



HAL
open science

Rôle de TREM-1 au cours de l'obésité et de ses complications

Benjamin Brustolin

► **To cite this version:**

Benjamin Brustolin. Rôle de TREM-1 au cours de l'obésité et de ses complications. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0374 . tel-04513324

HAL Id: tel-04513324

<https://theses.hal.science/tel-04513324>

Submitted on 20 Mar 2024

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Benjamin BRUSTOLIN

Le 07/12/2022

Rôle de TREM-1 au cours de l'obésité et de ses complications

Directeur(s) de thèse :	Pr Sébastien GIBOT	PU-PH, INSERM UMR 1116, Nancy
Présidente de jury :	Pr Karine CLEMENT	PU-PH, INSERM unité Nutriomique, Paris
Rapporteurs :	Dr Cédric MORO	Dr, INSERM UMR 1297, Toulouse
	Pr Marie-pierre TEISSIER- CLEMENT	PU-PH, INSERM UMR 1094, Limoges
Examineur :	Pr Fabienne TAMION	PU-PH, INSERM UMR 1096, Rouen
Membre invité :	Dr Marc DERIVE	Dr, INOTREM, Nancy

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le docteur Cédric MORO et le professeur Marie-pierre TEISSIER-CLEMENT pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, pour l'analyse de ce manuscrit et l'ensemble des conseils et commentaires apportés m'ayant permis de perfectionner mon travail et ma réflexion.

Au professeur Karine CLEMENT pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ma thèse. Je tiens également à remercier professeur TAMION pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci au professeur Sébastien GIBOT, mon directeur de thèse et mon mentor, de m'avoir transmis votre passion pour les challenges scientifiques ainsi que pour la confiance et la liberté intellectuelle que vous m'avez accordées dans la gestion de ce projet de recherche. Puissiez-vous trouver dans ces quelques mots, un témoignage de toute mon estime.

Au Docteur Marc DERIVE, pour ton accueil au sein d'INOTREM et pour ton soutien sans faille tout au long de ce projet. Tu as été pour moi une source de motivation et restera un modèle pour ma carrière professionnelle.

Je remercie le Dr Patrick LACOLLEY, directeur de recherche INSERM U1116 pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je remercie également Véronique REGNAULT pour avoir soutenu ma candidature au concours de l'école doctorale.

Je remercie chaleureusement le Dr Amir BOUFENZER pour tes nombreux conseils, particulièrement en expérimentation animale et le soutien que tu m'as accordé ces nombreuses années. Merci également le temps consacré à la préparation du concours de l'école doctorale.

Je remercie sincèrement le Dr Kévin CARRASCO, à la fois un mentor mais avant tout un ami, pour m'avoir soutenu toutes ces années. Tes conseils, ta disponibilité, ta bonne humeur et ta bienveillance m'ont permis de dépasser mes limites et d'aller au bout de ce projet.

Je remercie le Dr Lucie JOLLY, bien que nous ayons tous les deux des caractères bien trempés, les choses n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci pour tes précieux conseils notamment en terme d'expérimentation animale et de biologie moléculaire.

Je remercie Nina TOULY, ma collègue de bureau, mon amie et ma confidente pour tous ces bons moments, pour ton aide dans ce projet, pour ton enseignement en biologie moléculaire mais surtout pour toute ta bienveillance. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec toi.

Merci à Julie VOISON CHRISTOPHE pour ton écoute et ta bienveillance. Nous avons commencé ensemble et cela me chagrine que notre collaboration prenne fin. Tu as été une véritable amie toutes ces années et j'espère que nous aurons encore l'occasion de travailler ensemble.

Je remercie très chaleureusement Nelly COLNE. Je t'ai connu lors de ton stage de licence 3, tu es aujourd'hui ingénieure d'étude : Sache que je suis très fier du chemin parcouru. Nous avons professionnellement grandi ensemble et ce fut un véritable plaisir de travailler avec toi.

Merci à Marine MAILLEFER ma collègue, mon amie, ma confidente et ma co-pilote. Merci pour ton indéfectible soutien toutes ces années. Merci pour ces longues journées et soirées au laboratoire, pour ta présence lors des moments difficiles mais également pour tous ces fous rires. Ta présence et tes conseils ont grandement participé à la réussite de ce projet.

Merci au docteur Lucas Benoit pour ton soutien inconditionnel depuis notre rencontre en master 1. Notre amitié est l'une des choses les plus précieuses à mes yeux. Merci pour ton inspiration et pour toutes ces discussions fascinantes autour de nos projets scientifiques.

Je souhaite également remercier Marc Damien LOURENCO RODRIGUES et Pauline RENARD pour votre bonne humeur et votre aide dans la réalisation des coupes histologiques.

Je souhaite remercier toute l'équipe de l'animalerie centrale de la faculté de médecine de Nancy pour votre accueil et vos conseils avec une pensée toute particulière à Sylvain POUSSIER, le docteur Isabelle LARTAUD et Anne-Laure LEBLANC.

J'aimerais remercier les nombreuses personnes dont j'ai croisé le chemin ces dernières années, qui ont fait de cette thèse un moment agréable : Cassandra, Arthur, Mélie, Céline, Manon, Djésia, Pauline, Matthieu...

Enfin, ce manuscrit n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien inconditionnel de mes parents, mon frère Nicolas, ma belle sœur Emelyn, mon oncle Bertrand, ma tante Isabelle ainsi que de Claire, Pauline, Xavier, Stéphane, Rémi, Marion et AL qui ont cru en moi et ont toujours été présents.

Remerciements.....	1
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Abréviations	10
Contexte de l'étude	12
Partie 1 : Revue de littérature	13
Chapitre 1 : L'obésité, un enjeu majeur de santé publique.....	13
I. Définition.....	13
II. Epidémiologie.....	16
III. Origine multifactorielle	17
1. Génétique de l'obésité : un exemple de facteur de risque individuel.....	18
1.1. Mise en évidence de la composante héréditaire de l'obésité.....	18
1.2. L'obésité monogénique : mise en évidence de la Leptine.....	19
1.3. L'obésité polygénique	20
2. Exemples de facteurs environnementaux.....	22
2.1. Influence des facteurs environnementaux lors de la vie fœtale	22
2.2. Influence de l'environnement pathogène	22
Chapitre 2 : Le tissu adipeux : Organe cible de l'obésité	24
I. Généralités : Rôle du Tissu adipeux	24
1. Le tissu adipeux blanc	24
2. Le tissu adipeux brun	25
3. Le tissu adipeux beige	26
II. Répartition anatomique du tissu adipeux blanc	27
1. La répartition des dépôts adipeux	27
1.1. Les tissus adipeux blancs sous cutanés.....	27

1.2.	Les tissus adipeux blancs viscéraux	28
2.	Localisation et comorbidités associées	29
2.1.	L'hypothèse de la veine porte.....	30
2.2.	Les différences de sécrétions métaboliques.....	30
Chapitre 3 : Les mécanismes inflammatoires associés à l'obésité		32
I.	Facteurs déclencheurs de l'inflammation chronique au cours de l'obésité	32
1.	La création de dépôts ectopiques	32
2.	Le rôle de l'hypoxie	34
3.	Rôle du microbiote	37
II.	Rôle du tissu adipeux blanc dans le développement et le maintien de l'inflammation de bas grade	40
1.	Les adipocytes et les pré-adipocytes	40
2.	La fraction vasculaire stromale	45
2.1.	Rôle des monocytes et des macrophages	45
2.2.	Les cellules dendritiques	48
2.3.	Les lymphocytes.....	48
2.4.	Les éosinophiles	49
2.5.	Les neutrophiles.....	49
Chapitre 4 : Comorbidités associées à l'obésité		51
I.	La stéatopathie métabolique	51
II.	La résistance à l'insuline et le diabète de type 2	52
III.	Remodelage et dysfonction cardiaque	55
Chapitre 5 : Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1		58
I.	La famille des récepteurs TREM	58
II.	La structure de TREM-1.....	60

III. La fonction de TREM-1	61
IV. La modulation de TREM-1 : Une nouvelle approche thérapeutique	64
Partie 2 : Etude personnelle	66
Objectif du travail	67
Matériels et Méthodes	68
I. Etude <i>in vitro</i>	68
1. Culture cellulaire	68
2. Western blot : Analyse de l'expression protéique de TREM-1	69
3. Microscopie confocale	70
4. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	70
II. Etude <i>In vivo</i>	71
1. Animaux	71
2. Echographie cardiaque	73
3. Test de tolérance au glucose	73
4. RT-qPCR	73
5. Western blot	76
6. Etude histologique	76
III. Statistiques	76
Résultats	78
I. Le rôle de TREM-1 au sein des (pré-)adipocytes	78
1. TREM-1 est exprimé par les (pré-)adipocytes sous cutanés et omentaux	78
2. TREM-1 est fonctionnel au sein des (pré-)adipocytes sous cutanés et omentaux	80
II. La délétion de <i>Trem-1</i> réduit les conséquences de l'obésité	82
1. La délétion de <i>Trem-1</i> limite la prise de poids chez la souris	82

2.	L'inflammation de bas grade est réduite chez les souris n'exprimant pas TREM-1	85
3.	La délétion de <i>Trem1</i> protège de la résistance à l'insuline.....	89
4.	La délétion de <i>Trem1</i> protège les souris de la dysfonction myocardique	93
	Discussion.....	95
	Perspectives et limites de l'étude.....	101
	Conclusion	103
	Bibliographie	104
	Annexes.....	124
I.	Article en cours de soumission.....	Erreur ! Signet non défini.
II.	Bilan de formation.....	147
1.	Valorisation scientifique.....	147
2.	Accompagnement à la thèse	148
3.	Préparation à l'après thèse	149

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la balance énergétique et des facteurs pouvant l'influencer ...	21
Figure 2 : Les capacités endocriniennes du tissu adipeux blanc.....	25
Figure 3 : Répartition des principaux dépôts adipeux blancs chez l'homme et la souris	28
Figure 4 : Conséquences de la création de dépôts graisseux ectopiques.....	33
Figure 5 : L'expansion désordonnée du tissu adipeux induit la présence d'hypoxie	36
Figure 6 : La dysbiose intestinale durant l'obésité.....	39
Figure 7 : Rôle des adipocytes dans la mise en place de l'inflammation chronique de bas grade	41
Figure 8 : Modification du tissu adipeux au cours de l'obésité	47
Figure 9 : Mécanismes d'évolutions de la stéatopathie métabolique.....	52
Figure 10 : Voie de signalisation de l'insuline dans les hépatocytes	53
Figure 11 : Mécanisme de mise en place du diabète de type 2.....	54
Figure 12 : Mécanismes de remodelage cardiaque au cours de l'obésité.....	57
Figure 13 : La famille des récepteurs TREM humains et murins.....	59
Figure 14 : Mécanisme d'association de TREM-1 et de DAP-12	60
Figure 15 : Voies de signalisation de TREM-1/DAP12	63
Figure 16 : Plan expérimental de l'étude <i>in vivo</i>	72
Figure 17 : TREM-1 est exprimé par les (pré)-adipocytes sous-cutanés et omentaux	79
Figure 18 : L'activation de TREM-1 amplifie l'inflammation induite par LPS dans les (pré-))adipocytes sous-cutanés et omentaux humains.....	81
Figure 19 : La délétion de <i>Trem1</i> limite la prise de poids chez les souris nourries avec un régime riche en graisse.....	83
Figure 20 : La délétion de <i>Trem1</i> diminue l'inflammation chez les souris obèses	86
Figure 21 : La délétion de <i>Trem1</i> réduit l'infiltrat inflammatoire dans les tissus adipeux des souris obèses	88

Figure 22 : La délétion de *Trem1* préserve la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses... 92

Figure 23 : La délétion de *Trem1* préserve la fraction de raccourcissement chez les souris obèses..... 93

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du surpoids et de l'obésité par l'IMC selon l'OMS	13
Tableau 2 : Méthode de mesure alternatives de la répartition de la masse corporelle	15
Tableau 3 : Caractéristiques des adipocytes blancs, bruns et beiges	27
Tableau 4 : Influence de la leptine sur les acteurs de l'immunité	43
Tableau 5 : Sécrétions impliquées dans la mise en place et le maintien de l'inflammation de bras grade par le tissu adipeux blanc au cours de l'obésité	44
Tableau 6 : Liste des amorces utilisées au cours de l'étude in vivo.....	75
Tableau 7 : Poids (g) des souris à 12 semaines de régime	84
Tableau 8 : Résultats des principaux paramètres étudiés	94

