097/SHK.0000000000001404. PMID: 31306349; PMCID: PMC6952590.
186. Friedrich K, Sommer M, Strobel S, Thrum S, Blüher M, Wagner U, Rossol M. Perturbation of the Monocyte Compartment in Human Obesity. *Front Immunol.* 2019 Aug 8;10:1874. doi: 10.3389/fimmu.2019.01874. PMID: 31440251; PMCID: PMC6694869.
187. Jensen EJ, Pedersen B, Narvestadt E, Dahl R. Blood eosinophil and monocyte counts are related to smoking and lung function. *Respir Med.* 1998 Jan;92(1):63-9. doi: 10.1016/s0954-6111(98)90034-8. PMID: 9519227.
188. Stadler N, Eggermann J, Vöö S, Kranz A, Waltenberger J. Smoking-induced monocyte dysfunction is reversed by vitamin C supplementation in vivo. *Arterioscler Thromb*

- Vasc Biol. 2007 Jan;27(1):120-6. doi: 10.1161/01.ATV.0000250614.97896.4c. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17053168.
189. Çekici Y, Yılmaz M, Seçen Ö. New inflammatory indicators: association of high eosinophil-to-lymphocyte ratio and low lymphocyte-to-monocyte ratio with smoking. *J Int Med Res.* 2019 Sep;47(9):4292-4303. doi: 10.1177/0300060519862077. Epub 2019 Jul 18. PMID: 31319727; PMCID: PMC6753567.
 190. Gouveia TDS, Trevisan IB, Santos CP, Silva BSA, Ramos EMC, Proença M, Ramos D. Smoking history: relationships with inflammatory markers, metabolic markers, body composition, muscle strength, and cardiopulmonary capacity in current smokers. *J Bras Pneumol.* 2020 Jun 15;46(5):e20180353. doi: 10.36416/1806-3756/e20180353. PMID: 32556029; PMCID: PMC7572273.
 191. Mutsaers HA, Stribos EG, Glorieux G, Vanholder R, Olinga P. Chronic Kidney Disease and Fibrosis: The Role of Uremic Retention Solutes. *Front Med (Lausanne).* 2015 Aug 31;2:60. doi: 10.3389/fmed.2015.00060. PMID: 26380262; PMCID: PMC4553389.
 192. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39(1-3):84-92. doi: 10.1159/000368940. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25662331.
 193. Ong SM, Hadadi E, Dang TM, Yeap WH, Tan CT, Ng TP, Larbi A, Wong SC. The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 15;9(3):266. doi: 10.1038/s41419-018-0327-1. PMID: 29449647; PMCID: PMC5833376.
 194. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes - Diabetes Care 2020
 195. Olivares R, Ducimetière P, Claude JR. Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? *Am J Epidemiol.* 1993 Jan 1;137(1):49-53. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a116601. PMID: 8434572.
 196. Patiño R, Ibarra J, Rodriguez A, Yagüe MR, Pintor E, Fernandez-Cruz A, Figueredo A. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol.* 2000 Jun 1;85(11):1288-91. doi: 10.1016/s0002-9149(00)00757-8. PMID: 10831941.
 197. Williams H, Cassorla G, Pertsoulis N, Patel V, Vicaretti M, Marmash N, Hitos K, Fletcher JP, Medbury HJ. Human classical monocytes display unbalanced M1/M2 phenotype with increased atherosclerotic risk and presence of disease. *Int Angiol.* 2017 Apr;36(2):145-155. doi: 10.23736/S0392-9590.16.03661-0. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26871397.
 198. Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost.* 2004 Aug;92(2):419-24. doi: 10.1160/TH04-02-0095. PMID: 15269840.
 199. Chelombitko MA, Shishkina VS, Ilyinskaya OP, Kaminni AI, Pavlunina TO, Samovilova NN, Gracheva EV, Tararak EM, Prokazova NV. A cytofluorometric study of membrane

- rafts in human monocyte subsets in atherosclerosis. *Acta Naturae*. 2014 Oct;6(4):80-8. PMID: 25558398; PMCID: PMC4273095.
200. Rogacev KS, Ulrich C, Blömer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Köhler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2010 Feb;31(3):369-76. doi: 10.1093/eurheartj/ehp308. Epub 2009 Aug 17. PMID: 19687164.
201. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, Roth D, Ulrich C, Fliser D, Heine GH. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J*. 2011 Jan;32(1):84-92. doi: 10.1093/eurheartj/ehq371. Epub 2010 Oct 12. PMID: 20943670.
202. Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, Krause M, Schlitt A, Köhler H, Girndt M. CD14⁽⁺⁺⁾CD16⁺ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int*. 2008 Mar;73(5):622-9. doi: 10.1038/sj.ki.5002744. Epub 2007 Dec 26. PMID: 18160960.
203. Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, Nilsson J, Björkbacka H. Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Feb 1;5(1):122-31. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960385. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22238190.
204. Poitou C, Dalmás E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdennour M, Kahn JF, Veyrie N, Rizkalla S, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Clément K, Cremer I. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Oct;31(10):2322-30. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.230979. Epub 2011 Jul 28. PMID: 21799175.
205. Christou KA, Christou GA, Karamoutsios A, Vartholomatos G, Gartzonika K, Tsatsoulis A, Tigas S. Metabolically Healthy Obesity Is Characterized by a Proinflammatory Phenotype of Circulating Monocyte Subsets. *Metab Syndr Relat Disord*. 2019 Jun;17(5):259-265. doi: 10.1089/met.2018.0132. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30864887.
206. Krinninger P, Ensenauer R, Ehlers K, Rauh K, Stoll J, Krauss-Etschmann S, Hauner H, Laumen H. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jul;99(7):2500-9. doi: 10.1210/jc.2013-2611. Epub 2014 Feb 25. PMID: 24606068.
207. Devèvre EF, Renovato-Martins M, Clément K, Sautès-Fridman C, Cremer I, Poitou C. Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J Immunol*. 2015 Apr 15;194(8):3917-23. doi: 10.4049/jimmunol.1402655. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25786686.
208. Razquin C, Toledo E, Clish CB, Ruiz-Canela M, Dennis C, Corella D, Papandreou C, Ros E, Estruch R, Guasch-Ferré M, Gómez-Gracia E, Fitó M, Yu E, Lapetra J, Wang D, Romaguera D, Liang L, Alonso-Gómez A, Deik A, Bullo M, Serra-Majem L, Salas-Salvadó J, Hu FB, Martínez-González MA. Plasma Lipidomic Profiling and Risk of Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial. *Diabetes Care*. 2018 Dec;41(12):2617-2624. doi: 10.2337/dc18-0840. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30327364; PMCID: PMC6245212.

209. Anjani K, Lhomme M, Sokolovska N, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Bouillot JL, Lesnik P, Bedossa P, Kontush A, Clement K, Dugail I, Tordjman J. Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(4):905-12. doi: 10.1016/j.jhep.2014.11.002. Epub 2014 Nov 8. PMID: 25450212.
210. Lappas M, Mundra PA, Wong G, Huynh K, Jinks D, Georgiou HM, Permezel M, Meikle PJ. The prediction of type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus using lipidomics. *Diabetologia*. 2015 Jul;58(7):1436-42. doi: 10.1007/s00125-015-3587-7. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25893729.
211. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017 Sep;1859(9 Pt B):1558-1572. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.04.006. Epub 2017 Apr 11. PMID: 28411170.
212. Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)*. 2010 Oct;88(10):993-1001. doi: 10.1007/s00109-010-0663-9. Epub 2010 Aug 20. PMID: 20725711; PMCID: PMC4319704.
213. Supale S, Li N, Brun T, Maechler P. Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Sep;23(9):477-87. doi: 10.1016/j.tem.2012.06.002. Epub 2012 Jul 4. PMID: 22766318.
214. Newsom SA, Brozinick JT, Kiseljak-Vassiliades K, Strauss AN, Bacon SD, Kerege AA, Bui HH, Sanders P, Siddall P, Wei T, Thomas M, Kuo MS, Nemkov T, D'Alessandro A, Hansen KC, Perreault L, Bergman BC. Skeletal muscle phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are related to insulin sensitivity and respond to acute exercise in humans. *J Appl Physiol (1985)*. 2016 Jun 1;120(11):1355-63. doi: 10.1152/jappphysiol.00664.2015. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27032901; PMCID: PMC4891931.
215. Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A, Vance DE. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006 May;3(5):321-31. doi: 10.1016/j.cmet.2006.03.007. PMID: 16679290.
216. Sui J, He M, Wang Y, Zhao X, He Y, Shi B. Sphingolipid metabolism in type 2 diabetes and associated cardiovascular complications. *Exp Ther Med*. 2019 Nov;18(5):3603-3614. doi: 10.3892/etm.2019.7981. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31602237; PMCID: PMC6777336.
217. Carlsson ER, Grundtvig JLG, Madsbad S, Fenger M. Changes in Serum Sphingomyelin After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery Are Related to Diabetes Status. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Apr 25;9:172. doi: 10.3389/fendo.2018.00172. PMID: 29922223; PMCID: PMC5996901.
218. Schlame M, Ren M. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1788(10):2080-3. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.04.019. Epub 2009 May 4. PMID: 19413994; PMCID: PMC2757492.

219. Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan;292(1):C33-44. doi: 10.1152/ajpcell.00243.2006. Epub 2006 Aug 9. PMID: 16899548.
220. Mileykovskaya E, Zhang M, Dowhan W. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry (Mosc).* 2005 Feb;70(2):154-8. doi: 10.1007/s10541-005-0095-2. PMID: 15807653.
221. Li G, Chen S, Thompson MN, Greenberg ML. New insights into the regulation of cardiolipin biosynthesis in yeast: implications for Barth syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Mar;1771(3):432-41. doi: 10.1016/j.bbaliip.2006.06.007. Epub 2006 Jul 8. PMID: 16904369.
222. Choudhary V, Uaratanawong R, Patel RR, Patel H, Bao W, Hartney B, Cohen E, Chen X, Zhong Q, Isales CM, Bollag WB. Phosphatidylglycerol Inhibits Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation by Danger-Associated Molecular Patterns. *J Invest Dermatol.* 2019 Apr;139(4):868-877. doi: 10.1016/j.jid.2018.10.021. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30391260; PMCID: PMC7309510.
223. Wigger L, Cruciani-Guglielmacci C, Nicolas A, Denom J, Fernandez N, Fumeron F, Marques-Vidal P, Ktorza A, Kramer W, Schulte A, Le Stunff H, Liechti R, Xenarios I, Vollenweider P, Waeber G, Uphues I, Roussel R, Magnan C, Ibberson M, Thorens B. Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans. *Cell Rep.* 2017 Feb 28;18(9):2269-2279. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.019. PMID: 28249170.
224. Brosche T, Platt D. The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage. *Exp Gerontol.* 1998 Aug;33(5):363-9. doi: 10.1016/s0531-5565(98)00014-x. PMID: 9762517.
225. Lee TC. Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 2;1394(2-3):129-45. doi: 10.1016/s0005-2760(98)00107-6. PMID: 9795186.
226. Ikuta A, Sakurai T, Nishimukai M, Takahashi Y, Nagasaka A, Hui SP, Hara H, Chiba H. Composition of plasmalogens in serum lipoproteins from patients with non-alcoholic steatohepatitis and their susceptibility to oxidation. *Clin Chim Acta.* 2019 Jun;493:1-7. doi: 10.1016/j.cca.2019.02.020. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30796899.
227. Moxon JV, Jones RE, Wong G, Weir JM, Mellett NA, Kingwell BA, Meikle PJ, Golledge J. Baseline serum phosphatidylcholine plasmalogen concentrations are inversely associated with incident myocardial infarction in patients with mixed peripheral artery disease presentations. *Atherosclerosis.* 2017 Aug;263:301-308. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.925. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28728066.
228. Maeba R, Araki A, Fujiwara Y. Serum Ethanolamine Plasmalogen and Urine Myo-Inositol as Cognitive Decline Markers. *Adv Clin Chem.* 2018;87:69-111. doi: 10.1016/bs.acc.2018.08.001. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30342713.
229. Brosche T. Plasmalogen phospholipids - facts and theses to their antioxidative qualities. *Arch Gerontol Geriatr.* 1997 Jul-Aug;25(1):73-81. doi: 10.1016/s0167-4943(96)00772-8. PMID: 15374102.
230. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic

and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Mar;55(3):105924. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105924. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32081636; PMCID: PMC7127800.

231. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):363-374. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32346093; PMCID: PMC7187672.
232. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: *Lancet*. 2020 Jan 30;: PMID: 31986264; PMCID: PMC7159299.
233. Zhu L, She ZG, Cheng X, Qin JJ, Zhang XJ, Cai J, Lei F, Wang H, Xie J, Wang W, Li H, Zhang P, Song X, Chen X, Xiang M, Zhang C, Bai L, Xiang D, Chen MM, Liu Y, Yan Y, Liu M, Mao W, Zou J, Liu L, Chen G, Luo P, Xiao B, Zhang C, Zhang Z, Lu Z, Wang J, Lu H, Xia X, Wang D, Liao X, Peng G, Ye P, Yang J, Yuan Y, Huang X, Guo J, Zhang BH, Li H. Association of Blood Glucose Control and Outcomes in Patients with COVID-19 and Pre-existing Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2020 Jun 2;31(6):1068-1077.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2020.04.021. Epub 2020 May 1. PMID: 32369736; PMCID: PMC7252168.



Isolation and Analysis of Human Monocytes and Adipose Tissue Macrophages

Jean-Baptiste Julla, Raphaëlle Ballaire, Tina Ejlalmanesh,
Jean-François Gautier, Nicolas Venteclef, and Fawaz Alzaid

Abstract

Monocytes and macrophages are cells of the innate immune system, existing in circulation and permeating every tissue of the human body. These cells represent the first responders to stress, and their inflammatory activation forms part of virtually every human disease. It is for these reasons that several approaches have been developed in order to phenotypically and functionally analyze these cells and their subpopulations. These inflammatory cells have been consistently demonstrated to undergo inflammatory polarization through the engagement of lipid-activated nuclear receptors, namely, through PPARs and LXRs, which regulate both lipid metabolism and inflammation. Quantitative and phenotypic analyses of monocytes and macrophages are largely dependent on cytometric tools and antibody-based labelling of membrane markers, while functional analyses apply a range of in vitro approaches coupled with secondary analyses of gene or cytokine expression. An important aspect of phenotypic and functional analyses is the purification, enrichment, or appropriate differentiation of biological materials, ensuring experimentation is carried out on monocytes and/or macrophages and not on other cell types occupying the same physical niches. This chapter will focus on the most common analytical approaches applied to the mononuclear phagocytic system, namely, circulating monocytes and adipose tissue macrophages.