Abréviations

ACRP30 : Adipocyte Complement-Related Protein of 30 kDa	Ig : Immunoglobulin
AGNE : Acides Gras Non Estérifiés	IL : Interleukin
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	IMC : Indice de Masse Corporelle
AMPK : 5'-AMP-activated protein Kinase	IR : Insulin Receptor
AP1 : Activator Protein 1	ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
aP2 : Adipocyte Protein 2	JAK : Janus Kinase
ARPs : angiopoietin-related proteins	l'IFN γ : Interferon γ
ATGL : Adipose triglyceride lipase	LA : Left Atrium
ATP : Adénosine TriPhosphate	LPL : Lipoprotéine Lipase
BAD : BCL-2 Antagonist of Cell Death	LPS : Lipopolysaccharide
BAT : Brown Adipose Tissue	LV : Left Ventricule
BAX : BCL-2- Associated X-Protein	LYVE-1+ : Lymph Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor-1
BID : BH3-Interacting Death Domain agonist	MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase
BSA : Bovine Serum Albumin	MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
Cbl : Casitas B-lineage Lymphoma	MHO : Obèse métaboliquement sain
CD : Cluster of Differentiation	MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
CGI-58 : Comparative Gene Identification-58	MIP-1 β : Macrophage Inflammatory Proteins 1 β
CLS : Crown Like Structure	MMP: matrix metalloproteinases
COX-2 : Cyclooxygénase-2	mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
CSF1 : Colony-Stimulating Factor 1	MUHO : Obèse métaboliquement non sain
DAMPs : Damage Associated Molecular Pattern	NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease
DAP-12 : DNAX Activating Protein of 12 kDa	NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
ELLA : Ella Automated Immunoassay Systems	NF-kB : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2	NK : Natural Killer
FABP : Fatty Acid Binding Protein	NLR : Nod Like Receptor
FATP : Fatty Acid Transport Protein	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
FBS : Fetal Bovine Serum	PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
Fiaf : Fasting-induced adipose factor	PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
FoxO1 : Forkhead box protein O1	PCR : Polymerase Chain Reaction
G3P : Glycérol-3-Phosphate	PGLYRP1 : Peptidoglycan Recognition Protein 1
GRB2 : Growth Factor Receptor Binding Protein-2	PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
<u>HFD : High Fat Diet</u>	PKA : Protéine Kinase A
HIF-1 α : Hypoxia-Inductible Factor-1	
HMGB1 : high mobility group box 1	
HSL : Hormone Sensitive Lipase	

PLCy : Phospholipase C γ

PLIN1 : Perilipin 1

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

PRR : Pattern Recognition Receptor

ROS : Reactive Oxygen Species

RV : Right Ventricule

SAA : S rum amylo de A ; CRP : C Reactive Protein

SOS : Son of Sevenless

STATs : Signal Transducer and Activator of Transcription proteins

SYK : Spleen Tyrosine Kinase

T2DM : Type 2 Diabetes Mellitus

TLR : Toll Like Receptor

TLT : TREM Like Transcript

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TREM : Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells

UCP-1 UnCoupling Protein-1

VCAM : Vascular Cell Adhesion Protein

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

WAT : White Adipose Tissue

Zap70 : Zeta-chain-Associated Protein kinase-7

PRR : Pattern Recognition Receptor

ROS : Reactive Oxygen Species

RV : Right Ventricle

SOS : Son of Sevenless

STATs : Signal Transducer and Activator of
Transcription proteins

SYK : Spleen Tyrosine Kinase

T2DM : Type 2 Diabetes Mellitus

TLR : Toll Like Receptor

TLT : TREM Like Transcript

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TREM : Triggering Receptors Expressed on Myeloid
cells

UCP 1 UnCoupling Protein 1

VCAM : Vascular Cell Adhesion Protein

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

WAT : White Adipose Tissue

Zap70 : Zeta chain Associated Protein kinase 70

Contexte de l'étude

L'obésité est considérée comme enjeu de santé publique majeur pouvant aboutir à de nombreuses comorbidités telles que les maladies hépatiques non alcooliques, l'insulino-résistance, le diabète de type 2, les troubles musculosquelettiques (arthrose), certains cancers (Sein, ovaire, prostate, colon...) et les maladies cardiovasculaires. Au cours l'obésité, il se développe un mécanisme d'inflammation de bas grade qui joue un rôle important dans le développement de ces comorbidités. Le tissu adipeux, qui a longtemps considéré comme un organe inerte ayant pour seul rôle le stockage énergétique, est en réalité est en grande partie impliqué dans le développement et le maintien de cet état pro-inflammatoire via la production de médiateurs de l'inflammation. De nombreuses études ont mis en évidence que l'inhibition de cet état inflammatoire chronique permettrait de réduire les conséquences de cette maladie.

Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur l'immuno-récepteur TREM-1 qui a pour rôle l'amplification de la réponse inflammatoire et qui est impliqué de façon délétère dans de nombreuses maladies inflammatoires aiguës (choc septique, infarctus du myocarde etc.) ou chroniques (athérosclérose, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin). TREM-1 a précédemment fait l'objet de recherches dans le contexte de l'obésité et a notamment été mis en évidence comme étant surexprimé les patients obèses et diabétiques.

L'objectif de cette thèse est d'analyser l'implication du récepteur TREM-1 dans l'obésité comme cela a déjà été étudié dans d'autres maladies inflammatoires. Plus spécifiquement les objectifs visent à :

- Etudier l'expression *in vitro* de TREM-1 au sein des pré-adipocytes et adipocytes sous cutanés et viscéraux humains.
- Moduler ce récepteur afin de déterminer sa fonctionnalité et son rôle dans la sécrétion de médiateurs de l'inflammation.
- Observer l'effet de sa délétion dans un modèle de souris obèse afin d'évaluer son impact sur les conséquences de l'obésité (prise de poids, tolérance au glucose, développement des comorbidité).

Partie 1 : Revue de littérature

Chapitre 1 : L'obésité, un enjeu majeur de santé publique

I. Définition

D'après l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de masse grasse qui représente un risque pour la santé et pouvant réduire l'espérance de vie.

En pratique clinique, la masse adipeuse peut être définie par une simple estimation à partir d'une formule combinant le poids et la taille. Elle se base sur l'hypothèse que les principales variations de poids chez une personne de même taille sont dues à des variations de la masse grasse. Cette estimation, principalement utilisée dans les études épidémiologiques, est appelée Indice de Masse Corporelle (IMC). Il se calcule en divisant le poids (kg) par le carré de la taille (m). A partir de cet indice, un ensemble d'experts de l'OMS a mis en place une classification du surpoids et de l'obésité (**Tableau 1**) basée sur des corrélations entre l'IMC et la mortalité (Nuttall, 2015).

Classification	IMC (kg/m ²)
Valeur de référence	18,5-24,9
Surpoids	≥ 25
Pré obésité	25-29,9
Obésité	≥ 30,0
Classe I : Modéré	30,0-34,9
Classe II : Sévère	35-39,9
Classe III : Morbide	≥ 40,0

Tableau 1 : Classification du surpoids et de l'obésité par l'IMC selon l'OMS

Cette technique de mesure est non invasive, simple, rapide et non onéreuse. En épidémiologie, cet indice est un outil capable de donner des informations importantes telles que l'augmentation ou la diminution de la masse grasseuse au niveau d'un individu, l'identification des individus et groupes à risque de morbidités et d'identifier les priorités d'interventions au niveau individuel et communautaire. Ce système de mesure est également très souvent utilisé comme critère d'inclusion en recherche clinique.

Toutefois, cet outil de mesure ne permet pas de distinguer la masse dite « grasse » (tissus adipeux sous cutané et viscéral) de la masse dite « maigre » (eau corporelle, organes, muscles). De plus, il ne prend pas en compte la distribution anatomique de la graisse corporelle qui peut se disposer de deux manières différentes : au niveau des cuisses et des hanches (obésité gynoïde) ou dans la région abdominale (obésité androïde). Il a pourtant été mis en évidence que l'obésité androïde est associée à une augmentation de la résistance à l'insuline (Aucouturier et al., 2009) et des facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires chez l'enfant et l'adolescent (Lätt et al., 2018). Bien qu'il existe d'autres méthodes de mesure, l'IMC reste le principal outil prédictif utilisé au cours de l'obésité **(Tableau 2)**.

METHODE	MESURE	AVANTAGE	INCONVENIENT
BIO-IMPEDANCE ELECTRIQUE	<ul style="list-style-type: none"> - Eau corporelle totale - Masse des tissus maigres, gras et musculaires 	<ul style="list-style-type: none"> Rapide Peu onéreuse 	Risque d'erreurs en fonction de la déshydratation
ABSORPTIOMETRIE A RAYONS X	<ul style="list-style-type: none"> - Masse osseuse - Masse grasse viscérale - Masse maigre 	<ul style="list-style-type: none"> Facile d'utilisation Bonne précision Bonne reproductibilité 	Inclue une faible quantité de radiation Equipements coûteux
RESONNANCE MAGNETIQUE QUANTITATIVE	<ul style="list-style-type: none"> - Eau corporelle totale - Masse grasse 	<ul style="list-style-type: none"> Rapide Facile d'utilisation 	Equipements coûteux
SPECTROSCOPIE A RESONNANCE MAGNETIQUE	<ul style="list-style-type: none"> - Tissu adipeux viscéral et sous cutané - Muscle squelettique - Organes (foie, cœur, reins, pancréas, rate) 	<ul style="list-style-type: none"> Haute précision Haute reproductibilité 	Très onéreuse

Tableau 2 : Méthode de mesure alternatives de la répartition de la masse corporelle

(D'après Lemos and Gallagher, 2017)

II. Epidémiologie

En raison de l'augmentation rapide et mondiale de l'obésité, l'OMS a qualifié cette maladie d'épidémie non infectieuse. L'augmentation du surpoids et de l'obésité touche aussi bien les pays développés comme les pays en voie de développement. Paradoxalement, la malnutrition et l'obésité coexistent, bien que cette maladie touche préférentiellement les populations urbaines et les régions économiquement avancées.

Selon l'OMS, l'obésité a presque triplé à l'échelle mondiale depuis les années 1975. En effet, en 2016, plus de 1,9 milliard de personnes de plus de 18 ans étaient au moins en surpoids. Parmi elles, plus de 650 millions étaient obèses, représentant respectivement 39% et 13% de la population adulte mondiale. En 2019, l'OMS estimait que 38,2 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses.

L'édition 2020 de l'étude ObEpi a poursuivi les précédentes enquêtes conduites en 1998, 2000, 2003, 2006, 2009 et 2012 dans le but, entre autre, d'évaluer l'évolution de la prévalence du surpoids et de l'obésité. Cette enquête réalisée par Roche impliquait 11827 individus comprenant 9598 individus âgés de 18 ans et plus et 2229 français de moins de 18 ans. L'enquête a révélé que presque un français sur deux étaient en situation de surpoids ou d'obésité : 30,3 % étaient situation de surpoids et 17,0 % présentaient un IMC supérieur à 30. L'augmentation du surpoids et de l'obésité s'est poursuivi sans relâche en France depuis 1997 pour atteindre un taux de 47,3 % en 2012. Les données de 2020 montrent que la prévalence du surpoids et de l'obésité s'est stabilisée en France. Cependant cette stabilisation est due au fait que l'on observe un recul du surpoids de 2 % depuis 2012 mais une augmentation de l'obésité de 2 %. L'obésité massive a également augmenté de 0,8 % depuis 2012. Bien que les femmes restent les plus touchées, la progression de l'obésité est la plus forte chez les hommes avec notamment l'obésité massive qui a été multiplié par 3 depuis 2012 (0,6% à 1,8%). La prévalence de l'obésité augmente dans toutes les catégories d'âge à l'exception des 55-64 ans qui diminue depuis 2009 (19,8 % à 19,2 %). La prévalence du surpoids et l'obésité augmente également chez l'enfant : 19 % des enfants de 8 à 17 ans sont en situation de surpoids et 6% présentent une obésité. La prévalence de l'obésité progresse dans l'ensemble des catégories socioprofessionnelles mais est deux fois plus élevée chez les ouvriers et employés (18,0 %/17,8 %) que chez les cadres (9,9 %).

III. Origine multifactorielle

Quel que soit le type de population concernée, le surpoids est dû avant tout à un déséquilibre de la balance énergétique se traduisant par des apports supérieurs aux dépenses énergétiques de manière répétée pendant une période donnée.

L'apport énergétique est la quantité d'énergie produite par un individu à partir des macronutriments consommés généralement mesuré en calories. La prise alimentaire est régulée par des mécanismes complexes dont l'acteur principal est la leptine (Cf section 1.2.). La consommation excessive d'aliments ou de boissons à haute densité énergétique est responsable du déséquilibre de la balance énergétique : un écart énergétique régulier de l'ordre de 1 à 2 % en faveur des apports est suffisant pour une augmentation de poids significative sur le long terme (Hall *et al.*, 2011). En effet, de l'ordre la consommation régulière d'aliments ayant une densité énergétique supérieure à 225 kcal/100g (941 kj/100g) est associée à un risque accru de prise poids (Anderson *et al.*, 2015).

Les dépenses énergétiques, quant à elles, font références à la quantité d'énergie qu'un individu utilise pour maintenir ses fonctions corporelles (digestion, respiration, circulation) et avoir une activité physique. Elles sont dépendantes de trois actions principales (Bergouignan and Blanc, 2006) (Chen *et al.*, 2020) :

- Le taux métabolique basal, c'est-à-dire la quantité d'énergie nécessaire pour que les fonctions essentielles d'un organisme puissent fonctionner à l'état de repos, représente 60 à 75% des dépenses énergétiques au repos. Ces fonctions incluent entre autres : La régulation du système cardio-respiratoire, des fonctions gastro-intestinales et rénales ainsi que la thermorégulation. Le taux métabolique basal varie selon le sexe et l'âge.
- La thermogénèse post-prandiale est responsable de 8 à 12 % des dépenses énergétiques. Elle est le résultat de la digestion, de l'absorption et du transport de nutriment. Il existe un autre processus possible : La thermogénèse adaptative qui est une augmentation temporaire des dépenses énergétiques lorsqu'il y a nécessité de maintenir la température corporelle stable.

- L'activité physique représente en moyenne entre 15 et 30% des dépenses énergétiques mais peut varier de manière considérable. Elle fait référence à l'énergie dépensée lors de l'exécution des tâches quotidiennes et de l'exercice physique réalisé.

L'apport énergétique doit correspondre à la dépense énergétique pour assurer un bilan énergétique nul. Il y a gain de poids si l'apport énergétique dépasse la dépense par la suralimentation et/ou par un comportement sédentaire. La cause principale de l'obésité est liée au régime alimentaire, à la qualité des aliments consommés et à la sédentarité. Cependant le manque d'activité physique et l'ingestion excessive de macronutriments ne sont pas les seuls facteurs pouvant influencer sur la prévalence de cette maladie (Mozaffarian et al., 2011).

1. Génétique de l'obésité : un exemple de facteur de risque individuel

1.1. Mise en évidence de la composante héréditaire de l'obésité

L'hypothèse selon laquelle le développement du surpoids et de l'obésité peut provenir de causes endogènes a été de nombreuses fois étudiée. Le risque d'obésité chez l'enfant et l'adolescent est plus élevé si l'un des parents est obèse. Ce risque est accru si les deux parents sont obèses (Reilly et al., 2005). Afin de déterminer le rôle des facteurs génétiques dans le développement de l'obésité indépendamment de l'environnement, plusieurs études sur des jumeaux adoptés ont été réalisées et ont montré que les variations de poids sont similaires lors d'un changement de la balance énergétique chez les jumeaux monozygotes (Bouchard et al., 1990). De plus, une étude de la masse grasseuse menée chez 540 jumeaux Danois monozygotes adoptés a montré que leurs poids d'adulte était proche de leurs parents biologiques malgré le fait d'avoir été élevés dans une famille adoptive et donc dans des environnements différents (Stunkard et al., 1986). Ces études mettent en évidence la composante héréditaire de l'obésité. En revanche cette composante génétique ne peut être considérée comme causale indépendamment de l'environnement car il a été souligné que l'activité physique permet de prévenir le développement de l'obésité quelle que soit la prédisposition génétique à devenir obèse (Samaras et al., 1999).

1.2. L'obésité monogénique : mise en évidence de la Leptine

Certaines formes d'obésité ont pour origine une mutation unique sur un gène majeur. Ces formes d'obésité monogéniques restent rares chez l'humain mais sont généralement extrêmement sévères, très précoces et associées à des déficits endocriniens. Les mutations surviennent généralement sur des gènes dont l'expression est fortement impliquées dans les dépenses énergétiques et la prise alimentaire. Parmi ces mutations on peut citer celle du gène *ob* codant pour la leptine ou du gène *db* codant pour son récepteur (Montague et al., 1997) (Clément et al., 1998).

La leptine, principalement produite par les tissus adipeux, est une hormone clé dans la régulation de la prise alimentaire par son rôle essentiel dans la communication entre le système nerveux central et le tissu adipeux (Zhang and Chua, 2017). Elle a été identifiée en 1994 chez la souris possédant une mutation du gène *ob* (Zhang *et al.*, 1994) et chez l'Homme en 1995 (Pelleymounter *et al.*, 1995) (Halaas *et al.*, 1995). Plusieurs populations de neurones présentes dans l'hypothalamus sont particulièrement sensibles à la leptine. Ces mêmes populations de neurones expriment des peptides orexigènes tels que le peptide apparenté à l'agouti (AgRP) et le neuropeptide Y (NPY) (Ahima and Flier, 2000)(Cone, 2005). La fixation de la leptine sur les récepteurs de ces neurones va entraîner une inhibition de ces voies orexigènes (Coll, Farooqi and O'Rahilly, 2007). On peut observer chez les souris dépourvues de leptine (*ob/ob*), des comportements hyperphagiques et de ce fait, un développement rapide de l'obésité. Ce modèle permet également d'observer une hyper-insulinémie, une hyperglycémie et une hyperlipidémie (Lindström, 2007). Chez les souris sauvages, les cellules β possèdent des récepteurs pour la leptine qui ont pour action d'inhiber la libération d'insuline. Les souris *ob/ob* étant dépourvu de leptine, elles sont caractérisées par l'augmentation massive du volume des îlots pancréatiques (10 fois plus élevé que les souris sauvages) de la population de cellules β et donc de la sécrétion d'insuline (Gepts, Christophe and Mayer, 1960). Ce modèle est très largement utilisé pour les études de l'obésité et du diabète de type 2.

Les patients développent une obésité sévère dans les premiers mois de la vie, une hyperphagie et des troubles endocriniens. Dans le cas d'une mutation du gène *ob*, l'injection quotidienne de leptine en sous cutanée permet une amélioration significative des symptômes : La diminution de l'hyperphagie et l'augmentation des dépenses énergétiques conduisant à une

perte significative de la masse adipeuse ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline. Cependant l'injection de leptine n'a pas d'effet chez les individus ayant une mutation du gène *db* (Farooqi et al., 2002).

1.3. L'obésité polygénique

Dans les population adultes, l'apparition de l'obésité ne peut être expliquée par la survenue de mutations génétiques. Cependant il existe de nombreux gènes de susceptibilités qui, pris indépendamment, ont une rôle faible sur la croissance pondérale. C'est la contribution accumulative de ces variants génétiques associés à des facteurs environnementaux qui entraînent leur expression au niveau phénotypique (Loos and Yeo, 2022). Ce phénomène explique la complexité de la recherche sur l'obésité polygénique. Cependant, ces dernière années, le développement des techniques de séquençages a permis de mettre en évidence de nombreuses mutations de gènes associées à des formes d'obésité polygénique (Hinney et al., 2010). Ces variants génétiques sont impliqués dans des voies de régulations de la prise alimentaire ou de la dépense énergétique. Les études de l'obésité polygénique ont permis l'identification de 127 gènes candidats (Yang et al., 2007). Parmi eux on trouve des gènes impliqués dans la voie de la mélanocortine qui joue un rôle clé dans la prise alimentaire tels les gènes codants pour les récepteurs de la mélanocortine et de la proprotéine convertase (PCSK1) (Yang et al., 2007).

L'obésité est donc une maladie complexe mettant en jeu de nombreux facteurs génétiques, environnementaux, psychologiques et socio-économiques (**Figure 1**).

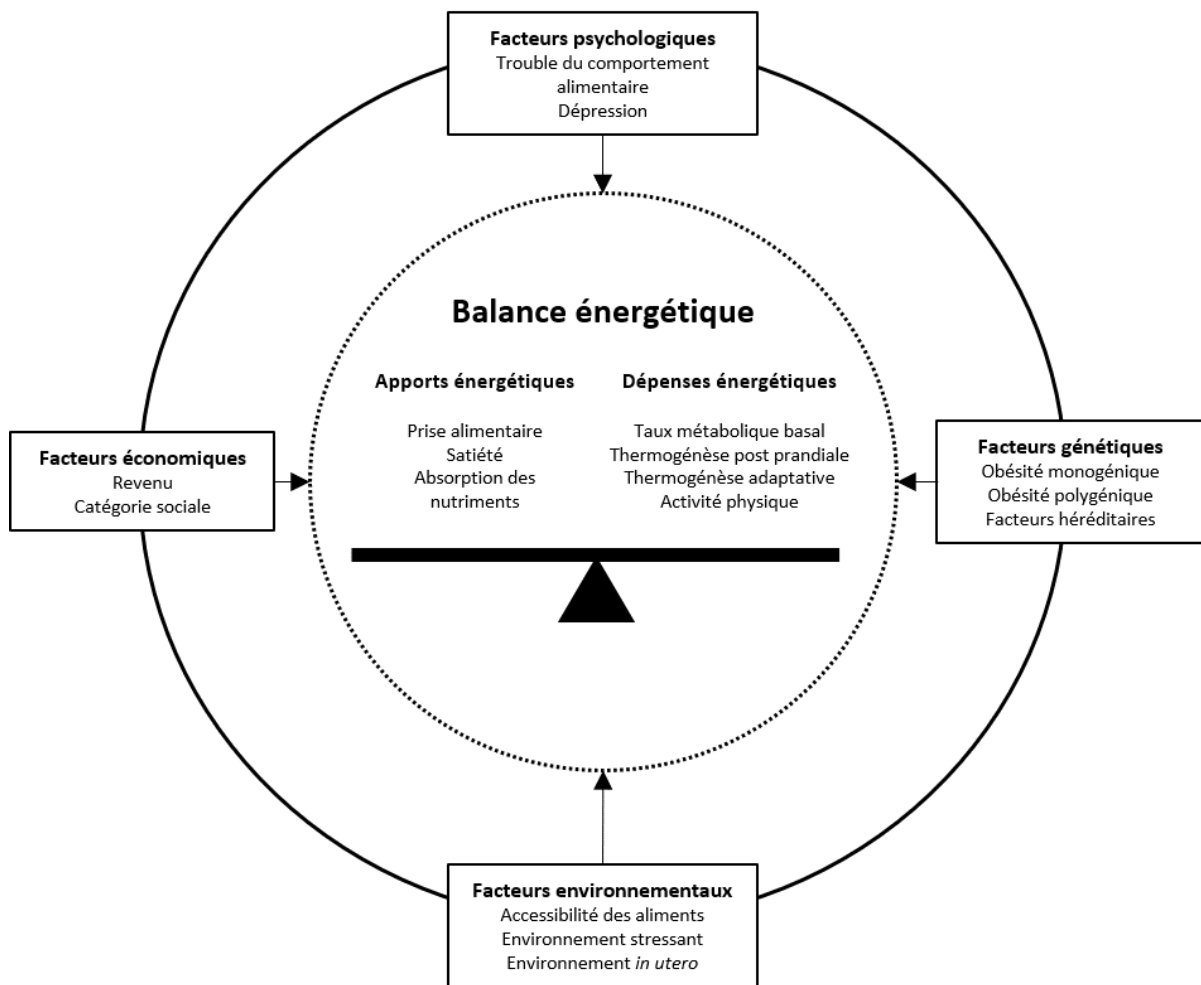


Figure 1 : Représentation de la balance énergétique et des facteurs pouvant l'influencer

2. Exemples de facteurs environnementaux

2.1. Influence des facteurs environnementaux lors de la vie fœtale

Les prédispositions à l'obésité et aux maladies métaboliques associées peuvent résulter de l'influence de facteurs environnementaux lors du développement fœtal : une cohorte humaine a permis la mise en évidence le lien entre un faible poids à la naissance et un risque accru du développement de maladies cardiovasculaires, de diabète de type 2 et du syndrome métabolique chez l'adulte (Osmond and Barker, 2000). Ces observations ont été confirmée chez le rat : En effet une restriction calorique de 50 % lors de la dernière semaine de gestation entraîne une déficience de la formation des cellules (Garofano et al., 1997). Ce phénomène est amplifié lorsque cette restriction durant la lactation (Garofano et al., 1998). Chez le rat, une restriction calorique de 80% chez la mère entraîne une hypertension systolique, l'augmentation des concentrations d'insulines à jeun, des comportements hyperphagiques et l'obésité des progénitures (Vickers et al., 2000).