Key words Monocytes, Adipose tissue macrophages, Histology, Flow cytometry, Inflammation

1 Introduction

Monocytes and macrophages form a large part of the innate immune system, which provides an immediate and efficient phagocytic response to a variety of insults (bacteria, tissue damage, etc.) and allows presentation of antigens to cells of adaptive immunity [1]. Monocytes and macrophages have been repeatedly demonstrated to undergo polarization through engagement of lipid-activated nuclear receptors (NRs), namely, PPARs and LXRs. PPARs and LXRs are regulated by lipids and in turn regulate lipid metabolism as well as inflammation. NR signalling is an attractive

intervention target for numerous metabolic diseases, namely, atherosclerosis, type 2 diabetes, and obesity [2].

1.1 Analytical Approaches in Isolation and Analysis of Monocytes and Adipose Tissue Macrophages

Several complementary techniques exist for the analyses of monocytes and macrophages: cytometry, imaging, and cell culture coupled to functional analyses such as gene and cytokine expression. These analyses are highly dependent on optimal sample preparation. The *enrichment* of sample material is based on increasing the proportion of target cells without antibody-based selection [3]. Enrichment is generally carried out by density-gradient separation with specifically developed particulate liquids (i.e., Ficoll-Paque™ or Percoll®). Although yielding less purity, density-gradient purification is extremely cost-effective [3].

The alternative to a density gradient is sorting or “immuno-selecting” the population of interest based on lineage markers. Targeted markers are often the same markers applied for cell phenotyping, namely, the cluster of differentiation (CD)-14 for human monocytes and/or CD68 for human macrophages. The selection of these lineage markers is based on the use of the immunological genome (ImmGen) database that sets the standards for lineage markers [4]. Cell sorting refers to real-time sorting by fluorescence- or magnetic-assisted cell sorting (FACS/MACS™; [5]). FACS allows staining with several markers to sort multiple populations from one sample at a time, while MACS™ allows the treatment of several samples in the same assay; however the number of sortable populations/markers used is limited. The advantage of positive sorting is the unbeatable purity, perfectly suited for gene expression analysis or downstream analyses not involving cell stimulation. The disadvantage is that epitope/clone selection is crucial to avoid cell activation; unfortunately even noncompetitive epitopes have been reported to influence cell function [4]. An attempt to get around this problem is the application of lineage markers against unwanted populations and sorting unstained cells. Yielding a purity superior to density-gradient purification, negative sorting is suited to downstream functional applications not be influenced by antibodies (cell culture, adoptive transfer).

1.2 Monocytes: Development, Function, and Classification

Monocytes represent 10% of circulating cells and are characterized by their surface expression of CD14. Monocytes play a direct role in the inflammatory response via phagocytosis, antigen presentation, cytokine secretion, and providing a reservoir of macrophages [8]. Monocytes are derived from bone marrow hematopoietic stem cells via the common myeloid progenitor (CMP) [8]. Their proliferation is under the control of the growth factor CSF-1 (colony-stimulating factor 1). Once bloodborne, migration patterns and infiltration into tissues are driven by cytokine-chemokine signalling (e.g., CCL2) or by PAMP (pathogen-associated

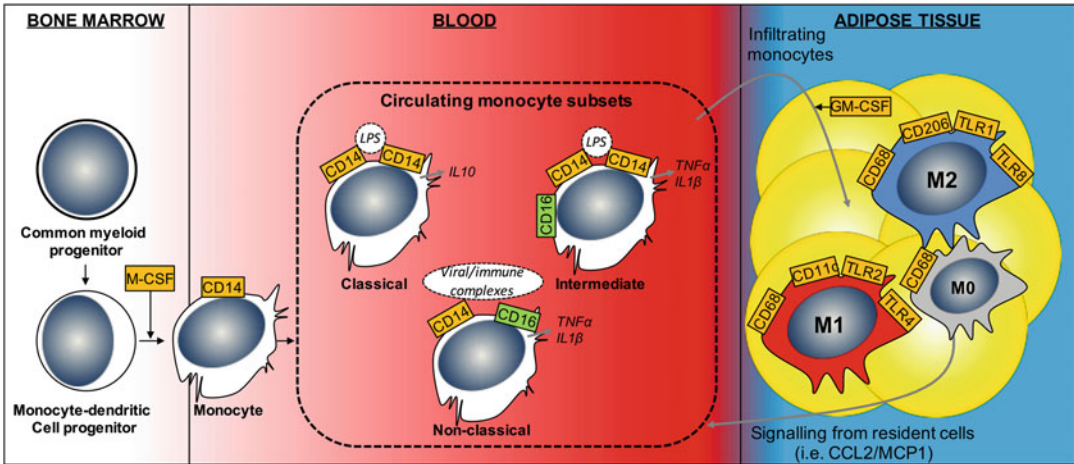


Fig. 1 Monocyte and macrophage development and activation states in humans. Monocytes develop from myeloid progenitor cells in bone marrow and differentiate in circulating monocytes that have three different activation states differentiated by their variable expression of CD14 and the presence of CD16. Adipose tissue macrophages also exhibit a spectrum of activation between M1 (pro-inflammatory) and M2 (anti-inflammatory); M0 macrophages are quiescent. Adipose tissue macrophages participate in the recruitment of monocytes that differentiate in situ into macrophages. Macrophage activation states can be identified through their surface expression of several markers, namely, CD11c for M1 macrophages and CD206 for M2 macrophages

molecular patterns) or DAMP (damage-associated molecular patterns) recognition (Fig. 1). The most well-accepted phenotypic definition depends on variable expression of CD14 and presence or absence of CD16 [9]. Using morphological criteria and these two markers, circulating monocytes can be identified and classified into three distinct subpopulations [9] (Fig. 2):

- *Classical monocytes* ($CD14^{Hi} CD16^{-}$) are the most abundant subpopulation (~80%) and produce anti-inflammatory molecules in response to LPS in vitro and are mainly phagocytic in nature.
- *Intermediate monocytes* ($CD14^{Hi} CD16^{+}$) represent 2 to 11% of monocytes. Their in vitro response to LPS is highly inflammatory, expressing large amounts of TNF and IL-1, yet is poorly phagocytic.
- *Nonclassical monocytes* ($CD14^{Lo} CD16^{+}$) represent 2 to 8% of monocytes. They express Fc receptors that allow phagocytosis and secrete TNF and IL-1 in response to TLR 7/8 ligands (viral and immune complexes containing nucleic acids). Their main function is patrolling blood vessels and monitoring the local environment.

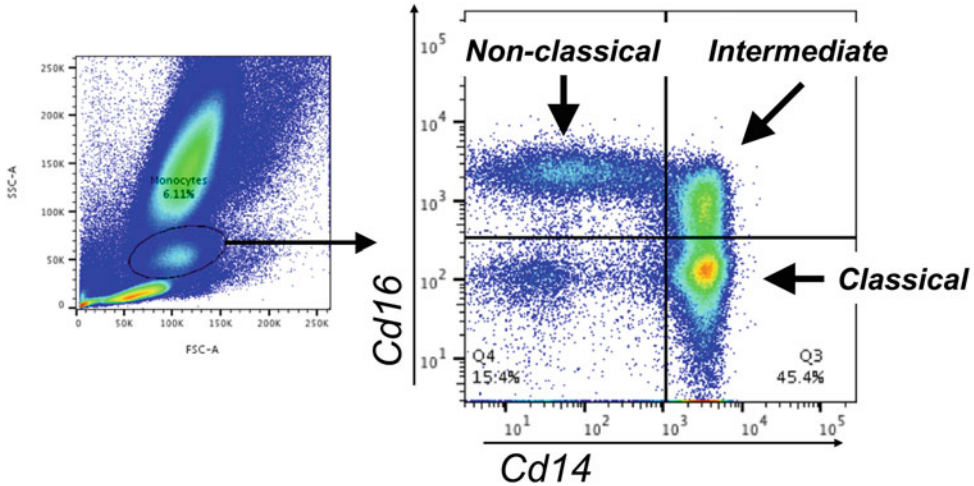


Fig. 2 FACS analysis of human monocytes subsets. Left plot shows morphological gating around monocytes from human blood. Right plot shows monocyte activation states as defined by their variable expression of CD14 and the expression or not of CD16. *CD* cluster of differentiation, *CD14* monocyte marker, *CD16* monocyte activation marker

1.3 Macrophages: Differentiation, Function, and Classification

After infiltration into the tissues, monocytes can differentiate into macrophages through interaction with local growth factors (e.g., GM-CSF), cytokines, DAMPs, or PAMPs. Once differentiated, macrophages are bivalent, meaning unpolarized (M0 state) yet poised to take on pro-inflammatory (M1) or anti-inflammatory polarization (M2). A sliding scale is often observed where tissue macrophages are heterogeneously distributed across these three states [6–10].

M1 macrophages are pro-inflammatory, classically activated by type-1 cytokines (IFN γ , TNF α) or by bacterial or viral stimuli. These macrophages have high microbicidal and antitumor capacity. In conjunction with the pan-macrophage markers such as CD14/68, HLA-DR, and CD11b, CD11c is a standard surface marker of M1 macrophages. M2 denotes anti-inflammatory macrophages, activated by type 2 cytokines (IL-4, IL-13) or exposure to helminths. These macrophages have a high phagocytic capacity and mediate healing and tissue repair. In conjunction with the pan-macrophage markers such as CD14/68, HLA-DR, and CD11b, CD206 is a standard surface marker of M2 macrophages.

1.4 Adipose Tissue Macrophages in Physiology and Pathophysiology

While innate immunity is typically associated with infectious or autoimmune diseases, recent findings highlight an extremely important role in metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes [11]. Adipose tissue is the site of long-term energy storage; the local environment is extremely lipid-rich and is a major sight of lipid-mediated nuclear receptor activation. PPARs

and LXRs have been identified as the main nuclear receptors that are responsive to lipids; they are classically associated with adipogenesis and controlling lipogenic/adipogenic processes. Several studies have now confirmed that the PPARs and LXRs are also active in monocytes and macrophages and mediate their inflammatory activation in response to local lipid homeostasis and signalling [2, 11–13]. The following sections describe the analytical approaches that have been refined over the past decade to quantify, model, and functionally analyze adipose tissue macrophages and their circulating progenitors, monocytes.

2 Materials

Unless otherwise stated, the products listed below are available from several suppliers, with little variation in the quality of materials. In the case of MACS™, this technique was invented by Miltenyi Biotec, and thus their antibodies, kits, and apparatus are considered the gold standard when carrying out this technique.

1. Anticoagulant-coated tubes (heparin or EDTA) (*see Note 1*).
2. Falcon tubes (15 and 50 mL).
3. Phosphate buffered saline (PBS) solution: 1.05 mM KH_2PO_4 , 155 mM NaCl, 1.97 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4 in deionized water.
4. Ficoll-Paque™ solution.
5. Plastic Pasteur pipettes.
6. Red blood cell lysis buffer: 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA in deionized water.
7. Automated cell counter or hemocytometer (*see Note 2*).
8. FACS/MACS™ buffer: PBS + 2% (v/v) calf serum + 1 mM EDTA.
9. CD14 microbeads.
10. Classical monocyte isolation kit (130-117-337, Miltenyi Biotec), components:
 - (a) FcR blocking reagent.
 - (b) Classical monocyte biotin-antibody cocktail.
 - (c) Anti-biotin microbeads.
11. Automated or manual (column and magnetic field-generating separator) magnetic sorters (Miltenyi Biotec).
12. FACS tubes (5 mL polystyrene round-bottom tubes).
13. Parafilm.
14. Rocker.

Table 1
Markers to include in basic phenotypic analysis of human monocytes by flow cytometry

Parameter N°	Epitope (s)/marker (s)	Population
1	Viability	Live cells
2	CD45	Hematopoietic cells
3	CD14	Monocytes
4	CD16	Intermediate and nonclassical monocytes
5	Lineage (CD3, CD19, CD56)	Lymphocytes, B cells, natural killer cells
Size (FSC) Granularity (SSC)	Morphology	Monocytes

When equipped with a four-parameter cytometer, viability and lineage markers may be placed on the same parameter

Table 2
Markers to include in basic phenotypic analysis of human adipose tissue macrophages by flow cytometry

Parameter N°	Epitope (s)/marker (s)	Population
1	Viability	Live cells
2	CD45	Hematopoietic cells/total immune cells
3	CD68	Macrophages
4	CD11c	M1 macrophages
5	CD206	M2 macrophages
6	Lineage (CD3, CD19, CD56, CD31, TE7)	Lymphocytes, B cells, natural killer cells, endothelial cells, fibroblasts
Size (FSC) Granularity (SSC)	Morphology	Cells

When equipped with a five-parameter cytometer, viability and lineage markers may be placed on the same parameter, although care must be taken when interpreting total immune cells as this gate may contain nonviable cells

15. FcR blocking reagent.
16. Aluminum foil.
17. Antibodies and viability stain (*see* Table 1 for blood and Table 2 for adipose tissue macrophages).
18. Cytometer equipped with 4–5 parameters.
19. PBMC cell culture medium: RPMI-glutamine medium +10% (v/v) human serum, 1% (v/v) pyruvate, 1% (v/v) penicillin-streptomycin, 1% (v/v) nonessential amino acids.

20. Low-attachment cell culture plates or flasks (size is dependent on downstream application; for most applications such as RNA and media cytokine analysis, 6-well plates are sufficient).
21. Poly-L-lysine solution (0.1 mg/mL of sterile tissue culture grade water).
22. HMDM differentiation medium (PBMC cell culture medium +20 ng/mL M-CSF).
23. Sterile dissection tools: scissors and forceps.
24. Shaking water bath or temperature-controlled chamber.
25. Cell strainers (200, 70, and 40 μm).
26. Centrifuge (15–50 mL tubes).
27. Microcentrifuge (1.5–2 mL tubes).
28. Collagenase 100 \times stock solution (100 mg/mL mixed collagenase with activity \geq 124 CDU/mg, in PBS + 0.133 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.1 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
29. Sixty millimeter sterile tissue culture dish.
30. Collagenase digestion solution (in DMEM-glutamine, bring collagenase 100 \times stock solution to 1 \times , 1% penicillin-streptomycin solution, 15 mM HEPES, 2% (w/v) bovine serum albumin).

3 Methods

3.1 *Density-Gradient Purification of Human Venous Blood*

Density-gradient purification is carried out to eliminate cells with multilobed nuclei (granulocytes) that constitute 40–50% of circulating cells. The remaining fraction of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) is composed of a majority of lymphocytes and monocytes. PBMC preparation is prepared to enrich sample material for downstream purposes such as cell culture, analysis of rare subpopulations, or sorting.

1. Pool venous blood samples per patient into a 50 mL falcon tube (minimum of 4 mL) (*see Note 1*).
2. Adjust volume to 30 mL with PBS.
3. In a new 50 mL centrifuge tube, deposit 15 mL of Ficoll-Paque™, and gently layer the 30 mL of blood-PBS onto the Ficoll-Paque™ solution taking care not to mix the phases.
4. Centrifuge sample tubes for 30 min, at $800 \times g$ between 18 and 20 °C without acceleration nor deceleration.
5. The white peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ring will form around the 20 mL mark (Fig. 3).
6. Collect this ring with a plastic Pasteur pipette, avoiding the lower layer, and deposit into a new 50 mL centrifuge tube.

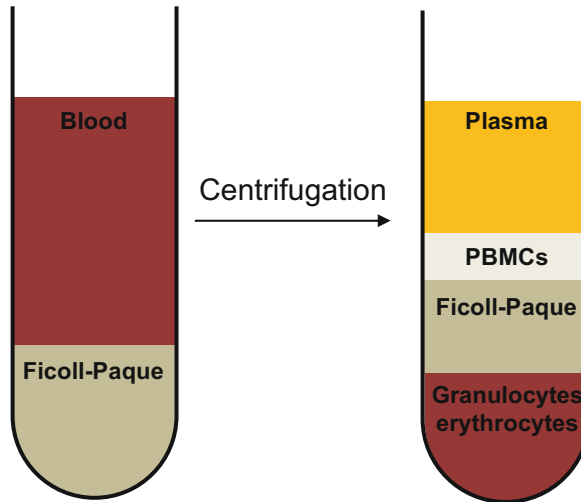


Fig. 3 Ficoll-Paque™ gradient enrichment of PBMCs. Left tube represents Ficoll-Paque™ and blood before centrifugation, and right tube represents separated layers. PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) represent the layer enriched with mononuclear cells (including monocytes)

7. Adjust volume to 30 mL with PBS and centrifuge for 5 min at $350 \times g$ at 4°C .
8. Discard supernatant, and resuspend pellet in 25 mL of red blood cell lysis buffer; incubate at room temperature for 3 min.
9. Centrifuge for 5 min at $350 \times g$ at 4°C .
10. Discard supernatant, resuspend pellet in 25 mL of PBS, and centrifuge for 5 min at $350 \times g$ at 4°C .
11. Discard supernatant and resuspend pellet in PBS, adjusting volume to 10 mL with PBS.
12. Count cells (*see Note 2*), and then proceed for downstream applications (e.g., cell culture, cytometry).

3.2 Antibody-Based Magnetic Sorting of Blood Monocytes

Antibody-based magnetic sorting can be carried out from the PBMC fraction (Subheading 3.1) or from whole blood with the use of the appropriate kits. For sorting from PBMCs, apply the use of CD14 microbeads or classical monocyte isolation kit, depending on the downstream experimental design (*see Note 3*).

3.2.1 CD14 Microbeads for Magnetic Sorting of Monocytes from PBMCs

1. Following PBMC isolation and counting (Subheading 3.1), centrifuge PBMCs at $350 \times g$ in a benchtop centrifuge for 10 min at 4°C .
2. Discard supernatant, and resuspend pellet in 100 μL of CD14 microbead staining solution (80 μL MACS™ buffer + 20 μL CD14 microbeads) per 10^7 cells.
3. Incubate for 15 min at 4°C .

4. Wash cells by adding 2 mL of MACS™ buffer per 10^7 cells, and centrifuge at $350 \times g$ for 10 min at 4 °C.
5. Resuspend cells in 500 μ L MACS™ buffer, and proceed to magnetic sorting (Subheading 3.2.4).

3.2.2 Classical Monocyte Isolation Kit

1. Following PBMC isolation and counting (Subheading 3.1), centrifuge PBMCs at $350 \times g$ for 10 min at 4 °C.
2. Discard supernatant, and resuspend cell pellet in 30 μ L of MACS™ buffer per 10^7 cells.
3. Add 10 μ L of FcR blocking reagent per 10^7 cells.
4. Add 10 μ L of classical monocyte biotin-antibody cocktail per 10^7 cells.
5. Mix well and incubate at room temperature for 5 min.
6. Add 30 μ L of MACS™ buffer per 10^7 cells.
7. Add 20 μ L of anti-biotin microbeads per 10^7 cells.
8. Mix well and incubate at room temperature for an additional 5 min.
9. Proceed to magnetic sorting (Subheading 3.2.4).

3.2.3 CD14 Microbeads for Magnetic Sorting of Monocytes from Whole Blood

1. To 1 mL of whole blood, drawn into an anticoagulant (i.e., heparin or EDTA), add 50 μ L of *whole-blood* CD14 microbeads.
2. Mix well and incubate for 15 min at 4 °C.
3. Optional wash step if sample material is not limiting (*see Note 4*).
4. Proceed to magnetic sorting (Subheading 3.2.4).

3.2.4 Magnetic Sorting

Magnetic sorting is based on the use of microbead-conjugated antibodies that are held in place by a strong magnetic field, while non-labelled cells are washed away. Once the magnetic field is removed, labelled cells become labile and can be eluted. Automated magnetic sorters come with predefined programs; thus this section will describe the process of magnetic selection by the use of manual apparatus.

1. Once cells from Subheadings 3.2.2 and 3.2.3 are washed, resuspend up to 10^8 cells in 500 μ L of MACS™ buffer.
2. Place MACS™ column in the magnetic field of MACS™ separator (*see Note 5*).
3. Prime column by applying 3 mL of MACS™ buffer, and allow column reservoir to empty.
4. Apply cell suspension to column, and allow column reservoir to empty (fraction that flows through is the unlabelled fraction,

containing monocytes when using classical monocyte isolation kit) (*see Note 6*).

5. Rinse column three times with 3 mL of MACS™ buffer each time, waiting for column reservoir to run empty before applying the next 3 mL. Collect flow-through if analysis of negative fraction is desired.
6. Remove column from separator's magnetic field, and place on an appropriate collection tube (> 5 mL).
7. Add 5 mL MACS™ buffer to column, and immediately elute labelled cells by pushing down on the plunger.
8. Centrifuge cells at $300 \times g$ for 10 min at 4 °C, aspirate supernatant, and continue to downstream applications (*see Note 7*).

3.3 Cell Culture and Differentiation

3.3.1 PBMC and Monocyte Cell Culture

1. Following PBMC isolation and counting, centrifuge cells for 5 min at $350 \times g$ at 4 °C.
2. Discard supernatant, and resuspend cells in PBMC culture medium at a concentration of 2×10^6 cells/mL (10^6 cells/mL for selected or enriched monocytes) (*see Note 8*).
3. Seed cells in low-attachment plates for immediate use can be maintained in culture for 72 h to 96 h.
4. For differentiation of monocytes to macrophages, *see* Subheading 3.3.2.

3.3.2 Differentiation to Macrophages (Human Monocyte-Derived Macrophages; HMDM)

1. For differentiating monocytes into macrophages, cells should be seeded into poly-L-lysine (0.1 mg/mL)-coated plates to facilitate cell adherence.
2. Following adherence of cells (2–3 h at 37 °C), replace medium with HMDM differentiation medium.
3. Cells differentiate into macrophages in approximately 10 days (differentiation is visually confirmed; cells are larger and exhibit bright protruding membranes with a central pronounced nucleus). Throughout differentiation, change medium every other day (*see Note 9*).

3.4 Flow Cytometry for Quantitative Analysis of Monocyte Phenotypes

Monocyte phenotyping can be carried out on ~400 µL whole blood. For basic phenotyping of monocytes, a cytometer equipped with 4–5 parameters is sufficient (*see Table 1* for suggested panel setup and Fig. 4 for gating strategy). The in-depth application of flow cytometry is beyond the scope of this chapter, and thus for a detailed insight into the setting up of a cytometer, compensation settings, and antibody titration, please refer to Maecker and Trotter [14]. This protocol can be applied to both whole blood and PBMCs (Subheading 3.1), in which large granular cells will be removed by the density gradient, and thus gating will be more straightforward (*see Note 10*). For carrying out the protocol from

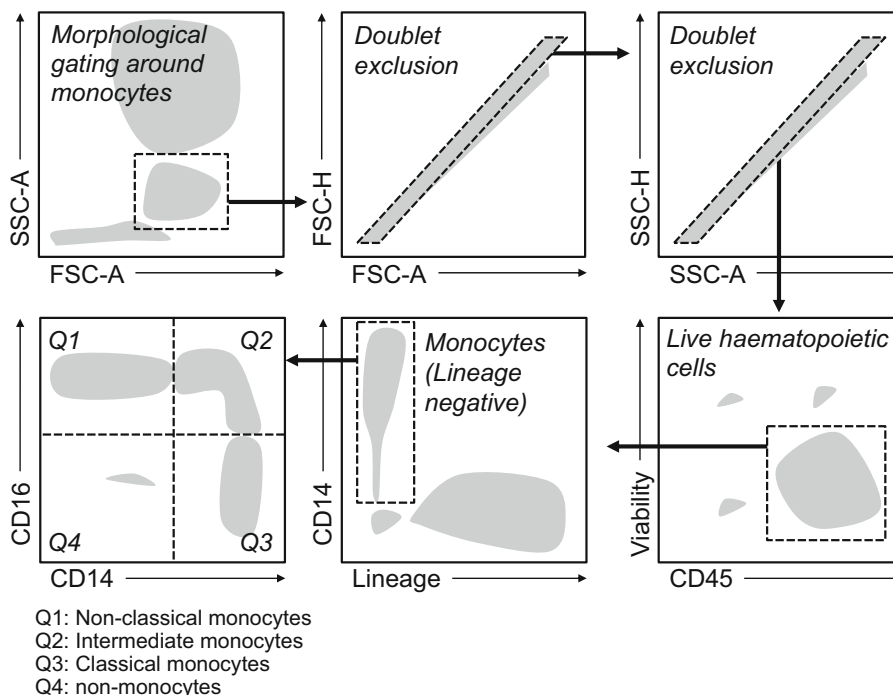


Fig. 4 Gating strategy to be applied for basic analysis of circulating monocytes in humans. *Q1–Q4* quadrants, *FSC* forward scatter, *SSC* side scatter, *-A* area signal, *-H* height signal, *CD* cluster of differentiation, *CD45* hematopoietic cell marker, *CD14* monocyte marker, *CD16* monocyte activation marker

PBMCs, following counting starts at **step 3**. When working with fresh human blood, work under sterile conditions, in a cell culture cabinet dedicated to human material; work rapidly and on ice, unless otherwise stated.

1. After homogenizing whole-blood tubes by repeated pipetting, transfer 400 μL of blood to a FACS tube, and add 4 mL of red blood cell lysis buffer (create a tube of pooled cells from all samples to have a final volume of 400 μL ; this tube will be used for unstained cells) (*see Note 11*).
2. Cap tube and seal with Parafilm, agitate samples horizontally at room temperature for 10 min, and then centrifuge at $350 \times g$ for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$.
3. Discard supernatant, pulse vortex cell pellet, and resuspend in FcR blocking reagent (diluted 1:100 in FACS buffer); incubate on the bench at room temperature for 10 min.
4. Add 2 mL of FACS buffer and centrifuge at $350 \times g$ for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$.
5. Prepare antibody cocktail in FACS buffer, including viability dye, and maintain on ice. Calculate a minimum staining volume of 50 μL per sample. From this point, protect antibodies and samples from light.

6. Discard supernatant following the centrifugation (**step 4**), pulse vortex cell pellet and resuspend cells in antibody cocktail, incubate in the dark at 4 °C for 30–45 min, and resuspend unstained cells in 50 µL FACS buffer.
7. Add 2 mL of FACS buffer and centrifuge at $350 \times g$ for 5 min at 4 °C.
8. Resuspend cells in 400 µL FACS buffer, and filter through a 40 µm filter into a new FACS tubes.
9. Cap tubes and keep at 4 °C in the dark until acquisition within 4 h (although not recommended, acquisition can be carried out later if cells are fixed) (*see Note 12*).
10. Acquisition may also be carried out on a cell sorter, which will allow sorting cells for downstream culture applications or for RNA/protein analysis. When sorting for RNA and protein analysis, sorting cells directly into lysis buffer is recommended.

3.5 Adipose Tissue Macrophage Isolation

Adipose tissue biopsies are often kept in PBS following excision; once the biopsy is obtained, the tissue must be weighed (as results are most commonly reported as a function of tissue weight, i.e., cells/g) and treated immediately for downstream applications. In this digestion protocol, care is taken to be able to isolate both the stromal-vascular fraction (containing immune cells, endothelial cells, etc.) and the adipocyte fraction (*see Note 13*). At all times that tissue is fresh, work under sterile conditions, in a cell culture cabinet dedicated to human material.