La surnutrition maternelle quant à elle, peut également avoir des effets similaires sur le développement de la progéniture : Chez les mères souffrant d'obésité et/ou de diabète gestationnel important, le fœtus est exposé a des concentrations importantes de glucose, lipides et d'acides aminé entraînant une surstimulation du pancréas ayant pour conséquence le développement d'une hyperinsulinémie ainsi qu'une croissance exacerbée du fœtus (Fall and Kumaran, 2019) (Huda et al., 2010). Des études ont confirmées que ces effets pouvaient avoir des conséquence à long terme pour le fœtus, même lors de sa vie adulte. En effet les fœtus issues de mères souffrant d'obésité ont un risque accrue de développer un syndrome métabolique lors de leur vie adulte (Godfrey et al., 2017) (Gaillard et al., 2016).

2.2. Influence de l'environnement pathogène

De plus en plus d'études montrent l'influence de l'environnement pathogène comme potentiel cause du développement de l'obésité chez l'humain et l'animal.

Le virus responsable de la maladie de carré fut le premier agent pathogène mis en évidence comme pouvant être responsable du développement de l'obésité chez la souris (Lyons et al., 1982). En plus du développement de l'obésité, on observe chez les souris infectées la mise en place d'une inflammation au niveau de l'hypothalamus ainsi qu'une diminution de

l'expression des récepteur de la leptine au niveau de celui-ci ce qui a pour conséquence un déséquilibre de la prise alimentaire et donc de la balance énergétique (Bernard et al., 1999). Il a été également observé une hyperplasie des îlots pancréatiques ainsi qu'une augmentation des niveaux des triglycérides et du glucose sanguin (Mitra and Clarke, 2010).

Par la suite, d'autres virus ont été mis en évidence comme capable de promouvoir l'obésité. Parmi eux les adénovirus humains Ad-36, Ad-5 et Ad-37 provoquent une augmentation de l'adipogénèse chez le rat, la souris et le poulet respectivement comparé aux groupes contrôles malgré une prise énergétique similaire (Whigham et al., 2006).

Pour étudier plus en détail l'influence de ces virus sur le développement de l'obésité, plusieurs études in vitro ont été réalisées notamment sur l'adénovirus humain 36. Ces études montrent une accélération de la prolifération et de la différenciation des pré-adipocytes de la lignée 3T3-L1 humaine en adipocyte (Dhurandhar et al., 2000).

Pour des raisons évidentes d'éthique, les études humaines sur rôle des adénovirus comme vecteurs de l'obésité restent limitées. Cependant plusieurs études ont montré une corrélation entre la présence d'anticorps anti Ad-36 et le développement de l'obésité (Ponterio and Gnessi, 2015).

Chapitre 2 : Le tissu adipeux : Organe cible de l'obésité

I. Généralités : Rôle du Tissu adipeux

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif lâche constitué à 90% de lipides. De manière traditionnelle ce tissu est réparti en deux catégories : Le tissu adipeux blanc constituant la majorité du tissu adipeux, et le tissu adipeux brun composé de cellules hautement spécialisées impliquées dans la thermorégulation. Ces tissus sont caractérisés par leurs morphologie, développements et fonctions (**Tableau 2**).

1. Le tissu adipeux blanc

Historiquement, le tissu adipeux blanc a longtemps été considéré comme un organe peu complexe et inerte. Ces dernières années, il fut l'objet d'un regain d'intérêt notamment en raison de l'augmentation de l'obésité dans les populations des pays industrialisés et de l'enjeu majeur de santé publique qui en découle. Il a pour rôle principal la régulation de la balance énergétique et l'homéostasie nutritionnelle. Cela se traduit par le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides dans de larges et uniques gouttelettes lipidiques au sein des adipocytes de type blanc (La lipogenèse) mais également par l'utilisation de cette même réserve en cas de demande énergétique (La lipolyse). Il offre également une isolation thermique et possède d'importantes propriétés mécaniques servant à protéger les organes les plus fragiles mais également à amortir les parties du corps ayant des niveaux élevés de contraintes mécaniques.

De manière plus récente, il est considéré comme un tissu endocrinien (**Figure 2**). En effet, c'est un tissu très hétérogène capable de sécréter de nombreuses hormones, cytokines et chimiokines appelées adipokines (Leptine, adiponectine etc.). De ce fait ce tissu régule de nombreuses fonctions de l'organisme telles que la prise alimentaire (Harris, 2014), la réponse immunitaire (Ferrante, 2013), les fonctions thyroïdiennes (Obregon, 2014), la pression sanguine (Engeli et al., 2004) ou encore les fonctions de reproduction (Reverchon et al., 2014). Au cours de l'obésité, le tissu adipeux blanc va avoir un rôle majeur dans la genèse et la perpétuation de l'inflammation de bas grade (Cf : chapitre 3, II).

Proteins involved in angiogenesis and vascular homeostasis

VEGF
PAI-1

Cytokines

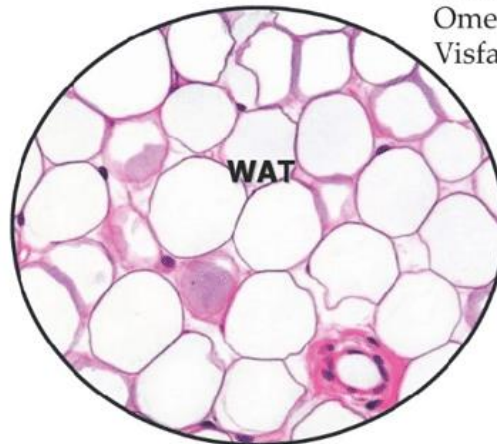
TNF α ; IL-6
IL-1 β ; IL-8
IL-18

Growth Factors

TGF- β

Regulators of lipid metabolism

RBP
Lipocalin-2



Chemokine

MCP-1
CXCL5

Regulators of glucose metabolism

Resistin
Omentina
Visfatin

Hormones

Leptin
Adiponectin

acute inflammation proteins

Haptoglobin
PCR

complement factors

Adipsina
Complement Factor-B

Figure 2 : Les capacités endocriniennes du tissu adipeux blanc

(Divella et al., 2016)

2. Le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun possède une fonction de thermogénèse : En cas d'exposition au froid, la stimulation des récepteurs β 3-adrenergiques par la noradrénaline à la surface des adipocytes bruns provoque la lipolyse des triglycérides aboutissant à la libération d'acides gras permettant d'alimenter la chaîne respiratoire. Les adipocytes bruns expriment la protéine Uncoupling Protein-1 (UCP-1) qui est capable de créer une alternative au gradient de proton de la chaîne respiratoire pour dissiper l'énergie sous forme de chaleur. (Betz and Enerbäck, 2018) (Jung et al., 2019).

Une étude a mis en évidence la capacité des adipocytes bruns à se trans-différencier de manière réversible en adipocytes blancs. Ce phénomène s'accompagne par une inhibition progressive de UCP-1 et une augmentation de l'expression de la leptine (Cancello et al., 1998). A l'inverse il semblerait que les adipocytes blancs soient également capables de transdifférenciation en adipocytes de type brun notamment lors de stimulation de ces cellules par un agoniste des récepteurs β 3-adrenergiques (Jimenez et al., 2003) (Himms-Hagen et al., 2000).

3. Le tissu adipeux beige

Il existe un second type de tissu adipeux qui contient des adipocytes exprimant UCP-1 : Le tissu adipeux beige. Il est considéré comme une forme de tissu adipeux brun inductible car il partage de nombreuses caractéristiques morphologiques et biochimiques avec le tissu adipeux brun. Il est présent au sein du tissu adipeux blanc et plus particulièrement dans les dépôts sous cutanés.

Trois processus principaux sont responsables de l'apparition des adipocytes beiges : La prolifération et la différenciation de précurseurs présents dans le tissu adipeux blanc, la transdifférenciation d'adipocytes blancs en adipocytes beiges en cas de stimulation par le froid ou par les récepteurs β 3-adrenergiques et l'activation d'adipocytes beiges dit « dormants » (Min et al., 2016) (Rosenwald et al., 2013) (Shao et al., 2019).

Le recrutement d'adipocytes beiges pourrait être une piste de traitement contre l'obésité et le diabète de type 2 car ils sont également impliqués dans la régulation de la balance énergétique et du métabolisme lipidique. En effet, le recrutement des adipocytes beiges accélère l'absorption du glucose et des lipides circulants permettant l'augmentation des dépenses énergétiques par la thermogénèse (Yao et al., 2017).

Il existe un lien entre la réponse immunitaire, la thermorégulation et les dépenses énergétiques. L'activation des macrophages de type M2 au sein du tissu adipeux blanc conduit à la sécrétion de catécholamines provoquant l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la thermorégulation et la lipolyse des adipocytes blancs (Nguyen et al., 2011).




	Morphologie	Expression d'UCP1	Densité mitochondriale	Fonctions primaires
Adipocyte Blanc 	Uniloculaire/ Large gouttelette lipidique	Basse ou indéetectable	Basse	Réserve énergétique
Adipocyte brun 	Multiloculaire/ multiples petites gouttelettes lipidiques	Haute	Haute	Thermogénèse, dépense énergétique
Adipocyte beige 	Multiloculaire/ multiples petites gouttelettes lipidiques	Moyenne	Moyenne	Thermogénèse, dépense énergétique

Tableau 3 : Caractéristiques des adipocytes blancs, bruns et beiges

II. Répartition anatomique du tissu adipeux blanc

1. La répartition des dépôts adipeux

1.1. Les tissus adipeux blancs sous cutanés

Chez l'Homme on dissocie le tissu sous cutané constituant la partie supérieure du corps de la partie inférieure. Dans la partie supérieure du corps, on distingue deux couches graisseuses sous cutanées séparée par le fascia : Les couches superficielles métaboliquement peu actives et les couches profondes qui possèdent une activité métabolique plus importante. Dans la partie inférieure du corps la graisse sous cutanée est principalement répartie au niveau des fessiers et du fémur.

Chez la souris, il est divisé en deux régions (**Figure 3**): Les régions antérieures et postérieures. La région antérieure est subdivisée en quatre compartiments : Cervical, axillaire, interscapulaire et subscapulaire. La partie postérieure est subdivisée en 3 régions : Les régions dorsolombaires, inguinales et glutéales. Ces régions sont cependant principalement constituées de tissus adipeux bruns (Zhang et al., 2018).

1.2. Les tissus adipeux blancs viscéraux

Par définition le tissu adipeux blanc viscéral constitue la partie profonde des dépôts graisseux localisés autour des organes. Chez l'Homme les dépôts adipeux blancs viscéraux majeurs sont : L'omental, le rétro péritonéal, le péri-rénal, le mésentérique et le péri-cardiaque (**Figure 3**).

La souris possède une répartition des graisses viscérales similaire à l'exception du tissu omental qui est absent. La souris possède également un tissu adipeux périgonadal très développé alors que celui-ci est absent chez l'humain.

Bien que la compréhension de l'obésité humaine fût possible par de nombreuses études basées sur des modèles de rongeurs nourris avec un régime riche en graisse, des études comparatives montrent que la structure des dépôts adipeux blancs diffèrent fortement entre les Hommes et les rongeurs. Notamment en termes de vascularisation, de proportion des adipocytes et d'hétérogénéité des tissus. Ces paramètres sont à prendre en compte dans le cas d'une extrapolation des observations chez la souris à l'Homme (Blackshear et al., 2018).