1. Warm collagenase digestion solution to 37 °C in a water bath.
2. Place adipose tissue in a small dish, and cut into small pieces a few millimeters thick.
3. Transfer adipose tissue to a 15 mL centrifuge tube, and fill tube up to the 8 mL mark with warmed collagenase digestion solution; this solution is in excess for a biopsy of under 5 g (scale up if needed).
4. Cap tube and seal with Parafilm, shake vigorously by hand for a few seconds, and then transfer to a shaking water bath or a shaking chamber maintained at 37 °C. Allow to digest for 25–30 min.
5. Remove tube from shaker, shake vigorously by hand for a few seconds, and pass the lysate through a 200 µm cell strainer into a 50 mL Falcon tube.
6. Allow to stand at room temperature, adipocytes will float to the top within 5–10 min, and lower phase will become more transparent. Remove adipocytes with a plastic Pasteur pipette to continue macrophage isolation (if adipocytes will be kept for analysis, *see Note 14*).

7. Adjust volume of the lower phase to 25 mL with PBS + 2% (w/v) BSA; cap and centrifuge at $350 \times g$ for 5 min at room temperature.
8. Discard supernatant, and resuspend pellet in red blood cell lysis buffer adjusting volume to 10 mL; incubate at room temperature for 3 min.
9. Pass the suspension through a 70 μm cell strainer into a new 50 mL centrifuge tube; centrifuge at $350 \times g$ for 5 min at 4 °C.
10. Discard supernatant and resuspend pellet in 5 mL of PBS; this is the stromal-vascular fraction of adipose tissue; count cells (*see* **Note 15**).
11. To analyze macrophage polarization, apply flow cytometric staining protocol (Subheading 3.4 from **step 3** onward), with the use of a 6-parameter cytometer to differentiate M1 and M2 macrophages. The panel described in Table 2 and Fig. 5 will

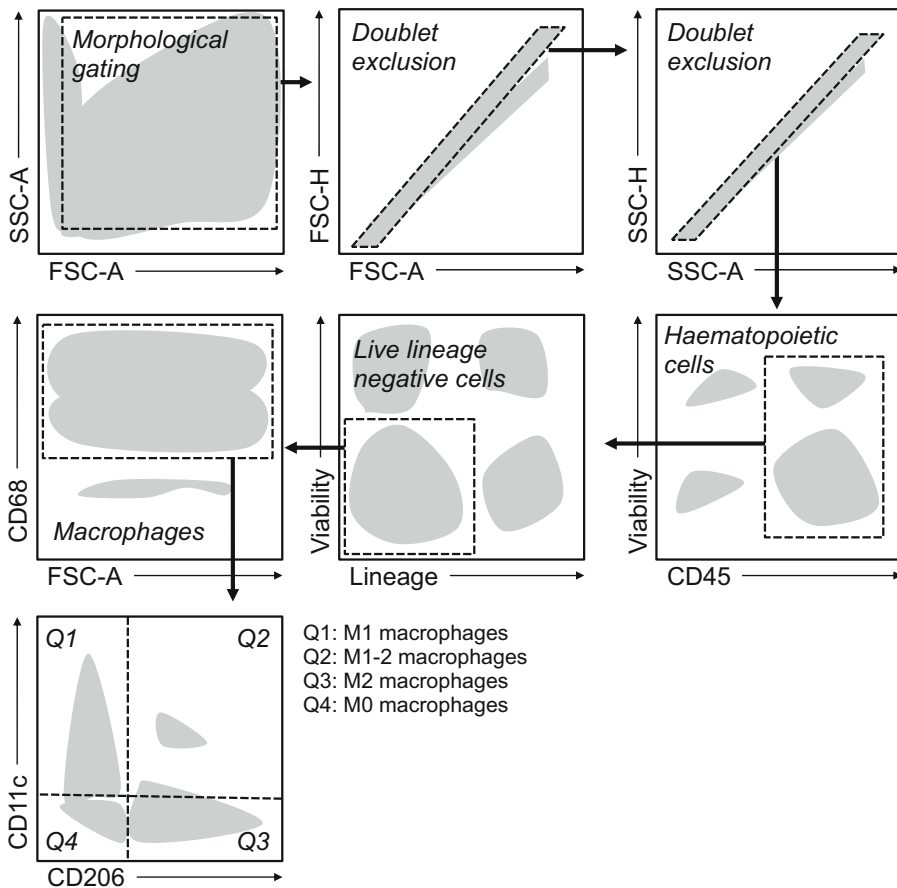


Fig. 5 Gating strategy to be applied for basic analysis of adipose tissue macrophages in humans. *Q1–Q4* quadrants, *FSC* forward scatter, *SSC* side scatter, *-A* area signal, *-H* height signal, *CD* cluster of differentiation, *CD45* hematopoietic cell marker, *CD68* macrophage marker, *CD11c* M1 macrophage marker, *CD206* M2 macrophage marker

allow quantification of total immune cells, macrophages, and polarized macrophages from adipose tissue.

4 Notes

1. For most applications, venous blood can be collected into EDTA or heparin-coated tubes; however, do check specifications of any secondary analysis kits for anticoagulant compatibility.
2. The use of an automated cell counter is recommended, such as a slide reader or benchtop cytometer (e.g., Countess II, Invitrogen; MACSQuant, Miltenyi Biotec). With such instruments consistent gating can be used across all samples to count cells of a desired size. A hemocytometer can also be used. Viability dyes should be included when counting.
3. The use of CD14 microbeads or classical monocyte isolation kit: Both reagents/kits are antibody based; while CD14 microbeads will allow isolation of all monocytes, the CD14 receptor is targeted with an antibody and thus will no longer be functional. The classical monocyte isolation kit is based on negative selection; therefore classical monocytes remain untargeted; thus all classical monocyte receptors are actionable in downstream applications. However the classical monocyte isolation kit will not allow isolation of intermediate nor nonclassical monocytes, due to their co-expression of CD16, a negative lineage marker targeted by the classical monocyte isolation kit. Both approaches in mind, CD14 microbeads are better suited to RNA or protein analysis of the total monocyte population without downstream experiments targeting monocyte function. The classical monocyte isolation kit is more suited to in vitro approaches that target monocyte activation or functional properties.
4. (Optional) Wash cells by adding 2–5 mL of MACS buffer per 1 mL of whole blood, and centrifuge at $445 \times g$ for 10 min at room temperature in a swinging bucket rotor without brake. Aspirate supernatant carefully. Do not disturb the cell pellet. Leave a residual volume of supernatant (approximately 1–2 mm in height) to avoid cell loss. Resuspend cell pellet by adding MACS buffer to a total volume of 1 mL. This wash step will allow removing any residual unbound antibodies and will allow reducing the probability of contaminating cells being sorted.
5. Here the protocol for LS columns is applied; if using MS columns, adapt 3 mL volumes to 500 μ L and 5 mL volume to 1 mL. The use of MS columns is suitable when starting biological material is limiting.

6. When using CD14 microbeads, the positive labelled fraction that is retained in the magnetic field is the monocyte-containing fraction. When using the classical monocyte isolation kit, the negative fraction that flows through the column while in the separator's magnetic field is the fraction containing classical monocytes.
7. If RNA analysis is to be carried out, repeat centrifugation wash step using only PBS in order to remove any residual BSA which may interfere with RNA isolation.
8. Throughout the culture procedure, aimed to achieve confluence of monocytes, enriched samples will have a higher proportion of monocytes, and thus the total number of cells must be tittered down when samples have been enriched by the use of a gradient.
9. Add $1.5\times$ the habitual volume of medium to allow cultivation over the weekend.
10. Following Ficoll-Paque gradient, morphological gating (first window, Fig. 4) will not represent the topmost population of cells. These cells are eliminated in the gradient due to their high granularity/poly-lobed nuclei.
11. Unstained cells are important when setting detection voltages of the morphological gate; the placement of an appropriate voltage of the photomultipliers for the forward and side scatter detectors is essential to having the representative morphological plot from blood (first window, Fig. 4).
12. Fixation is carried out by resuspending cells in ethanol- or formalin-based fixative and then washing cells with FACS buffer centrifugation before acquisition. Cell fixation is not recommended as this may distort cell morphology and invalidate the viability dye used.
13. When working with adipose tissue, do not work on ice until the adipocyte fraction has been removed. This is because adipocytes tend to solidify at cold temperatures (as any lipid-rich milieu).
14. If adipocytes are kept for analysis, they must be washed in successive rounds of PBS. This is carried out by adding 10 mL of PBS to adipocytes, capping and gently shaking the tube and then allowing adipocytes to float to the top. Repeat this washing step two more times, recover adipocytes with a plastic Pasteur pipette, snap freeze, or continue to downstream analysis.
15. Further purification of macrophages can be carried out through positive or negative selection strategies described above (Subheading 3.2).

References

1. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL (2014) Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol* 5:470
2. Bensinger SJ, Tontonoz P (2008) Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 454 (7203):470–477
3. Allen JN, Dey A, Nissly R, Fraser J, Yu S, Balandaram G, Peters JM, Hankey-Giblin PA (2017) Isolation, characterization, and purification of macrophages from tissues affected by obesity-related inflammation. *J Vis Exp* (122). <https://doi.org/10.3791/55445>
4. ImmGen C (2016) Open-source ImmGen: mononuclear phagocytes. *Nat Immunol* 17 (7):741
5. El-Sahrigy SA, Mohamed NA, Talkhan HA, Rahman AM (2015) Comparison between magnetic activated cell sorted monocytes and monocyte adherence techniques for in vitro generation of immature dendritic cells: an Egyptian trial. *Cent Eur J Immunol* 40 (1):18–24
6. Davies LC, Taylor PR (2015) Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology* 144 (4):541–548
7. Bertani FR, Mozetic P, Fioramonti M, Iuliani M, Ribelli G, Pantano F, Santini D, Tonini G, Trombetta M, Businaro L, Selci S, Rainer A (2017) Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Sci Rep* 7(1):8965
8. Guillems M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S (2014) Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14(8):571–578
9. Cignarella A, Tedesco S, Cappellari R, Fadini GP (2018) The continuum of monocyte phenotypes: experimental evidence and prognostic utility in assessing cardiovascular risk. *J Leukoc Biol* <https://doi.org/10.1002/JLB.5RU1217-477RR>. [Epub ahead of print]
10. Ginhoux F, Guillems M (2016) Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity* 44(3):439–449
11. Boutens L, Stienstra R (2016) Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* 59(5):879–894
12. de Jong AJ, Pollastro S, Kwekkeboom JC, Andersen SN, Dorjee AL, Bakker AM, Alzaid F, Soprani A, Nelissen R, Mullers JB, Venteclaf N, de Vries N, Kloppenburg M, Toes REM, Ioan-Facsinay A (2018) Functional and phenotypical analysis of IL-6-secreting CD4(+) T cells in human adipose tissue. *Eur J Immunol* 48(3):471–481
13. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11(2):85–97
14. Maecker HT, Trotter J (2006) Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A* 69 (9):1037–1042

Glucagon-like Peptide 1 Receptor Agonists, Diabetic Retinopathy and Angiogenesis: The AngioSafe Type 2 Diabetes Study

Bénédicte Gaborit,^{1,2,*} Jean-Baptiste Julla,^{3,4,*} Samaher Besbes,^{5,*} Matthieu Proust,^{5,†} Clara Vincentelli,^{1,2,†} Benjamin Alos,⁵ Patricia Ancel,¹ Fawaz Alzaid,⁴ Rodrigue Garcia,⁵ Philippe Mailly,⁵ Florence Sabatier,¹ Maud Righini,⁶ Pierre Gascon,^{6,7} Frédéric Matonti,^{6,7} Marie Houssays,⁸ Louisa Goumidi,¹ Lucile Vignaud,⁹ Xavier Guillonneau,⁹ Ali Erginay,¹⁰ Bénédicte Dupas,¹⁰ Jennifer Marie-Louise,¹⁰ Marianne Autié,¹⁰ Tiphaine Vidal-Trecan,³ Jean-Pierre Riveline,^{3,4} Nicolas Venteclef,⁴ Pascale Massin,¹⁰ Laurent Muller,⁵ Anne Dutour,^{1,2} Jean-François Gautier,^{3,4,‡} and Stéphane Germain^{5,‡}

¹Aix Marseille University, INSERM, INRA, C2VN, F-13005 Marseille, France; ²Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition Department, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, France; ³Department of Diabetes and Endocrinology, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Lariboisière Hospital, University Paris-Diderot Paris-7, F-75010 Paris, France; ⁴Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, F-75006 Paris, France; ⁵Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France – Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris Sciences et Lettres (PSL) Research University, F-75005 Paris, France; ⁶Department of Ophthalmology, AP HM, Marseille, France; ⁷Aix Marseille University, CNRS, INT, Inst Neurosci Timone, F-13005 Marseille, France; ⁸Aix Marseille University, APHM, INSERM, CIC 1409, Hôpital de la Conception, F-13005 Marseille, France; ⁹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012, Paris, France; and ¹⁰Department of Ophthalmology, Lariboisière Hospital, AP HP, University Paris-Diderot Paris-7, F-75010 Paris, France

ORCID number: 0000-0002-4180-158X (B. Gaborit).

Aims: Recent trials provide conflicting results on the association between glucagon-like peptide 1 receptor agonists (GLP-1RA) and diabetic retinopathy (DR). The aim of the AngioSafe type 2 diabetes (T2D) study was to determine the role of GLP-1RA in angiogenesis using clinical and preclinical models.

Methods: We performed two studies in humans. In study 1, we investigated the effect of GLP-1RA exposure from T2D diagnosis on the severity of DR, as diagnosed with retinal imaging (fundus photography). In study 2, a randomized 4-week trial, we assessed the effect of liraglutide on circulating hematopoietic progenitor cells (HPCs), and angio-miRNAs.

We then studied the experimental effect of Exendin-4, on key steps of angiogenesis: *in vitro* on human endothelial cell proliferation, survival and three-dimensional vascular morphogenesis; and *in vivo* on ischemia-induced neovascularization of the retina in mice.