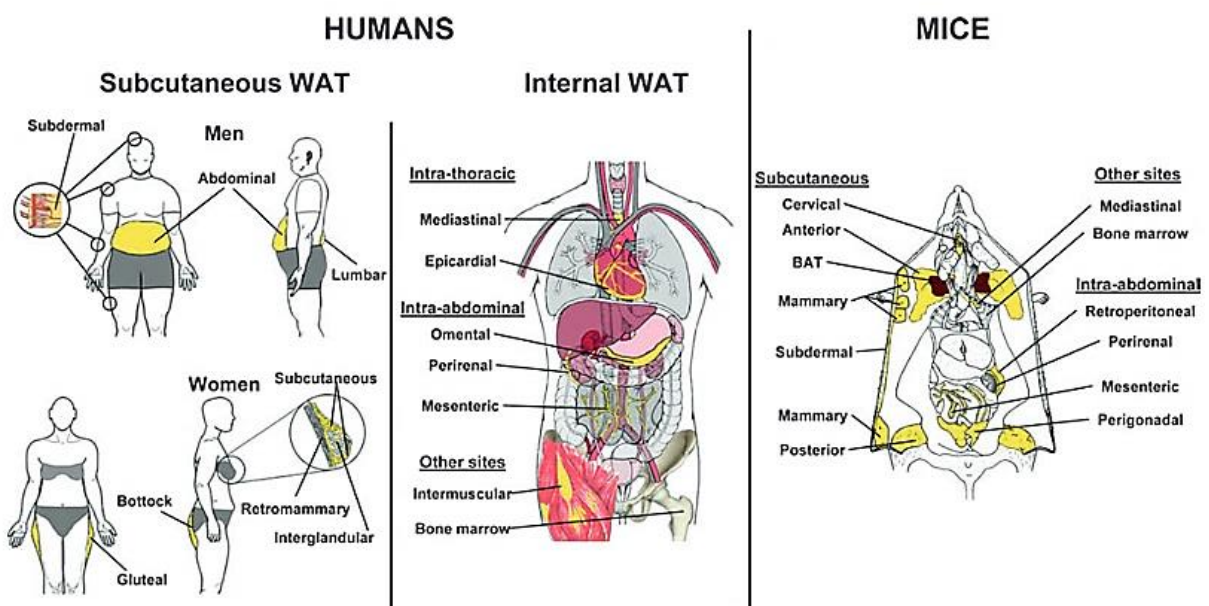


Figure 3 : Répartition des principaux dépôts adipeux blancs chez l'homme et la souris

WAT : White Adipose Tissue ; BAT : Brown Adipose Tissue (D'après Gesta and Kahn, 2017)

2. Localisation et comorbidités associées

Il existe deux formes d'obésité : L'obésité métaboliquement saine (MHO) et l'obésité métaboliquement non saine (MUHO).

Les patients souffrant d'une MHO ont un IMC les caractérisant comme obèses mais présentent des profils métaboliques et hormonaux normaux (Naukkarinen et al., 2014). Ces patients ont une sensibilité à l'insuline plus importante comparée aux patients MUHO. Par conséquent ils présentent un plus faible risque de développer des comorbidités (Karelis et al., 2005). Le dépôt adipeux majoritaire des patients qui souffrent d'une MHO est préférentiellement localisé au niveau sous cutané. L'accumulation de graisse fessière-fémorale est corrélée à une augmentation de la tolérance au glucose (Manolopoulos et al., 2010) et une diminution de la calcification aortique liée aux maladies cardiovasculaires (Ferreira et al., 2004) (Snijder et al., 2004).

A l'inverse, patients souffrant d'une MUHO présentent une augmentation excessive des dépôts adipeux intra-abdominal, épigastrique, hépatique, pancréatique et dans les muscles squelettiques. Cela a pour conséquence, en outre, l'augmentation de la rigidité artérielle périphérique pouvant aboutir au développement de maladies cardiovasculaires (Snijder et al., 2004).

La réduction du tissu adipeux viscéral est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Uusitupa et al., 2003), à une diminution de la pression sanguine (Stevens et al., 2001), de la concentration en acide gras circulants (Dattilo and Kris-Etherton, 1992) et des marqueurs pro-inflammatoires (Ziccardi et al., 2002). A l'inverse la diminution de la masse graisseuse sous cutanée est associée à un risque accru de résistance à l'insuline, de diabète de type II et de dyslipémie (Garg, 2004). Ces observations suggèrent un effet néfaste du tissu adipeux viscéral et un effet protecteur du tissu adipeux sous cutané (Porter et al., 2009).

Selon leur répartition, les dépôts adipeux ont donc une influence plus ou moins importante sur le développement des comorbidités associées à l'obésité. Des déterminants génétiques ont été identifiés chez l'Homme et la souris comme influençant cette répartition. De plus cette répartition semble être un trait héréditaire (Fox et al., 2012).

2.1. L'hypothèse de la veine porte

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les effets délétères des tissus adipeux viscéraux. Parmi elles, l'hypothèse de la veine porte, proposée par Per Björntorp et *al* en 1990.

Le système de la veine porte permet le drainage du sang pauvre en O₂ provenant du tractus intestinal, de la rate, du pancréas et de la vésicule biliaire vers le foie (Carneiro et al., 2019). Cette hypothèse repose sur le fait que le drainage veineux diffère entre le tissu adipeux sous cutané, drainé par la veine cave et les tissus adipeux viscéraux drainés par la veine porte (omental et mésentérique). Elle stipule que le foie est directement exposé aux acides gras libres et aux cytokines relarguées par le tissu adipeux viscéral dans la veine porte des sujets obèses. Cette exposition aurait pour conséquence le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. En effet, plusieurs études réalisées chez l'Homme montrent que la concentration en acide gras au niveau de la veine porte est proportionnelle à la masse adipeuse viscérale (Nielsen et al., 2004). En outre, la transplantation de tissu adipeux chez la souris permettant l'augmentation artificielle de la masse adipeuse viscérale provoque une augmentation de la résistance à l'insuline. De plus, chez les souris transplantées, on observe une sécrétion accrue d'interleukine (IL)-6. En revanche les souris transplantées dont le gène codant pour l'IL-6 a été invalidé ne présentent pas de résistance à l'insuline (Rytka et al., 2011).

2.2. Les différences de sécrétions métaboliques

Bien que les études soutenant l'hypothèse de la veine porte montrent l'importance de la localisation des dépôts adipeux dans le développement des comorbidités associées à l'obésité, il semblerait que les propriétés des dépôts adipeux ne sont pas spécifiquement liées à leurs localisations mais à des caractéristiques intrinsèques au dépôts.

Chez la souris, la transplantation de tissus adipeux sous cutanés dans la cavité viscérale conduit, 12 semaines après l'intervention, à une diminution du poids, de la masse adipeuse et des niveaux d'insuline et de glucose (Tran et al., 2008). De plus les transplantations du tissu adipeux blanc inguinal améliore la tolérance au glucose et diminue les concentrations hépatiques de triacylglycérol (Foster et al., 2011).

In vitro, les pré-adipocytes sous cutanés ont une capacité de prolifération et de différenciation accrue comparée aux cellules omentales. Ces résultats suggèrent que les tissus adipeux sous

cutanés ont un meilleur potentiel d'adaptation en cas de besoin accru de stockage des graisses (Baglioni et al., 2012). De plus, chez l'humain, les pré-adipocytes viscéraux ont une capacité plus importante de sécrétion de : Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) et d'IL-8 comparé aux sous cutanés (Silva et al., 2017).

Ces études mettent en évidence l'importance des propriétés sécrétoires des dépôts de tissus adipeux et de leurs localisations dans le contexte de l'obésité et des conséquences associées.

Chapitre 3 : Les mécanismes inflammatoires associés à l'obésité

I. Facteurs déclencheurs de l'inflammation chronique au cours de l'obésité

1. La création de dépôts ectopiques

Afin d'augmenter sa capacité de stockage en réponse à un apport énergétique excessif, le tissu adipeux met en place deux mécanismes : L'hyperplasie et l'hypertrophie, c'est-à-dire, l'augmentation du nombre d'adipocytes et de leur taille. Cependant cette capacité d'expansion est limitée.

Les tissus adipeux viscéraux ont une croissance préférentiellement hypertrophique en raison de leurs faibles capacités de prolifération et de différenciation. Une hypertrophie excessive provoque une altération de leurs fonctions sécrétoires. A l'inverse, le dépôt sous cutané se développe principalement par hyperplasie puis par hypertrophie lorsque l'adipogénèse est arrivée à saturation ce qui peut expliquer l'effet protecteur des tissus adipeux sous cutanés (Jo et al., 2009) (Tchernof and Després, 2013) (Baglioni et al., 2012). En cas de saturation des dépôts sous cutanés et viscéraux, il y a une augmentation de la concentration d'acides gras circulants pouvant jouer un rôle prépondérant dans la mise en place de l'inflammation chronique de bas grade chez les patients obèses (Zhou et al., 2020). L'apport excessif d'acides gras au niveau des muscles squelettiques et du foie entraînent la production de triglycérides mais également de diacylglycérols et de céramides qui sont associés au développement de la résistance à l'insuline. Ce flux d'acide gras peut également présenter des défauts d'oxydation aboutissant à l'excès de production d'acyl-carnitine qui est également associé au développement de la résistance à l'insuline (Lair et al., 2020).

De plus, on peut observer la création de dépôts adipeux ectopiques pouvant avoir des conséquences néfastes selon leurs localisations (**Figure 3**) :

- L'accumulation de lipides dans le pancréas et dans le foie est associée à la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire et d'un développement du stress oxydatif ayant pour conséquence un dysfonctionnement des cellules β aboutissant au développement du diabète de type 2 (Heni et al., 2010).

- La présence excessive de tissu adipeux localisé au niveau des reins est liée à l'augmentation de la pression sanguine et des risques d'hypertension (Chughtai Haroon L. et al., 2010).
- Les dépôts ectopiques autour du cœur et des artères coronaires aboutissent au développement d'un stress oxydatif, à l'activation de la cascade de coagulation et à l'apparition de calcifications ayant pour conséquence l'induction de cardiomyopathies (McGavock et al., 2006).

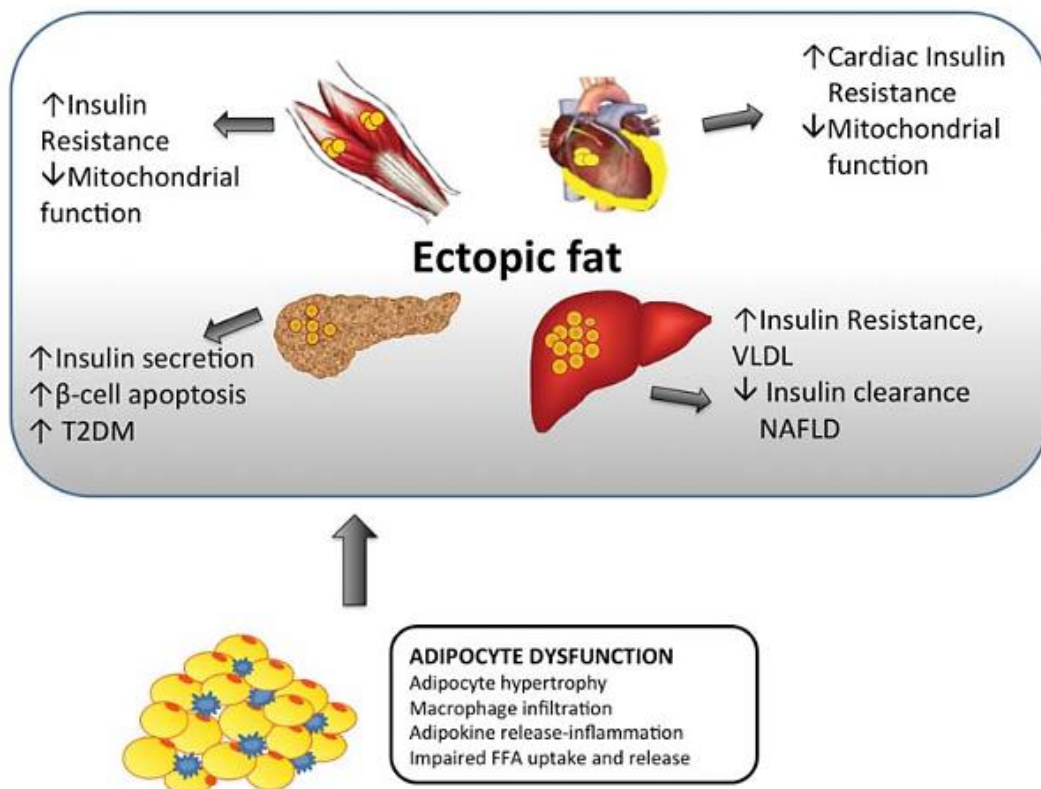


Figure 4 : Conséquences de la création de dépôts graisseux ectopiques

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease T2DM : Type 2 Diabetes Mellitus ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein (D'après Gaggini et al., 2015).