Results: In the cohort of 3154 T2D patients, 10% displayed severe DR. In multivariate analysis, sex, disease duration, glyated hemoglobin (HbA1c), micro- and macroangiopathy, insulin therapy and hypertension remained strongly associated with severe DR, while no association

*These co-first authors contributed equally.

†These co-second authors contributed equally.

‡These co-last authors contributed equally.

Abbreviations: 3D, three-dimensional; 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; CI, confidence interval; DPP-IV, dipeptidyl peptidase-IV inhibitors; DR, diabetic retinopathy; eGFR, estimated glomerular filtration rate; GLP-1RA, glucagon-like peptide 1 receptor agonist; HPC, hematopoietic progenitor cell; HUVEC, Human umbilical vein endothelial cell; Ig, immunoglobulin; miRNA, micro-RNA; T2D, type 2 diabetes; VEGF, vascular endothelial growth factor

was found with GLP-1RA exposure (o 1.139 [0.800–1.622], $P = .47$). We further showed no effect of liraglutide on HPCs, and angio-miRNAs. In vitro, we demonstrated that exendin-4 had no effect on proliferation and survival of human endothelial cells, no effect on total length and number of capillaries. Finally, in vivo, we showed that exendin-4 did not exert any negative effect on retinal neovascularization.

Conclusions: The AngioSafe T2D studies provide experimental and clinical data confirming no effect of GLP-1RA on angiogenesis and no association between GLP-1 exposure and severe DR. (*J Clin Endocrinol Metab* 105: e1549–e1560, 2020)

Key Words: type 2 diabetes, retinopathy, fundus photography, angiogenesis, glucagon like peptide 1 receptor agonist, angiosafe Type 2 diabetes study

Diabetic retinopathy (DR) is the most common microvascular complication in patients with diabetes and a leading cause of blindness worldwide (1). Among diabetic patients, 5% to 10% will develop vision-threatening conditions such as diabetic macular edema or proliferative DR. Although it is well accepted that longer diabetes duration and poorer glycemic or blood pressure control are strongly associated with long-term development of DR, initial worsening of DR has been reported in patients with rapid glycemic normalization and/or high glycemic variability (2). Glucagon-like peptide 1 receptor agonists (GLP-1RA) are incretin-based drugs recommended by the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes consensus report as second line treatments in type 2 diabetes (T2D) (3). These antidiabetic drugs have provided evidence of favorable cardiovascular outcomes in large randomized controlled trials (4–6), even in patients with tightly controlled glycemia at baseline (REWIND study (7)). However, the use of GLP-1RA is associated with safety concerns regarding DR. In the LEADER trial, there was a higher but not significant rate of adverse retinal events with liraglutide compared with placebo (hazard ratio 1.15 [95% CI 0.87–1.52]; $P = .33$) (4). In the SUSTAIN-6 trial, there was a 76% increase in severe DR complications in the semaglutide group compared with placebo (hazard ratio 1.76 [95% CI 1.11–2.78]; $P = .002$) (5). These findings were based on reporting adverse events after GLP-1RA treatments; however, retinal imaging, to detect and grade DR, was not systematically performed. Given the potential role of GLP-1RA treatments in macro- and microvascular complications, one of the key questions to address is the potential of GLP-1-based therapies in the regulation of vascular integrity and angiogenesis. To our knowledge few studies have addressed these interactions. Therefore, we conducted a multicentric case–control study (study 1) in a well-phenotyped cohort of T2D patients referred for retinal imaging (fundus photography). In this study

we evaluated the impact of GLP-1 exposure, from point of T2D diagnosis, on severe DR (retrospective analysis).

In an extensive review about endothelial progenitor cells (EPC) in diabetic retinopathy, Lois et al. (8) describe that the number and function of EPCs are altered in patients with varying diabetes duration, metabolic control, and in the presence or absence of DR. Whether EPCs participate in regulating angiogenesis and/or pathogenesis of DR, or might be used as biomarkers for disease progression and stratification, are still open questions. miRNAs are noncoding RNAs that mediate gene silencing via base pairing with their target mRNAs. Their role in angiogenesis has been thoroughly described (9), and miRNA represent potential therapeutic targets in various diseases of excess vascularization, including diabetes. Exciting opportunities exist to pursue miRNAs as novel biomarkers for risk estimation, especially in DR risk and patient stratification (10, 11).

In study 2, we then performed a randomized controlled trial to investigate the effect of Liraglutide on (1) circulating progenitor cells of hematopoietic origin including CD34⁺45^{dim} HPCs and progenitors with angiogenic activity CD34⁺45^{dim}CD31⁺CD133⁺, and (2) circulating angiomRNAs in type 2 diabetic subjects. Indeed, HPCs modulate vascular protection through endothelial repair and angiogenesis and recent studies have provided evidence that HPCs could be mobilized by DPP-IV inhibition (12). In addition, several miRNAs, known to be implicated in angiogenesis such as miR-27b and miR-320a, have been associated with incidence and with progression of DR (13).

Finally, we used in vitro and in vivo models to study the effect of Exendin-4, on various key steps of angiogenesis, namely endothelial cell proliferation, survival, and three-dimensional (3D) angiogenesis in the presence or absence of vascular endothelial growth factor (VEGF). In vivo, the effect of subcutaneous injection of exendin-4 was assessed on ischemia-induced neovascularization of the retina.

Research Design and Methods

Human studies

The study was approved by local institutions and ethics committees (CPP Méditerranée II number 002930-35 and Ile de France V number 15070) and was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All patients provided informed consent.

AngioSafe 1 T2D study (Study 1)

AngioSafe 1 is an ongoing 3-year longitudinal study (NCT02671864) to determine the safety of antidiabetic drugs in the retina and angiogenesis. The overall study aims to include 7200 patients who will be followed-up at 3 years to evaluate DR presence, incidence, or progression according to the International classification of Diabetic Retinopathy (14). The present work reports the results of an intermediate analysis of the first 2 years of baseline data collected at inclusion. In the current cross-sectional study, a total of 3348 T2D patients (American Diabetes Association criteria) (15) were enrolled at the Centre Universitaire du Diabète et de ses Complications, Lariboisière Hospital, APHP, Paris, or the Endocrinology, metabolic diseases and nutrition department, Pole ENDO, APHM, Marseille. All consecutive T2D patients (≥ 18 years old) attending these two centers from June 2016 to July 2018 were screened for inclusion. Exclusion criteria were pregnancy, MODY, type 1 or pancreatic diabetes, dense cataract preventing DR grading, or patients with panretinal photocoagulation of a duration of 10 years or longer.

Retinal imaging

Two-field or 9-field 45° photographs of both eyes were taken by a trained orthoptist, using a TOPCON TRC-NW6 or CANON CR-2 fundus camera (16). Two grading teams of independent observers, each consisting of a primary recently qualified and a secondary more experienced ophthalmologist, were assigned to each patient. Graders, who were blinded to treatment exposure, assessed all photographs for retinopathy, according to the International classification of Diabetic Retinopathy (14). Each eye was graded separately. To ensure the intercenter reliability of the grading, each team graded the first 100 patients of the other team independently. Another independent grader undertook regular quality assurance cycle procedures to test the intracenter reliability and repeatability of the grading, using a predefined random list. Macular edema was sought on color photography. For confirmation, a macular optical coherence tomography could be performed in case of

diagnostic doubt or to better characterize the macular edema. Clinically significant macular edema was diagnosed as retinal thickening of 1 or more disc area/s (any part of which lies less than a disc diameter from the fovea) or hard exudates less than 500 μm from the fovea. Severe DR was defined as severe nonproliferative DR or proliferative DR (inactivated or not by panretinal photocoagulation <10 years and/or intravitreal injection) and/or macular edema.

Data collection

Time since T2D diagnosis, history of severe and nonsevere hypoglycemia, ketoacidosis, current antidiabetic therapy, current antihypertensive and lipid-lowering medications, body mass index, systolic and diastolic blood pressure, heart rate, and microvascular as well as macrovascular complications were systematically recorded. Considerable attention was paid to antidiabetic drug exposure (GLP-1RA, dipeptidyl peptidase-IV inhibitors (DPP-IV), metformin, glinides, sulfonylureas, thiazolidinediones, insulin) and the duration (<3 months, 3–6, 6–24 months, 2–5, 5–10, 10–20, >20 years) of any of these expositions. If patients underwent several glucose-lowering therapies, all treatment durations were recorded and then summed. Exposure to GLP-1RA was defined as any GLP-1RA treatment received for at least 3 months. HbA1c; total, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein cholesterol; triglycerides; aspartate aminotransferase (ASAT); alanine aminotransferase (ALT); gamma glutamyl transferase (GGT), urine albumin-to-creatinine ratio, and estimated glomerular filtration rate (eGFR, modification of diet in renal disease (MDRD)) were recorded the day of inclusion. All ophthalmological histories and associated pathologies (glaucoma, cataracts, hypertensive retinopathy) were also collected.

AngioSafe 2 T2D study (Study 2)

This was a randomized open label 4-week trial (NCT02686177) comparing 1.2 mg liraglutide daily subcutaneous injection versus no additional treatment on top of metformin and/or insulin secretagogues in insufficiently controlled obese patients with T2D patients ($n = 49$). The number of patients needed to be included were calculated at 20 patients per group compared to similar studies (12). At baseline and after 4 weeks, blood samples were drawn for determination of circulating hematopoietic progenitor cells (HPCs), angiogenesis biomarkers (VEGF-A, VEGF-C, angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), angiopoietin 2 (ANGPT2), and angiomiRNAs known to be associated with diabetic retinopathy and/or angiogenesis (10, 11). We selected

43 circulating miRNAs, because of their putative dysregulation or implication in diabetic retinopathy or their role in angiogenesis (16).

Enumeration of circulating progenitor cells

Hematopoietic progenitor cells (CD34⁺CD45^{dim} HPCs), and CD34⁺ progenitor cells (CD34⁺ PCs) were enumerated with a whole blood flow cytometry protocol adapted from the standardized ISHAGE single-platform sequential gating strategy (17). Briefly, 100 µL of blood was stained with fluorescein isothiocyanate-CD45 antibody, phycoerythrin-CD34 antibody or phycoerythrin-immunoglobulin (Ig)G1, and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Beckman Coulter). After lysis of erythrocytes, flow count beads were added to each sample for absolute value quantification, and samples were analyzed with a Navios Flow Cytometer equipped with CXP software (Beckman Coulter). CD34⁺CD45^{dim} HPCs were identified within 7-AAD-negative viable cells displaying forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) characteristics corresponding to the lymphocyte cluster and respectively CD45 Dim or Negative expression. The overall CD34⁺ PCs were identified using similar characteristics but independently of the CD45 expression. The results were expressed as absolute numbers of cells per milliliter of blood.

Analysis of HPCs with angiogenic activity (CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD31⁺ HPC) was performed using a 3-color flow cytometry gating strategy after direct immunolabeling of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMC were isolated from heparinized peripheral blood by density gradient centrifugation with lymphocyte separation medium (PAA Laboratories, Pasching, Austria), and labelled with 7-AAD Viability Dye, fluorescein isothiocyanate-CD31 antibody (Beckman Coulter), and of PEvio770CD133 antibody, APCvio770-CD45 antibody (Miltenyi Biotec). Fluorochrome-conjugated murine IgG1 antibody was used as fluorescence minus 1 control. After selection of 7-AAD-negative cells, CD133⁺CD45^{dim}CD31⁺ cells were identified within CD34⁺ cells displaying FSC/SSC characteristics corresponding to the lymphocyte cluster. The percentage of CD133⁺CD31⁺ cells among CD34⁺ cells was determined, and absolute values were calculated by multiplying the percentage of each cellular subpopulation by the absolute values of CD34⁺ cells determined as described above (17).

Angiogenesis biomarkers

Serum VEGF-A, VEGF-C, ANGPT2, and ANGPTL4 levels were measured by multiplex enzyme-linked immunosorbent assay (Biorad, France) as described in Reference (16).

Characterization of circulating microRNAs

miRNAs were isolated from serum using miRNeasy Mini kit (QIAGEN). Control miRNA (*C. elegans*-Cel_miR-39, Qiagen) was added to each sample for standardization. PCR plates (Qiagen MiScript miRNA PCR Array) were analyzed using a light cycler 480 system (Roche, France).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were prepared and grown as previously described (18). Experiments were performed at passages 2 or 3. Normal dermal human fibroblasts (NHDFs) were purchased from Promocell and grown in Fibroblast Growth Medium (Promocell) to 80% confluence. Medium was then replaced by ECGM2 and conditioned medium was then collected between day 2 and 6.

Animal procedures

Experiments were approved by the local ethics committee (Institutional Animal Care and Use Committee of College de France) and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS # 2016042215075172).

Oxygen-induced retinopathy

Mouse pups (Janvier Labs), along with nursing mothers were placed in 75% oxygen from postnatal day P7 to P12 (19). To prevent oxygen toxicity and improve survival, mothers (no more than 6 neonate mice per litter) were transferred daily to a normoxic environment for 2 hours as in previously described (20). The oxygen concentration was maintained using a Pro-OX oxygen controller (BioSpherix). At P12, mice were returned to room air. For each litter, pups were treated every day up to P16 by subcutaneous injection of PBS or exendin-4 at 25 nmol/kg (21). At P17, pups were euthanized, eyes were enucleated and fixed for 2 hours in 4% paraformaldehyde. Retinas were stained at 4°C overnight using Isolectin GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor™ 568 Conjugate at 10 µg/mL (Molecular Probes) in PBS-containing 0.5% Triton-X100 (Thermo Scientific). Retinal flat mounts were generated, and images were acquired using a Zeiss Axiozoom objective with a 2.3× zoom. The pathological neovascularization and the vaso-obiterated areas were quantified using ImageJ software (National Institute of Health).

3D endothelial sprouting assay

Three-dimensional endothelial sprouting assay was performed as previously described (22). Cytodex beads (GE Healthcare Bio-Sciences AB) were stained with Alexa Fluor™ 568 succinimidyl ester (1 µg/mL) (Molecular Probes) and incubated with HUVECs. After

24 hours, HUVEC-coated beads were resuspended in ECBM2 containing 2.5 mg/mL fibrinogen (Millipore) and aprotinin (40 µg/mL) (Thermo Scientific). The solution was distributed in a 96-well microplate with black wells (PerkinElmer) and mixed with thrombin (0.5 U/mL) (Millipore). Once fibrinogen mixture was completely polymerized, NHDF conditioned medium was added on top of the fibrin gel in the presence or not of different concentrations of Exendin-4 (0, 10, 30, and 100 nM) with or without 2.5 ng/mL of VEGFA165. Culture medium was changed every day and capillaries were allowed to grow for 4 days. After 20 minutes in 4% PFA, cell permeabilization was induced by TritonX-100 (0.5%) and capillaries were then stained overnight at 4°C using Alexa Fluor™ 488 phalloidin (Molecular Probes). Nuclei were stained with DAPI (0.5 µg/mL) (Molecular Probes) for 15 minutes at room temperature. HUVEC-coated bead stacks were captured using a Zeiss Axiozoom Apotome 2 with a 2.3× zoom and ×100 objective. Three-dimensional endothelial sprouting was analyzed and quantified using an ImageJ plugin developed in our laboratory.

Statistical analysis

All statistics were performed using SAS 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA), prism (v 6.00) software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), or MeV (TM4 software). All results are presented as means ± standard deviation (SD) or median (25th; 75th percentiles). All normally distributed datasets were compared using paired Student's *t*-tests; non-normally distributed datasets were compared using the Mann–Whitney *U* test and Wilcoxon signed-rank test, when applicable. Two-way analysis of variance was used to examine the influence of Exendin-4 and VEGF on cell proliferation and survival. Relative risks of severe DR were estimated by calculating odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) using logistic regression. Additional covariates were included to account for confounding risk factors, including sex, age, diabetes duration, center, HbA1c, eGFR (MDRD), neuropathy, macroangiopathy, hypertension, insulin, secretagogues, metformin, statins, antiplatelets, or antihypertensive therapies.

Sample size power calculation. We planned a study with 320 case patients and 2834 control patients. Prior data indicate that the probability of exposure among controls is 0.187. We will be able to detect true odds ratios for disease of 0.625 or 1.481 in exposed subjects relative to unexposed subjects with probability (power) of 0.8. The Type I error probability associated with this test of the null hypothesis that this odds ratio equals 1 is 0.05. We will use an uncorrected chi-square statistic

to evaluate this null hypothesis. A *P*-value <5% was considered to be statistically significant.

Results

AngioSafe 1 T2D study was designed to evaluate the impact of antidiabetic treatments, in particular GLP-1RA exposure on severe DR in a cohort of 3348 T2D patients. A total of 194 patients were excluded because of non-T2D (latent autoimmune or secondary), or nonreadable fundus photography (16). DR grading was performed by trained ophthalmologists (mean intra- and interindividual grading agreement was 99.1% and 96.2% respectively). Among the 3154 remaining patients, 10% (*n* = 320) displayed severe DR and 90% had nonsevere DR or no DR (*n* = 2834) (Table 1). Severe DR patients were significantly older, males, had longer diabetes duration and a lesser controlled disease, with higher HbA1c and more exposure to insulin than controls. As expected, they displayed more microvascular and macrovascular complications and more cardiovascular risk factors (more hypertension, lower cholesterol levels with a higher use of statins) than controls. Patients with severe DR were less exposed to metformin, secretagogues, and incretin-based drugs (i-DPPIV and GLP-1RA) but there was a trend towards higher GLP-1RA exposure (*P* = .08). In multivariate analysis, sex, disease duration, HbA1c, micro- and macroangiopathy, insulin therapy, and hypertension remained strongly associated with severe DR, while no association was found with GLP-1RA exposure (OR 1.139 [0.800–1.622], *P* = .47) (Table 2). Duration of exposure to GLP-1RA did not change the analysis significantly (OR 1.056 [0.939–1.188], *P* = .36). Remarkably, age and metformin were found to be protective against severe DR (both, *P* < .05, Table 2).

As evidence indicates that circulating HPCs, a heterogeneous population of bone marrow-derived progenitor cells, can mobilize in response to endogenous or exogenous signals such as pharmacological treatments (23), supporting vascular growth (24) and might affect the development of DR, we further examined whether their numbers vary under GLP-1RA treatment. The prospective AngioSafe 2 T2D study (different from AngioSafe 1) was thus designed to determine whether 1.2 mg of liraglutide versus no additional treatment (on top of metformin and/or insulin secretagogues) affects potential angiogenic biomarkers in insufficiently controlled obese type 2 diabetic (T2D) patients. Biomarkers investigated included circulating HPCs, circulating levels of VEGF-A, VEGF-C, angiopoietin-2 (ANGPT2, and ANGPTL4 as well as angio-miRNAs (10). As expected, the GLP-1RA treatment led to

Table 1. Comparison of Clinical Characteristics of T2D Patients Depending on their Diabetic Retinopathy Status in the AngioSafe Study 1 Cohort

	Total	Severe Diabetic Retinopathy		P-value ^a
		Presence	Absence	
Number	3154	320	2834	
Age (range) (year)	62 (55–69)	64 (56–71)	62 (54–69)	.017
Males n (%)	1819 (57.8)	205 (64.1)	1614 (57)	.0147
HbA1c (range) (%)	7.6 (6.8–8.6)	8.1 (7.3–9)	7.5 (6.7–8.5)	<.0001
Duration of diabetes (range) (years)	12 (6–20)	20 (12–27)	12 (6–18)	<.0001
Microangiopathy				
eGFR MDRD (range) (mL/min)	88.8 (70–105)	81 (54–98)	89.6 (72–106)	<.0001
UACR (range) (mg/mmol)	1.36 (0.6–5.3)	4 (1.1–18.7)	1.3 (0.6–4.2)	<.0001
Neuropathy ^b	446 (14.7)	99 (32.8)	347 (12.7)	<.0001
Macroangiopathy ^c	650 (20.6)	124 (39.2)	526 (18.6)	<.0001
Cardiovascular risk factors				
Hypertension ^d	2007 (63.6)	254 (79.4)	1753 (61.9)	<.0001
Smoking (%)	485 (15.9)	46 (15.1)	439 (16)	.6705
BMI (range) (kg/m ²)	28.8 (25.7–32.7)	29 (26.3–33)	28.7 (25.6–32.6)	.2860
LDLc (range) (mmol/L)	2.48 (1.9–3.1)	2.37 (1.75–3.0)	2.51 (1.9–3.1)	.0069
HDLc (range) (mmol/L)	1.14 (0.96–1.37)	1.11 (0.93–1.37)	1.11 (0.96–1.37)	.1476
TG (range) (mmol/L)	1.37 (1–1.9)	1.37 (1–1.9)	1.37 (1–1.9)	.9089
Diabetes therapy				
Insulin	1103 (35)	215 (67.2)	888 (31.3)	<.0001
Metformin	2285 (72.7)	192 (60)	2093 (74.1)	<.0001
Secretagogues	1306 (41.5)	105 (32.8)	1201 (42.5)	.0008
Other medications				
Statins	1769 (56.7)	204 (64.6)	1565 (55.8)	.0029
Antiplatelets	1125 (36.1)	155 (48.9)	970 (34.7)	<.0001
Antihypertensives	1919 (61.5)	246 (77.6)	1673 (59.6)	<.0001
Exposure to				
Incretin-based drugs	1521 (48.2)	122 (38.1)	1399 (49.4)	.0001
GLP-1 RA	604 (19.2)	73 (22.8)	531 (18.7)	.0795
GLP-1 RA duration of exposition				
<3 months	29 (4.8)	3 (4.1)	26 (4.9)	.7646
3–6 months	71 (11.8)	10 (13.7)	61 (11.5)	.5847
6 months to 2 years	214 (35.4)	27 (37)	187 (35.2)	.7632
2 to 5 years	179 (29.6)	16 (21.9)	163 (30.7)	.1230
5 to 10 years	94 (15.6)	14 (19.2)	80 (15.1)	.3657
10 to 20 years	17 (2.8)	3 (4.1)	14 (2.6)	.4653

P values in bold indicate P values < .05.

Abbreviations: BMI, body mass index; BP, blood pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; TG, triglyceride; UACR, urinary albumin to creatinine ratio.

^aFrom the chi-square test for categorical variables and t test for continuous variables.

^bDefined as abnormal monofilament test or clinical sign of peripheral neuropathy.

^cDefined as history of coronary artery disease and/or stroke and/or lower limb peripheral arterial disease.

^dDefined as systolic BP ≥140 mmHg or diastolic BP ≥90 mmHg, or use of antihypertensive medications.

a significant improvement in weight (-3.5 ± 3.6 vs $+0.1 \pm 2.6$ kg), glycemic control (HbA1c -0.51 [-1.25 to -0.25] vs $+0.05$ [-0.60 to $+0.26$])% and lipid parameters (TG -0.21 ± 0.45 vs $+0.16$ [$+0.07$ to $+0.33$]) mmol/L compared with control group respectively, all $P < .01$. The number of HPCs (CD34⁺CD45^{dim} HPCs and CD34⁺CD45^{dim}CD31⁺CD133⁺) was not statistically different at baseline and after a 4-week treatment, between liraglutide and control group (Table 3). Circulating levels of ANGPT2 significantly increase in both liraglutide and control groups but without differences between groups ($P = .66$, Table 3). In addition, changes in VEGF-A, VEGF-C, and ANGPTL4

circulating levels did not differ between treatment groups. Finally, angiomiR levels were not statistically different between baseline and 1-month treatment as well as between control and liraglutide-treated patients (16), whereas the majority of them were upregulated in patients with severe DR versus patients with no DR paired for age, sex, hypertension, and HbA1C (16).

Taken together, both AngioSafe 1 and AngioSafe 2 T2D studies suggest that exposure to GLP-1RA is neither associated with severe DR nor with rapid angiogenic biomarker changes in humans.

As previous publications reported proangiogenic effects of GLP-1RA (25, 26), we next sought to

Table 2. Independent Factors Associated With Severe DR, Multivariate Analysis, the AngioSafe Study 1

	OR (95% CI)	P-value
GLP-1 RA Exposition	1.139 (0.800–1.622)	.4715
Age	0.975 (0.959–0.990)	.0016
Male	1.366 (1.019–1.832)	.0369
Diabetes duration	1.050 (1.033–1.066)	<.0001
HbA1c	1.158 (1.055–1.272)	.0021
Center	1.212 (0.880–1.669)	.2385
Microangiopathy		
eGFR (MDRD)	0.990 (0.984–0.995)	.0003
Neuropathy ^a	2.153 (1.567–2.958)	<.0001
Macroangiopathy ^b	1.688 (1.207–2.359)	.0022
Diabetes therapy		
Insulin	2.345 (1.709–3.217)	<.0001
Secretagogues	0.881 (0.645–1.202)	.4239
Metformin	0.716 (0.527–0.974)	.0332
DPP-IV	0.892 (0.612–1.302)	.5548
Cardiovascular risk		
Statins	0.861 (0.620–1.195)	.3714
Antiplatelets	0.976 (0.702–1.357)	.8844
hypertension	1.472 (1.014–2.136)	.0419

P values in bold indicate P values < .05.

^aDefined as abnormal monofilament test or clinical sign of peripheral neuropathy.

^bDefined as history of coronary artery disease and/or stroke and/or lower limb peripheral arterial disease.

characterize whether human endothelial cell proliferation and survival were affected by using exendin-4. Using Incucyte technology, we here show that exendin-4 has no effect on proliferation and survival of endothelial cells, either alone or used in combination with VEGF used at 2.5 ng/mL (Fig. 1A and 1B). We then analyzed the effect of exendin-4 on the formation of human endothelial capillaries using a 3D cytodex bead model into which polarized endothelial cells form adherens junctions that allow lumen formation and proper vascular morphogenesis (27, 28). No capillary sprouting could be observed in the absence of VEGF whatever the concentration of exendin-4 (16). We then added VEGF at 2.5 ng/mL as a positive control and analyzed whether exendin-4 could thus modulate vascular morphogenesis (Fig. 1C–F). Our data clearly show that exendin-4 had no effect on total capillary length (Fig. 1G) and number of capillaries (Fig. 1H).

We then used oxygen-induced retinopathy in mice in vivo as a model for vascular pathology in the retina (19). Exendin-4 was injected at a daily dose of 25 nmol/kg between P12 and P16, time at which angiogenesis occurs in this model. At P17, mice were euthanized and retinas were flat-mounted and stained (Fig. 1I and 1J). Neovascularization was not altered by exendin-4 treatment (Fig. 1K) whereas vascular regrowth in the vaso-obliterated area was slightly inhibited in the exendin-4 treated group compared with controls (Fig. 1L). The data demonstrate that exendin-4 does not alter these

retinal pathological mechanisms in the development of DR.

Discussion

In this study, our results confirm that GLP-1RA exposure is not associated with severe DR. Recent large clinical trials have suggested that GLP-1RAs may worsen or possibly increase the risk of DR (4, 5), thus DR risk factors remain uncertain in patients with T2DM (29). The results of our AngioSafe T2D studies are in line with recent meta-analysis and studies based on adverse reporting system that showed no evidence of an association between GLP-1RA and DR (29–31). Here, we assessed retinopathy according to the International classification of Diabetic Retinopathy (14) and we report that GLP-1RA exposure was not associated with severe DR. Moreover, our results highlight the importance of taking into account many potential confounding factors such as insulin exposure, which may reflect a more advanced stage of the disease, as opposed to age and metformin which were, in-fact, protective in the case of severe DR. Accordingly, Douros et al. (32) showed that new users of GLP-1RA were associated with a 33% decreased risk of DR compared with new users of insulin, while the hazard ratio was 1.00 (95% CI 0.85–1.17) when compared with the use of at least two oral antidiabetic drugs. Given the dynamic nature of pharmacotherapy in T2D, past and ongoing medications are also important to consider when evaluating risk factors for retinopathy. Our study is retrospective and does not infer any causality yet remains relevant with our thorough retinal imaging, such studies are as of yet scarce.