2. Le rôle de l'hypoxie

La première hypothèse proposée pouvant expliquer la mise en place et l'entretien de l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité est la présence d'un état hypoxique du tissu adipeux lors de son expansion. En effet, les mécanismes d'hypertrophie et d'hyperplasie mis en place lors du développement du surpoids et de l'obésité provoquent une distanciation entre les adipocytes et la vascularisation : Le diamètre des adipocytes peut augmenter jusqu'à plus de 200 μm ce qui est, dans la plupart des cas, supérieur aux capacités de la distance de diffusion de l' O_2 qui est de 100 à 200 μm (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2007) (Skurk et al., 2007). Cela a pour conséquence une réduction de la pression partielle en oxygène pouvant aller jusqu'à 70% au sein du tissu adipeux des souris obèses. Ce phénomène survient lorsque l'angiogenèse est dans l'incapacité de s'adapter à l'expansion pathologique du tissu adipeux menant une vascularisation insuffisante (**Figure 4**) (Spencer et al., 2011).

Pour démontrer la présence d'hypoxie dans le tissu adipeux au cours de l'obésité, trois modèles de souris ont été utilisés : Les souris *ob/ob*, *db/db* et des souris sauvages nourries avec un régime riche en graisse. Les analyses réalisées sur ces souris ont mis en évidence la présence d'hypoxie dans le tissu adipeux périgonadal. Des marquages en immunohistochimie ont montré que les macrophages des tissus adipeux blancs sont quasi-exclusivement (>90%) localisés dans les zones hypoxiques au niveau des sites de nécroses d'adipocytes formant des Crown Like Structure (CLS) ce qui suggère que la faible teneur en oxygène au sein du tissu adipeux des obèses est responsable au moins en partie de l'augmentation de l'infiltrat inflammatoire (Cinti et al., 2005). Cependant la présence de macrophage n'est pas une preuve d'inflammation car leur recrutement peut être expliqué par la nécessité de phagocyter les adipocytes apoptotiques et nécrotiques. En effet, ces études ont montré que la fréquence de la mort adipocytaire est 30 fois plus élevée chez les souris obèses que chez les souris saines (Murano et al., 2008).

Les études *in vitro* réalisées sur la lignée murine 3T3-L1 et sur les adipocytes humains se sont principalement concentrées sur le lien entre l'altération de la production d'adipokines et de l'Hypoxia-Inductible Factor-1 (HIF-1 α). HIF-1 α est un facteur de transcription clé dans la réponse cellulaire en cas de faible teneur en oxygène (Hellwig-Bürgel et al., 2005). Il est impliqué dans la régulation de nombreux gènes ayant différentes fonctions incluant l'utilisation du glucose, l'angiogenèse, le remodelage de la matrice extracellulaire, l'apoptose

et l'inflammation (Hellwig-Bürgel et al., 2005). Dans des conditions d'hypoxie (5% d'O₂), les adipocytes sont capables de recruter HIF-1 α . Il y a également une augmentation des métalloprotéases matricielles 2 et 9 et de la leptine (Lolmède et al., 2003). Des études en PCR Array ont mis en évidence l'augmentation de l'expression d'IL-6, de leptine, de la vistafine et des transporteurs GLUT-1, 3 et 5 ainsi que la diminution de l'expression de l'adiponectine (Wang et al., 2008). Ces études suggèrent une action pro-inflammatoire de l'hypoxie sur le tissu adipeux. De plus l'hypoxie entraîne l'induction d'une résistance à l'insuline au bout de 24h chez les adipocytes 3T3-L3 ce qui suggère qu'elle pourrait jouer un rôle important dans le développement de la résistance à l'insuline au cours de l'obésité (Hotamisligil, 2000).

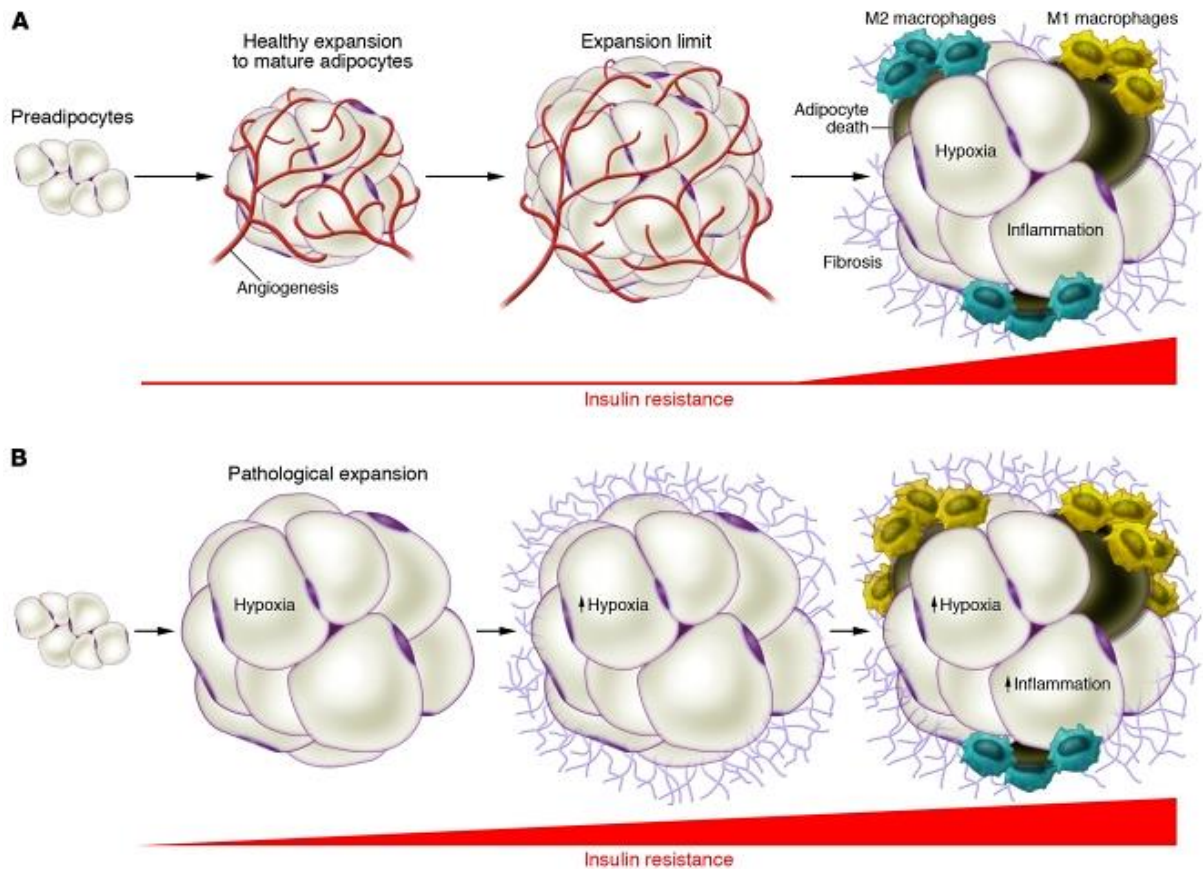


Figure 5 : L'expansion désordonnée du tissu adipeux induit la présence d'hypoxie

(D'après Sun et al., 2011)

A : L'expansion du tissu adipeux blanc est un phénomène physiologique permettant le stockage des réserves énergétiques. Elle s'accompagne d'une réponse angiogénique adéquate et d'un remodelage approprié de la matrice extracellulaire protégeant de l'hypoxie. En cas de dépassement de la capacité d'expansion il y a présence d'hypoxie, de nécrose cellulaire et d'inflammation.

B : L'expansion pathologique du tissu adipeux blanc est l'association d'un élargissement massif des adipocytes, d'une angiogenèse limitée et de la mise en place de l'hypoxie aboutissant au recrutement de macrophages de type M1 et à la présence d'une inflammation chronique.

3. Rôle du microbiote

Le tractus digestif humain contient un ensemble significatif de micro-organismes dont les bactéries sont prédominantes. Cette communauté microbienne est activement impliquée dans diverses fonctions de l'organisme notamment la régulation métabolique, la digestion et développement de l'immunité innée. En effet, le microbiote synthétise une large gamme de métabolites (Oxyde nitrique, catécholamine etc.) modulant de manière directe le métabolisme énergétique et le système endocrinien. Les catécholamines microbiennes ont la capacité de modifier l'absorption des nutriments (Mittal et al., 2017). Or, plusieurs études ont démontré que l'expression des gènes dans le microbiote intestinal varie considérablement entre les individus obèses et sains (Eckburg et al., 2005) (Ley et al., 2006). De plus, les souris dépourvues de microbiote intestinal montrent des difficultés dans le processus de stockage au sein du tissu adipeux blanc. Ces souris présentent une concentration de « Fasting Induced Factor » (Fiaf) circulant plus importante que les souris ayant une flore intestinale (Bäckhed et al., 2004). Le Fiaf est un médiateur permettant la réduction du stockage énergétique et la libération de triglycérides (Mandard et al., 2006). Ces études mettent en évidence le rôle non négligeable du microbiote avec la régulation du stockage énergétique (Heiss and Olofsson, 2018).

L'ingestion d'acides gras saturés et de cholestérol peut modifier le microbiote intestinal aboutissant à une dysbiose réduisant les populations bactériennes qui favorisent le maintien d'un environnement anti-inflammatoire. En effet, la composition microbienne des souris *ob/ob* est différente des souris sauvages. Les souris *ob/ob* ont une plus grande capacité à digérer les fibres et à générer des acides gras à courtes chaînes ce qui peut contribuer à leurs prises de poids excessives (Turnbaugh et al., 2006). L'injection d'une combinaison de norfloxacine et d'ampicilline chez les souris *ob/ob* pendant 2 semaines permet une diminution de la résistance à l'insuline indépendamment de la prise alimentaire. De plus, il a été observé une réduction des concentrations hépatiques en triglycérides et une augmentation de l'adiponectine plasmatique (Membrez et al., 2008).

Ces changements des populations bactériennes peuvent induire et entretenir l'inflammation de bas grade typique de l'obésité via l'activation des Toll like receptors (TLR) et Nod like receptors (NLRs) ainsi qu'augmenter la perméabilité intestinale qui est dépendante de l'intégrité des jonctions serrées. L'augmentation de la perméabilité intestinale a pour

conséquence la fuite d'antigènes microbiens tel que le LPS (**Figure 5**). En effet, il a été montré que le Lipopolysaccharide (LPS) plasmatique augmente lors d'une prise alimentaire. De plus, les souris nourries avec un régime riche en graisse montrent une concentration plasmatique de LPS deux à trois supérieure à la normale. Des souris perfusées avec du LPS à 300µg/Kg/jour pendant 4 semaines ont montré une augmentation de la présence de macrophages, l'augmentation de leur glycémie à jeûne et un gain de poids significatif. Cette étude montre le potentiel rôle du LPS dans la prise de poids au cours de l'obésité (Cani et al., 2007). De plus, chez les souris C3H/HeJ (exprimant un TLR4 non fonctionnel), on observe une augmentation du transport du glucose et une atténuation de la résistance à l'insuline (Poggi et al., 2007).

A l'inverse, l'utilisation du polysaccharide de *Artemisia sphaerocephala* Krasch permet de réduire considérablement la prise de poids et les conséquences métabolique associée en modifiant le microbiote intestinal par la prolifération de bactéries telles que *actobacillus*, *Bifidobacterium* and *Blautia* (Zeng et al., 2022).