Several studies have demonstrated that bone marrow-derived progenitor cells are reduced in number and dysfunctional in T2D (31). Depletion of these progenitor cells occurs at an early stage of T2D, and this effect is amplified in patients with advanced vascular complications. In contrast, an increased number of circulating CD34⁺CD45 cells was observed in patients with proliferative DR compared with controls (33). Several studies have also shown that DPP-IV inhibitors increase circulating progenitor cells, through the SDF-1 α /CXCR4 axis as early as 4 days after initiating treatment (12, 34, 35). Fadini et al. (12) showed that a 4-week treatment increased CD34⁺/KDR⁺ cells in type 2 diabetic patients treated with sitagliptin. The same authors also observed a significant increase in CD34⁺/CD133⁺ progenitor cells, CD34⁺/KDR⁺, and CX3CR1⁺ monocytes only after 4 days of treatment in T2D patients treated with linagliptin compared to placebo (35). In our study, we further examined the potential adverse effect of

Table 3. Effect of One-Month Liraglutide Treatment on Circulating Hematopoietic Progenitor Cells in a Population of Obese Type 2 Diabetic Patients (n = 49), AngioSafe Study 2

Variables	Liraglutide Group (n = 28)			Control Group (n = 21)			<i>P</i> ^c
	T0	T1	<i>P</i> ^a	T0	T1	<i>P</i> ^b	
Age, years	52 ± 10			55 ± 8			.144
Duration of diabetes, years	3 (1;10)			9 (3;15)			.067
Anthropometric parameters							
Weight, kg	101.9 ± 18.4	98.5 ± 19.3	<.001	94.2 ± 15.2	94.3 ± 15.5	.810	<.001
BMI, kg/m ²	34.7 (30.4;40.4)	34.3 ± 5.9	<.001	31.5 (29.4;38.8)	31.2 (28.7;39.2)	.969	<.001
Waist circumference, cm	113 ± 16	111 ± 15	<.001	108 ± 14	108 ± 12	.916	.020
Hemodynamic parameters							
Systolic BP, mmHg	129 (120;135)	122 ± 11	.072	125 ± 15	128 ± 13	.461	.091
Diastolic BP, mmHg	77 (71;85)	75 ± 10	.328	73 ± 10	76 ± 8	.219	.070
Glucose profile							
Fasting plasma glucose, mmol/L	8.20 (6.63;10.08)	5.95 (5.10;7.63)	<.001	7.00 (6.25;8.65)	7.60 (6.55;10.20)	.041	<.001
HbA1c, %	7.43 (6.49;9.49)	7.05 ± 1.30	<.001	7.57 ± 1.56	7.42 ± 1.16	.286	.003
Fructosamine, μmol/L	256 (234;338)	227 (217;253)	<.001	251 (233;282)	275 ± 41	.156	<.001
Lipid profile							
Total chol, mmol/L	4.85 ± 1.33	4.29 ± 1.65	.003	4.84 ± 0.87	4.68 ± 0.97	.317	.075
LDL chol, mmol/L	2.99 ± 1.06	2.66 ± 1.23	<.001	2.90 ± 0.79	2.66 ± 0.72	.036	.276
HDL chol, mmol/L	1.11 (0.96;1.29)	1.09 ± 0.27	.022	1.25 ± 0.33	1.22 ± 0.33	.680	.771
Triglycerides, mmol/L	1.43 (1.09;2.20)	1.32 (0.93;1.71)	.025	1.53 ± 0.50	1.79 ± 0.68	.033	<.001
Liver parameters							
ASAT (range), U/L	23 (19;29)	22 (18;30)	.876	22 (20;28)	23 (18;29)	.826	.913
ALAT, U/L	34 ± 15	26 (20;47)	.582	27 (21;38)	27 (17;36)	.232	.848
Inflammatory parameter							
Hs CRP, mg/L	3.1 (1.6;6.9)	2.7 (0.9;7.0)	.189	6.3 (2.0;12.7)	4.1 (2.1;10.9)	.568	.173
Angiogenic parameters							
ANGPTL4, ng/mL	467.3 ± 320.1	395.1 (197.4;845.9)	.414	372.4 ± 375.5	501.3 ± 315.3	.438	.618
VEGFa, ng/mL	203.9 (169.6;308.3)	266.7 ± 110.4	.138	257.7 ± 133.3	277.0 ± 133.6	.269	.796
VEGFc, ng/mL	471.7 (292.2;674.9)	591.7.1 ± 318.9	.052	611.4 ± 305.0	690.1 ± 383.9	.124	.765
ANGPT2, ng/mL	421.3 (223.6;796.5)	564.4 (247.9;771.0)	.041	687.6 ± 364.1	818.8 ± 457.3	.040	.664
Hematopoietic progenitor cells							
CD34 ⁺ 45 ^{dim} , n	1792 (1583;3068)	1849 (1307;2536)	.239	1734 (1368;2771)	1985 ± 601	.239	.088
CD34 ⁺ 45 ^{dim}	982 (705;1432)	884 (681;1564)	.630	1193 ± 480	1124 ± 411	.706	.443
CD133 ⁺ , n							

Variables with a non-Gaussian distribution are represented as median (25th; 75th percentile) and variables with Gaussian distribution as mean ± standard deviation. *P* values in bold indicate *P* values < .05.

Abbreviations: BMI, Body mass index; BP, Blood pressure; Chol: cholesterol; Hs CRP, high sensitivity C-reactive protein; LDL chol, Low Density Lipoprotein cholesterol; HDL chol: high density lipoprotein cholesterol.

^a*P* for the comparison between T0 and T1 in liraglutide group.

^b*P* for the comparison between T0 and T1 in control group.

^c*P* for the comparison of percentage change between groups.

P < .05 considered as significant.

GLP-1RA treatment: whether cell numbers might vary rapidly under liraglutide treatment. Our results showed no effect of liraglutide on progenitor cell mobilization compared with the nontreated control group. In comparison, we observed a significant increase of circulating CD34⁺CD45⁻ cells in patients with endothelial disruption, as previously reported in systemic sclerosis (36). Our findings, though they cannot be generalized to all GLP-1RA, are in disagreement with direct and rapid effects of liraglutide on the recruitment of circulating progenitor cells.

Various studies have identified dysregulated miRNAs in DR (10) and some of them such as miR200b are currently being tested for therapeutic potential in DR. Zampetaki et al. (13) proposed that angiogenic microRNAs were linked to incidence and progression of DR in type 1 diabetes. This represents a major interest in assessing the potential of circulating miRNA as biomarkers of DR. Here, we determined whether these circulating miRNAs could be modulated by liraglutide. Our results show no modulation of angiomiRs expression levels in liraglutide-treated patients compared

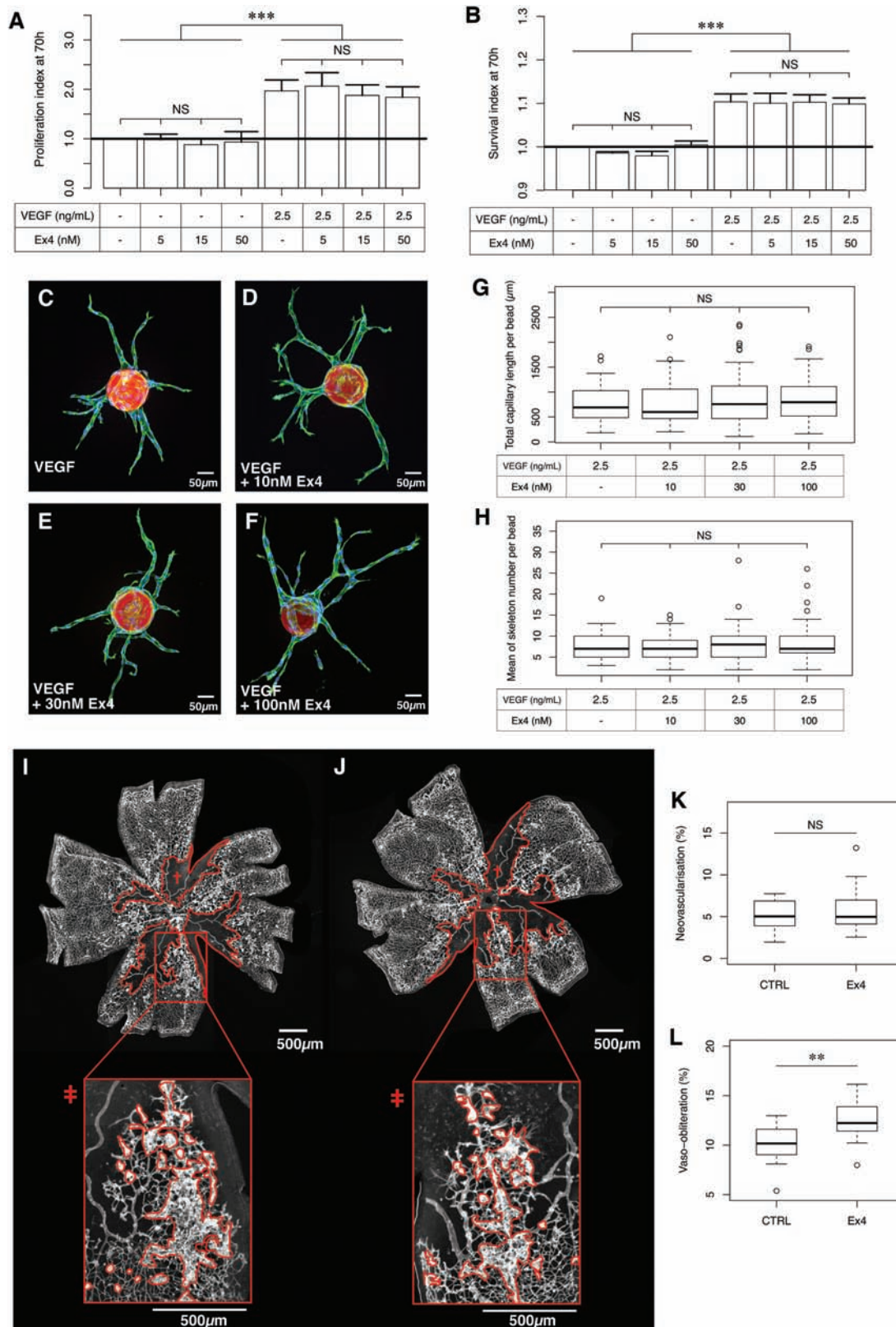


Figure 1. (A) Quantification of human endothelial cell (HUVEC) proliferation treated or not with exendin-4 ± VEGF165. Proliferation rate was calculated by subtracting cell confluency at T0 from cell confluency at each time. Then, a proliferation index was calculated at T = 70 hours by normalizing proliferation index in each condition by that of control cells (no exendin-4, no VEGF). Graphs represent mean ± SEM (n = 3 independent experiments; two-way analysis of variance). NS, no significant difference. Effect of VEGF: *** $P = 1.51 \times 10^{-6}$; effect of Ex4: NS $P = .835$; interaction: NS $P = 0.973$. (B) Quantification of human endothelial cell (HUVEC) survival treated or not with exendin-4 ± VEGF165. Cell viability was calculated by dividing the live cell count by the total cell count (live+dead cells). A survival rate was calculated by subtracting cell viability at T0 from cell viability at each time. Then, a survival index was calculated at time = 70 hours by normalizing proliferation index in each

with the nontreated control group. To our knowledge, this has never been reported to date. In line with these observations, circulating levels of VEGF-A, VEGF-C, ANGPT2, and ANGPTL4, assessed as potential angiogenesis biomarkers, did not differ between groups. The angiopoietin family has been found to have a major role in angiogenesis and retinal neovascularization. In mice, ANGPT2 is upregulated by hyperglycemia, at the point of the retina and endothelial cell and induce pericyte loss via $\alpha\beta 1$ integrin signaling (37). In humans, increased VEGF and Ang-2 levels, as well as lower soluble angiopoietin receptor tie-2, were seen among patients with preproliferative and proliferative retinopathy (38). ANGPTL4 has been found to promote retinal neovascularization in proliferative DR patients. Expression of ANGPTL4 was markedly increased in the aqueous and vitreous of proliferative DR patients and inhibition of ANGPTL4 reduced the angiogenic potential of hypoxic retinal cells (39).

Previous publications reported proangiogenic effects of exendin-4 using human umbilical vein endothelial cells (25, 26). Angiogenesis is a highly regulated multistep process that controls diverse biological functions necessary for endothelial cell morphogenesis such as migration, proliferation, cell guidance events, and cell polarity. This in vitro 3D model recapitulates all key steps of angiogenesis from proliferation and migration of endothelial cells to vascular morphogenesis. Here, we further extended our clinical studies to in vitro and in vivo experimental studies aimed at examining whether exendin-4 might affect angiogenesis. Human umbilical vein endothelial cells were treated with various doses of exendin-4 (up to 100nM) showing no effect on survival, proliferation and 3D vascular morphogenesis. Whereas endothelial cell proliferation and survival in response to exendin-4 were not carefully studied in previous work, our results do not confirm preceding observations. Whereas Kang et al. [26] used a single dose of exendin-4, that is, 100 nM, Aronis et al. [25] showed that GLP-1 stimulation was biphasic: promoting angiogenesis at doses ranging between 200 and 1000 nM, with the maximal effect observed at 500 nM. Nevertheless, 2000 nM did not trigger any significant angiogenic response. The same authors propose that increased concentrations of GLP-1 may bind to and activate GLP-1R, or other receptors, with altered affinity. Indeed, GLP-1 concentrations

range between 0.4 and 1.4 pM in the fasting state and 10 and 12 pM postprandially (40), and can reach up to 2000 pM after pharmacological administration (41). Such circulating levels are significantly lower than doses used in their study and would therefore deserve further investigation. Also, Kang et al. used a coculture model in which fibroblasts of unknown origin were layered on top of endothelial cells. The effects they observed might therefore be related to the activation of fibroblast receptors, which in turn may trigger uncharacterized signaling events affecting endothelial cells.

In vivo, we used systemic exendin-4 treatment of newborn mice in a model of ischemia-induced neovascularization of the retina. Our results show no effect on neovascularization and less revascularization of vasobliterated areas. This classical in vivo model of retinopathy has limits; it is well known it can reproduce angiogenic proliferation, that is, neovascularization, which is not affected by exendin-4 here, whereas microvascular regrowth in vaso-obliterated areas is dependent on other mechanisms (42). These results thus demonstrate that exendin-4 does not promote retinal angiogenesis that could mediate increased retinopathy. These results are in line with recent data showing that linagliptin, a DPP-IV inhibitor, does not promote retinopathy. Indeed, Kolibabka et al. (43) recently demonstrated that linagliptin exerts antiangiogenic effects mediated by VEGF-R signaling inhibition.

Our study has several strengths. We combined experimental and clinical data focused on retinal imaging and history of antidiabetic drug exposure since diagnosis with important clinical characteristics such as diabetes duration, glycemic control, chronic kidney disease, neuropathy, hypertension, and dyslipidemia. This study also has some limitations. Owing to its observational nature, we cannot exclude potential residual confounding factors. Patients with severe DR had more cardiovascular risk factors than patients without severe DR. This could have influenced the results and needs further evaluation. Furthermore, there are memory biases linked to the recall of all antidiabetic treatments taken since diagnosis. However, we likely reduced this bias by looking at medical records, and by using predefined ranges of exposure duration. The cross-sectional nature of data cannot inform on the causal link between severe DR and GLP-1RA, and prospective studies specifically dedicated to

condition by that of control cells (no exendin-4, no VEGF). Graphs represent mean \pm SEM ($n = 3$ independent experiments; two-way analysis of variance). NS, no significant difference. Effect of VEGF: $***P_{val} = 6.01 \times 10^{-9}$; effect of Ex4: NS $P = .802$; interaction: NS $P = .739$. (C–H) 3D sprouts from human endothelial cells (HUVECs) treated with VEGF165 \pm exendin-4. These images are representative of at least 30 Cytodex beads, respectively, analyzed in three independent experiments; Kruskal–Wallis. Scale bar, 50 μm . (G) Total capillary length per bead: NS $P = .6983$. (H) Mean of skeleton number per bead: NS $P = .6467$. (I–L) Images of whole-mount P17 retinas stained with IB4 (I, J). The avascular area is outlined in red. Scale bars represent 200 μm . (K) Neovascularization (Mann–Whitney U test; NS $P = .8919$) and (L) vaso-obliteration values (Mann–Whitney U test; $**P = .00425$) (K and L respectively) are expressed as % of total retina surface.

DR are warranted. The Angiosafe 2 T2D study 2 aimed to evaluate the effect of a GLP1-RA on progenitor cell mobilization but was not designed to evaluate the effect of GLP1-RA on DR development.

In summary, this AngioSafe T2D study provides experimental and clinical data regarding the possible proangiogenic effect of GLP-1RA, and its association with severe diabetic retinopathy.

Acknowledgments

The authors thank the Unité de Recherche Clinique of Lariboisière/Fernand Widal (Pr Eric Vicaut and Dr Véronique Jouis), the Délégation à la Recherche Clinique de Paris – Ile de France and the Direction de la Recherche Santé de Marseille for their administrative support. The authors also thank Nassima Haddadi, Djamila Bellili, Nathalie Lesavre, Alain Vazi for their technical support, nurses and patients who accepted to be involved in these studies.

Funding statement: This study was funded by ANR-DGOS (Project AngioSafe T2D) and ASSERADT (a nonprofit patient association). B.A. was supported by the Fédération Française de Cardiologie.

Clinical Trial Information: NCT02686177, NCT02671864

Additional Information

Correspondence and Reprint Requests:

Stéphane Germain, Center for Interdisciplinary Research in Biology - College de France - UMRS INSERM U1050 - CNRS 7241, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France. E-mail: stephane.germain@college-de-france.fr

Disclosure summary: S.B., M.P., B.A., R.G., P.M., L.V., X.G., L.M., S.G., P.A., C.V., F.A., R.D., T.V-T., J-P.R., M.H., L.G., A.E., M-L.J., M.A, M.R., F.M., P.G., B.D. N.V., F.S. have no relevant conflict of interest to disclose. B.G. has received consulting honoraria from Eli Lilly, Novo Nordisk, Sanofi-Aventis, and speaking fees from Eli Lilly. BG has received nonfinancial support for travelling from Isis Diabete, Eli Lilly.

J-B.J. has received honoraria for travel and accommodation expenses from Novo Nordisk and MSD. J-P.R. participates in advisory boards and as a consultant for Abbott Diabetes Care, LifeScan, Sanofi, and Eli Lilly and has received honoraria and payment for presentations, travel and accommodation expenses from Abbott Diabetes Care and Novo Nordisk. A.D. has received consulting honoraria from Eli Lilly, Sanofi-Aventis. AD has received research grants from Boehringer-Ingelheim and nonfinancial support for travelling from Sanofi-Aventis, Eli Lilly, Novo Nordisk. J-F.G. has received consulting honoraria from AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, Novartis, Novo Nordisk, Sanofi-Aventis and Servier, and speaking fees from AstraZeneca/Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, Novartis, Novo Nordisk and Servier. He has received research grants from Eli Lilly, Novo Nordisk and

Sanofi, and nonfinancial support for travelling from Janssen, AstraZeneca/Bristol-Myers Squibb, Novartis and Sanofi.

Data Availability: B.G., J-F.G. and S.G. are the guarantors of this work and, as such, have full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding authors upon reasonable request. All supplementary material and figures are located in a digital research materials repository (16).

References

1. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al; Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012;35(3):556–564.
2. Lu J, Ma X, Zhou J, et al. Association of time in range, as assessed by continuous glucose monitoring, with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2018;41(11):2370–2376.
3. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. a consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2018;41(12):2669–2701.
4. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(4):311–22.
5. Marso SP, Bain SC, Consoli A, et al; SUSTAIN-6 Investigators. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1834–1844.
6. Holman RR, Bethel MA, Mentz RJ, et al. Effects of once-weekly exenatide on cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2017;377(13):1228–1239.
7. Gerstein HC, Colhoun HM, Dagenais GR, et al. Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2019;394(10193):121–130.
8. Lois N, McCarter RV, O'Neill C, Medina RJ, Stitt AW. Endothelial progenitor cells in diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:44.
9. Sun LL, Li WD, Lei FR, Li XQ. The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases. *J Cell Mol Med*. 2018;22(10):4568–4587.
10. Joglekar MV, Januszewski AS, Jenkins AJ, Hardikar AA. Circulating microRNA biomarkers of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2016;65(1):22–24.
11. Zhang Y, Sun X, Icli B, Feinberg MW. Emerging roles for microRNAs in diabetic microvascular disease: novel targets for therapy. *Endocr Rev*. 2017;38(2):145–168.
12. Fadini GP, Boscaro E, Albiero M, et al. The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor-1alpha. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1607–1609.
13. Zampetaki A, Willeit P, Burr S, et al. Angiogenic microRNAs linked to incidence and progression of diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2016;65(1):216–227.
14. Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, et al; Global Diabetic Retinopathy Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003;110(9):1677–1682.
15. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl. 1):S13–S27.

16. Gaborit B, Julla J-B, Besbes S, et al. Supplemental data from: glucagon-like peptide 1 receptor agonists, diabetic retinopathy and angiogenesis: safe or not? The AngioSafe type 2 diabetes study. 2019. <https://amubox.univ-amu.fr/s/fnzsDZtctqzDinB>.
17. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother.* 1996;5(3):213–226.
18. Chomel C, Cazes A, Faye C, et al. Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *Faseb J.* 2009;23(3):940–949.
19. Scott A, Fruttiger M. Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina. *Eye (Lond).* 2010;24(3):416–421.
20. Villacampa P, Menger KE, Abelleira L, et al. Accelerated oxygen-induced retinopathy is a reliable model of ischemia-induced retinal neovascularization. *Plos One.* 2017;12(6):e0179759.
21. Qi Y, Simakova A, Ganson NJ, et al. A brush-polymer conjugate of exendin-4 reduces blood glucose for up to five days and eliminates poly(ethylene glycol) antigenicity. *Nat Biomed Eng.* 2016;1:pii: 0002.
22. Bignon M, Pichol-Thievend C, Hardouin J, et al. Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood.* 2011;118(14):3979–3989.
23. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, et al. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(5):1316–1320.
24. Fadini GP. A reappraisal of the role of circulating (progenitor) cells in the pathobiology of diabetic complications. *Diabetologia.* 2014;57(1):4–15.
25. Aronis KN, Chamberland JP, Mantzoros CS. GLP-1 promotes angiogenesis in human endothelial cells in a dose-dependent manner, through the Akt, Src and PKC pathways. *Metabolism.* 2013;62(9):1279–1286.
26. Kang HM, Kang Y, Chun HJ, Jeong JW, Park C. Evaluation of the in vitro and in vivo angiogenic effects of exendin-4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434(1):150–154.
27. Beckouche N, Bignon M, Lelarge V, et al. The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF165-induced angiogenesis. *Sci Signal.* 2015;8(385):ra70.
28. Gorin C, Rochefort GY, Bascetin R, et al. Priming dental pulp stem cells with fibroblast growth factor-2 increases angiogenesis of implanted tissue-engineered constructs through hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor secretion. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(3):392–404.
29. Wang T, Hong JL, Gower EW, Pate V, Garg S, Buse JB, Stürmer T. Incretin-based therapies and diabetic retinopathy: real-world evidence in older U.S. adults. *Diabetes Care.* 2018;41(9):1998–2009.
30. Tang H, Li G, Zhao Y, et al. Comparisons of diabetic retinopathy events associated with glucose-lowering drugs in patients with type 2 diabetes mellitus: a network meta-analysis. *Diabetes Obes Metab.* 2018;20(5):1262–1279.
31. Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, et al. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33(5):1097–1102.
32. Dourous A, Filion KB, Yin H, et al. Glucagon-like peptide 1 receptor agonists and the risk of incident diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2018;41(11):2330–2338.
33. Tan K, Lessieur E, Cutler A, et al. Impaired function of circulating CD34(+) CD45(-) cells in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Eye Res.* 2010;91(2):229–237.
34. Dei Cas A, Spigoni V, Cito M, et al. Vildagliptin, but not glibenclamide, increases circulating endothelial progenitor cell number: a 12-month randomized controlled trial in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2017;16(1):27.
35. Fadini GP, Bonora BM, Cappellari R, et al. Acute effects of linagliptin on progenitor cells, monocyte phenotypes, and soluble mediators in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(2):748–756.
36. Benyamine A, Magalon J, Cointe S, et al. Increased serum levels of fractalkine and mobilisation of CD34+CD45- endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):60.
37. Park SW, Yun JH, Kim JH, Kim KW, Cho CH, Kim JH. Angiopoietin 2 induces pericyte apoptosis via $\alpha 3\beta 1$ integrin signaling in diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2014;63(9):3057–3068.
38. Lip PL, Chatterjee S, Caine GJ, et al. Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin-2, and soluble angiopoietin receptor tie-2 in diabetic retinopathy: effects of laser photocoagulation and angiotensin receptor blockade. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(12):1543–1546.
39. Babapoor-Farrokhman S, Jee K, Puchner B, et al. Angiopoietin-like 4 is a potent angiogenic factor and a novel therapeutic target for patients with proliferative diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(23):E3030–E3039.
40. Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion.* 1995;56(2):117–126.
41. Vilsbøll T, Agersø H, Krarup T, Holst JJ. Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):220–224.
42. Oubaha M, Miloudi K, Dejda A, et al. Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. *Sci Transl Med.* 2016;8(362):362ra144.
43. Kolibabka M, Dietrich N, Klein T, Hammes HP. Anti-angiogenic effects of the DPP-4 inhibitor linagliptin via inhibition of VEGFR signalling in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Diabetologia.* 2018;61(11):2412–2421.

Résumé

Introduction

Les patients diabétiques de type 2 (DT2) sont à haut risque de complications cardiovasculaires et de formes graves de COVID-19. Le DT2, l'athérosclérose et le COVID-19 ont pour point commun une pathogenèse liée à un état inflammatoire pathologique. Les monocytes sont capables d'avoir une action propre anti- ou pro-inflammatoire, mais aussi de s'infiltrer dans les tissus et de s'y différencier en macrophages. Dans cette thèse, nous testons l'hypothèse qu'ils pourraient être associés à la mise en place du diabète et de ces deux complications.

Méthodes

Les monocytes (totaux, classiques, intermédiaires et non classiques) d'une cohorte de DT2 ont été quantifiés (en immunophénotypage), puis leurs corrélations avec les données cliniques, biologiques et cardiovasculaires de ces patients ont été étudiées. Une analyse des modifications transcriptomiques des monocytes en fonction du risque cardio-vasculaire (RCV) a été réalisée.

Le modèle du diabète gestationnel a été utilisé pour évaluer les changements monocytaires (compte total et répartition des sous-groupes en immunophénotypage) entre la normoglycémie, le pré-diabète et le DT2. La relation entre le lipidome de ces femmes et les caractéristiques des monocytes a enfin été étudiée.

Les monocytes, analysés par immunophénotypage, de patients hospitalisés pour pneumopathie à COVID-19, diabétiques ou non, ont été comparés.

Résultats

Dans la population DT2 (n=340), le compte de monocyte est associé au sexe, à l'IMC, au tabagisme, à la créatininémie et au RCV. Seuls les monocytes classiques (MC) sont associés au RCV.

Le pourcentage de MC augmente entre la normo-glycémie (n=47), le pré-diabète(n=27) et le DT2(n=17), sans qu'une relation avec les modifications lipidomiques n'ait pu être identifiée.

Les patients DT2/COVID-19 (n=30) avaient une monocytopenie (expliquée par une diminution des MC) relative par rapport aux patients COVID-19 non-DT2(n=15), mais des monocytes plus gros.

Conclusion

De par leurs modifications de répartition, les monocytes semblent bien associés à la pathogenèse du diabète et de ses complications. Néanmoins leurs rôles exacts restent à explorer avant de pouvoir imaginer en faire une cible thérapeutique.