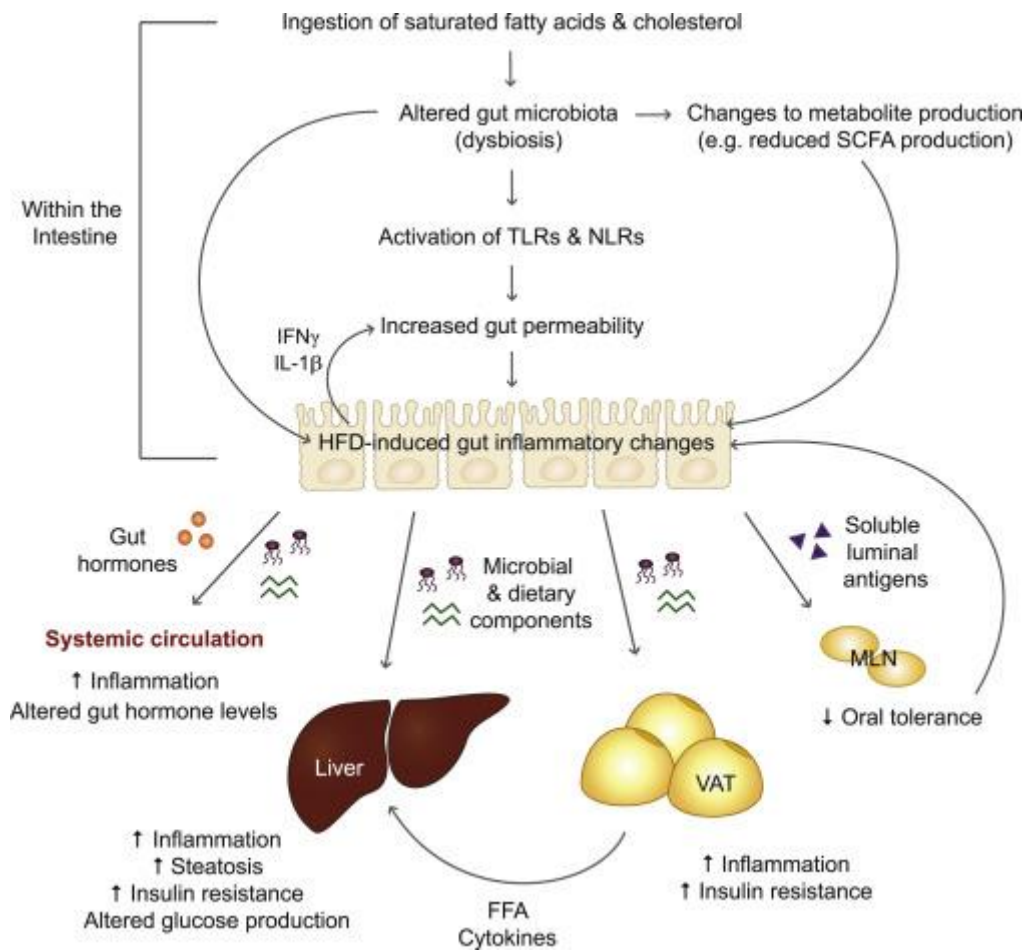


Figure 6 : La dysbiose intestinale durant l'obésité

L'ingestion d'acides gras saturés et de cholestérol provoque une dysbiose intestinale modifiant la production de métabolites et déclenchant une activité pro-inflammatoire dans l'intestin via les TLRs et les NLRs. Cela induit une déstabilisation des jonctions serrées conduisant à la perméabilité intestinale. Il en résulte une fuite d'antigènes microbiens aboutissant à de nombreuses conséquences telles que la genèse et la perpétuation de l'inflammation chronique de bas grade (Winer et al., 2016).

II. Rôle du tissu adipeux blanc dans le développement et le maintien de l'inflammation de bas grade

En 1993, Hotamisligil *et al.*, ont montré une élévation locale et systémique du [Tumor Necrosis Factor \$\alpha\$](#) (TNF α) chez la souris et le rat et que son inhibition permettait de rétablir l'absorption du glucose. Ils ont par la suite mis en évidence, chez l'humain, une corrélation entre les taux d'ARNm de TNF α présents dans les tissus adipeux blanc et l'hyperinsulinémie. Ils ont également montré qu'une perte de poids permettait la réduction de l'expression génique de TNF α . Ces études ont mise en évidence, pour la première fois, le rôle du tissu adipeux blanc dans le développement de l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité et des complications qui en résultent telles que la résistance à l'insuline (Hotamisligil *et al.*, 1995). Par la suite, de nombreuses études ont alors démontrées les capacités sécrétoires des tissus adipeux blancs et ont tenté de comprendre la complexité des mécanismes mis en jeu dans l'inflammation chronique de bas grade.

1. Les adipocytes et les pré-adipocytes

Les pré-adipocytes et les adipocytes sont les principales cellules du tissu adipeux et ont un rôle majeur dans la mise en place et le maintien de l'inflammation chronique de bas grade.

Un traitement au TNF α sur des pré-adipocytes provoque la sécrétion de médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-6 et MCP-1 (Ruan *et al.*, 2002). De plus la mise en place de l'inflammation chronique de bas grade a des conséquences sur l'adipogénèse. En effet, il a été montré que la stimulation d'adipocytes 3T3-L1 par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'interféron γ (IFN- γ), l'IL-1 β , et l'IL-6 diminue leur fonction d'adipogénèse et donc leur capacité à stocker les lipides en excès (Jiang *et al.*, 2019). De surcroît, l'inflammation chronique de bas grade altère la capacité des pré-adipocytes à se différencier mais stimule leur prolifération (Ye and Gimble, 2011). L'ensemble de ces mécanismes associés à une demande de stockage accrue au cours de l'obésité, expliquent l'élévation de la concentration d'acide gras circulant présente chez les personnes souffrant d'obésité.

L'hypertrophie des adipocytes entraîne une hypoxie dans le tissu adipeux blanc provoquant une sénescence ou une nécrose entretenant l'inflammation chronique de bas grade et provoquant le recrutement de l'infiltrat inflammatoire : Les personnes obèses avec une forte

population d'adipocytes hypertrophiés au sein des tissus adipeux viscéraux présentent une concentration accrue de cytokines pro-inflammatoires et un niveau plus faible d'adipokines protectrices tel l'adiponectine (Skurk et al., 2007) (Kawai, Autieri and Scalia, 2021) (**Figure 7**). Les adipocytes hypertrophiques participent à un changement de composition de la matrice extracellulaire des tissus adipeux blancs conduisant à la mise en place de fibrose (Khan et al., 2009). Les adipocytes sont également capables de sécréter des cytokines spécifiques : les adipokines.

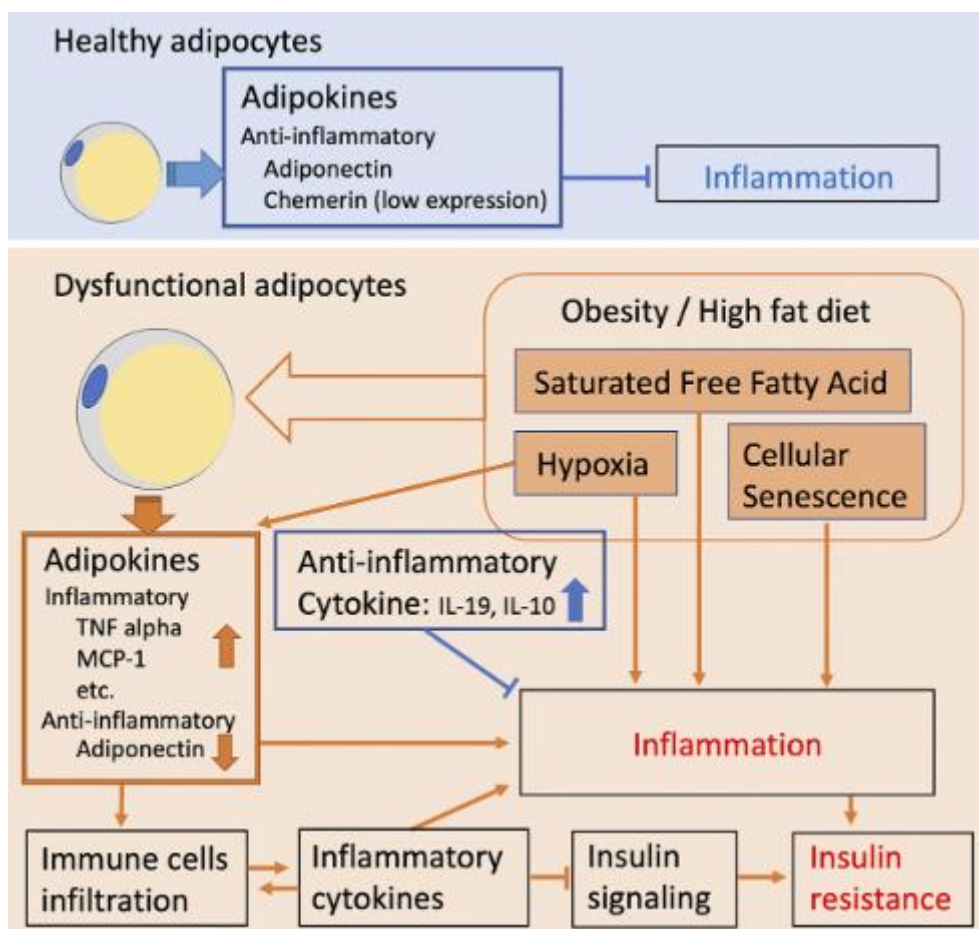


Figure 7 : Rôle des adipocytes dans la mise en place de l'inflammation chronique de bas grade

(D'après Kawai, Autieri and Scalia, 2021)

Parmi ces sécrétions on peut citer la leptine qui, en plus dans son rôle de régulateur de la prise alimentaire, a un rôle dans la régulation de l'immunité. Sa concentration plasmatique est directement corrélée avec la masse adipeuse (Considine et al., 1996). Il a été montré que la leptine protège les souris ob/ob de l'atrophie des organes lymphoïdes, notamment du thymus en cas de famine (Howard et al., 1999). De plus, les macrophages provenant des souris ob/ob sont incapables de lutter contre une infection par *Candida albicans*. En effet, ces macrophages présentent une diminution de la production des eicosanoïdes, de l'oxyde nitrique. L'injection de leptine restaure partiellement les fonctions immunitaires des souris déficientes pour la leptine (Loffreda et al., 1998). Les macrophages ne sont pas les seules cellules de l'immunité affectées par une déficience en leptine (**Tableau 4**) ce qui met en évidence son rôle majeur dans la régulation de l'immunité.

Cellules	Influence de la leptine
Monocytes	Prolifération dose dépendante et activation par induction de TNF α et IL-6 (Santos-Alvarez et al., 1999)
Neutrophiles	Augmentation de la production de ROS (Caldefie-Chezet et al., 2001) Augmentation du chimiotactisme (Caldefie-Chezet et al., 2003)
Cellules NK	Développement, maintien et activation (Tian et al., 2002).
Cellules dendritiques	Maturation et survie (Mattioli et al., 2005)
Lymphocytes T	Prolifération des lymphocytes T CD4+ (Martín-Romero et al., 2000) Favorise la production de Th1 et Th17 (Lord et al., 1998) Inhibe la production de Th2 et Treg (Batra et al., 2010)

Tableau 4 : Influence de la leptine sur les acteurs de l'immunité

Le développement de l'obésité et particulièrement l'hypertrophie, l'hyperplasie et l'hypoxie qui en résultent provoquent un changement phénotypique des tissus adipeux. Cela se caractérise par l'apparition d'adipocytes nécrotiques et dérégulés ainsi que l'infiltration de cellules immunitaire dans la fraction vasculaire stromale. Ces modifications phénotypiques induisent des changements dans les sécrétions de facteurs de l'inflammation (**Tableau 5**) (Cancello and Clément, 2006). Ces changements, bien que modérés, sont chroniques et délétères sur le long terme et aboutissent à l'inflammation chronique de bas grade.

Adipokines	Rôle	Etat au cours de l'obésité
Adiponectine	Anti-inflammatoire	Diminue
IL-1β, IL-6, IL-8	Pro-inflammatoire	Augmente
Leptine	Pro-inflammatoire/satiété	Augmente
MCP-1	cytokines chimio-attractantes	Augmente
MIP1-α	cytokines chimio-attractantes	Augmente
PAI-1 ; fibrinogène ; ARPs ; métallothionéine ; complément C3)	Facteurs de la cascade du complément	Augmente
SAA ; CRP ; Haptoglobine	Protéine de la phase aiguë de l'inflammation	Augmente
TNFα	Pro-inflammatoire	Augmente

Tableau 5 : Sécrétions impliquées dans la mise en place et le maintien de l'inflammation de bas grade par le tissu adipeux blanc au cours de l'obésité

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1 ; ARPs : angiotensin-related proteins ; SAA : Sérum amyloïde A ; CRP : C Reactive Protein (D'après Cancello and Clément, 2006).

2. La fraction vasculaire stromale

2.1. Rôle des monocytes et des macrophages

En conditions physiologiques les macrophages représentent 5 à 10% de la population cellulaire des différents dépôts adipeux blancs (Bai and Sun, 2015).

Chez les humains et les souris non obèses, les macrophages présents au sein des tissus adipeux blancs présentent majoritairement un phénotype de type M2 (Lumeng, Bodzin and Saltiel, 2007). Par leurs sécrétions d'IL-10, ils permettent de maintenir une inflammation contrôlée et de prévenir la résistance à l'insuline (Castoldi et al., 2016). En effet, la diminution des populations de macrophages M2 par l'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiées, montre une augmentation de la résistance à l'insuline et le développement de diabète de type 2 (Nawaz et al., 2017).

Dans des conditions physiologiques, il y a un équilibre de la balance macrophagique M1 (pro-inflammatoire) et M2 (anti-inflammatoire) (Castoldi et al., 2016). En revanche, au cours de l'obésité, il y a une polarisation des macrophages de type M2 en type M1. Ce phénomène joue un rôle majeur dans le développement et dans la mise en place de l'inflammation de bas grade (Fujisaka et al., 2009). Les macrophages de type M1 forment des agrégats autour des adipocytes en nécroses formant les « crown like structures » et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF α (Bai and Sun, 2015) (**Figure 8**).

L'interaction entre les adipocytes et les macrophages permet de maintenir l'inflammation chronique de bas grade. Les adipokines pro-inflammatoires telles que MCP-1 et le TNF α ainsi que les acides gras saturés libérés permettent l'activation des macrophages résidant dans les tissus adipeux via la voie NF-KB. De manière similaire, les macrophages vont également sécréter des chimiokines pro-inflammatoires telles que MCP-1 et provoquer le recrutement de monocytes circulants (Hill et al., 2015) (Jiao et al., 2009) (Subramanian and Ferrante, 2009). Ils vont alors interagir avec les adipocytes, notamment par la sécrétion de TNF α et diminuer la production d'adiponectine (Subramanian and Ferrante, 2009).

En plus de leur rôle dans la régulation de l'inflammation, les macrophages peuvent avoir différentes fonctions au sein du tissu adipeux tel que :

- Un rôle dans l'angiogénèse par le sous ensemble macrophagique LYVE-1+ (Lymph Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor-1) capable de participer à la mise en place d'un réseau vasculaire dense au sein des tissus adipeux et plus particulièrement dans des conditions hypoxiques (Cho Chung-Hyun et al., 2007).
- La phagocytose des acides gras libres durant les périodes de forte lipolyse assurant une régulation du stress métabolique conférant une protection aux adipocytes et aux autres cellules environnantes (Kosteli et al., 2010).

L'expansion des tissus adipeux lors du développement de l'obésité induit une forte biogénèse des lysosomes au sein des macrophages. Cette biogénèse est liée à l'accumulation des lipides. Ce processus n'active pas les macrophages de manière classique mais entraîne l'expression d'un phénotype différent caractérisé par leur capacité à accumuler des lipides et également par la surexpression de transporteurs d'acide gras comme CD36. (Xu et al., 2013)

Bien que les analyses histologiques des tissus périgonadal, périrénal et mésentérique montrent un pourcentage cellulaire exprimant le marqueur macrophagique F4/80 significativement et positivement corrélé à la taille des adipocytes et à la masse adipeuse (Weisberg et al., 2003), l'accumulation macrophagique n'est pas la même selon le type de dépôt. En effet, chez les individus obèses l'infiltrat macrophagique est plus important au niveau du tissu adipeux omental par rapport aux tissus adipeux sous cutanés. De plus, le nombre de macrophages au sein du tissu adipeux omental augmente de manière importante d'un individu sain à obèse contrairement au tissu adipeux sous cutané qui ne présente pas de variations significatives. Ce phénomène est régulé par la présence de MCP-1 et du colony stimulating factor 1 (CSF1), deux cytokines hautement exprimées au sein du tissu adipeux omental comparé aux tissus sous cutanés. (Harman-Boehm et al., 2007)

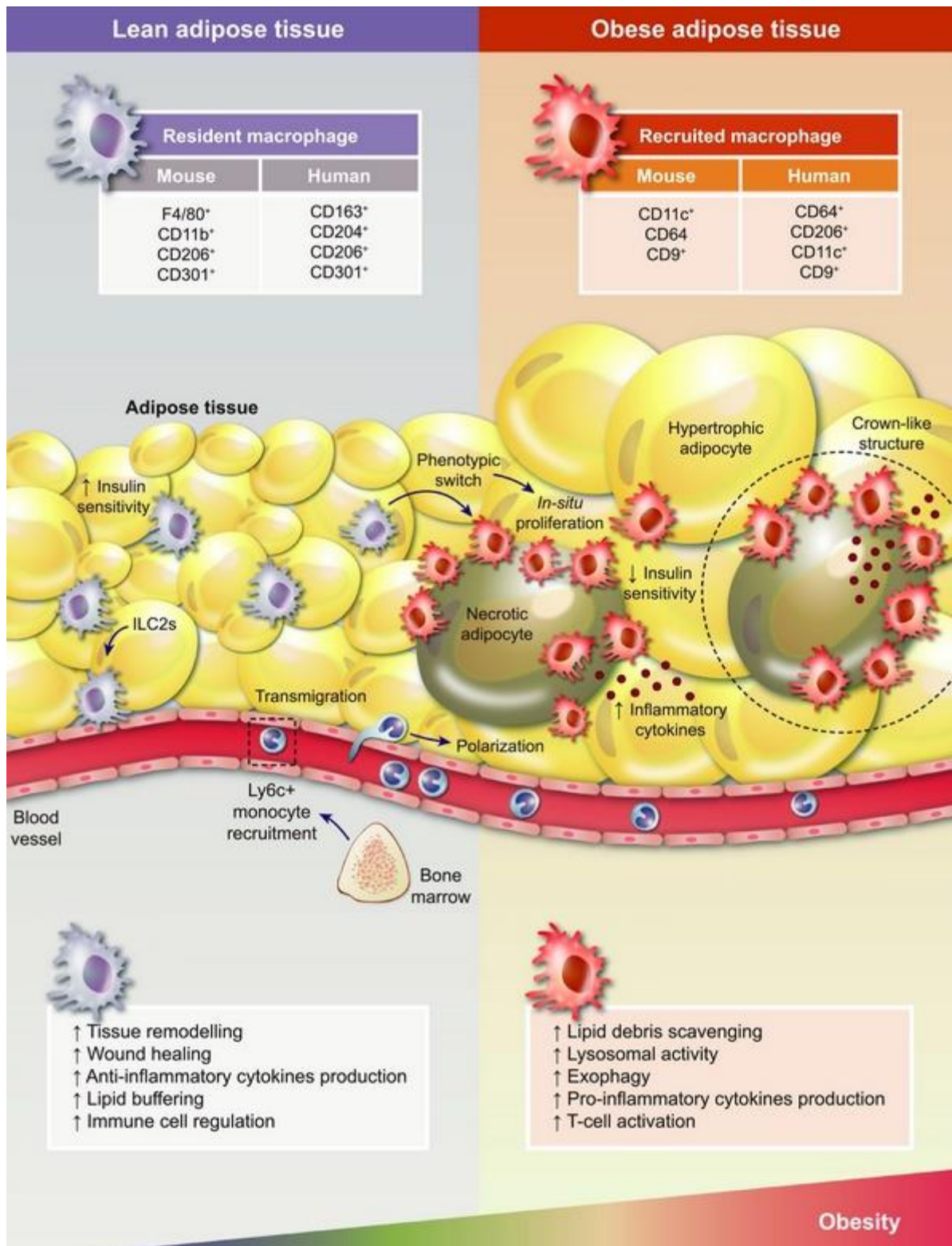


Figure 8 : Modification du tissu adipeux au cours de l'obésité

En condition physiologique, les tissus adipeux possèdent de nombreuses cellules immunitaires. Parmi elles les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2s) comme les Th2, sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13 favorisant une population macrophagique anti-inflammatoire de type M2. L'hypertrophie dérégulée des adipocytes, l'hypoxie et la lipotoxicité provoquent une sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de leptine ce qui aboutit au recrutement des monocytes LyC+

donnant naissance à une nouvelle population de macrophages pro-inflammatoires au sein des tissus adipeux. De plus il y a une polarisation des M1 en M2 qui provoque un déséquilibre de la balance macrophagique en faveur des M1. Cette infiltration contribue à un changement de structure macrophagique : Les cellules se répartissent en forme de couronne autour des adipocytes en nécrose (Crown Like Structure). Ce phénomène induit une dérégulation métabolique et une amplification de l'inflammation au sein des tissus adipeux (Russo and Lumeng, 2018).

2.2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques conventionnelles sont physiologiquement présentes au sein des tissus adipeux. Chez les souris obèses, une déplétion de ces cellules permet la diminution de la résistance à l'insuline et des cytokines pro-inflammatoires (Stefanovic-Racic et al., 2012). De manière similaire aux macrophages, il y a présence d'une accumulation des cellules dendritiques au sein des tissu adipeux au cours de l'obésité. Ces cellules vont sécréter de l'IL-1 β et fortement exprimer TLR4 et la caspase 1 (Cho et al., 2016) (Zlotnikov-Klionsky et al., 2015).

2.3. Les lymphocytes

Au cours de l'obésité, on observe, chez l'Homme, une augmentation significative du nombre de lymphocytes CD4+ et CD8+. De plus, chez la souris, il y a une accumulation de lymphocytes T au sein des tissus adipeux blancs. Une déplétion de ces lymphocytes T permet une amélioration de la résistance à l'insuline (Yang et al., 2010). Chez les patients obèses, les lymphocytes T CD8+ et Th1 (T helper 1) ont un rôle pathologique et vont participer à l'inflammation de bas grade présente au sein des tissus adipeux blancs. En revanche, les lymphocytes Th2 ont un rôle protecteur (Feuerer et al., 2009). Chez la souris, il a été observé que l'infiltration de lymphocytes T CD8+ précède l'accumulation macrophagique et qu'une déplétion en lymphocytes T CD8+ permet de diminuer l'inflammation et de réduire le nombre de macrophages présents au sein du tissu adipeux (Nishimura et al., 2009) (Yang et al., 2010).

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont physiologiquement présents en quantité importante au sein des différents types de tissus adipeux. Ils permettent, tout comme les macrophages de type M2, la régulation de l'inflammation au sein de ces tissus. Cependant leur nombre est fortement diminué au sein des tissus adipeux au cours de l'obésité (Feuerer et al., 2009).

Tout comme les lymphocytes T, les lymphocytes B ont un rôle majeur dans la mise en place et le maintien de l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité. En effet, chez la souris, la

déplétion de lymphocytes B permet d'augmenter la tolérance au glucose et de diminuer l'inflammation. Les lymphocytes B des souris obèses ont un fort profil sécrétoire pro-inflammatoire (INF- γ , IL-6, IL-8) et faiblement anti-inflammatoire (IL-5, IL-10). La sécrétion d'INF- γ va participer à la polarisation des macrophages en type M1. (Winer et al., 2011) (DeFuria et al., 2013).

2.4. Les éosinophiles

Les éosinophiles généralement impliqués dans le développement des allergies et la lutte contre les parasites sont également la première source d'IL-4 permettant l'activation des macrophages de type M2. Leur production et leur recrutement situés au niveau de la moelle osseuse sont contrôlés par l'IL-5. Or, au cours de l'obésité, on observe une diminution des taux circulants d'IL-5 et donc un défaut de recrutement des éosinophiles au niveau du tissu adipeux ce qui a pour conséquence la diminution de la proportion de macrophages de type M2 (Wu et al., 2011).

2.5. Les neutrophiles

Dans les premières étapes de l'obésité il y a une infiltration très précoce des neutrophiles dans le tissu adipeux blanc : Chez la souris, on observe une augmentation des neutrophiles dans les tissus adipeux blancs seulement trois jours après la mise en place du régime riche en graisse (Talukdar et al., 2012). Les études portant sur l'accumulation des neutrophiles dans les tissus adipeux blancs au cours de l'obésité sont contradictoires : Certaines études montrent une accumulation des neutrophiles tout au long du développement de l'obésité (Talukdar et al., 2012) tandis que d'autres soutiennent que l'augmentation des neutrophiles est transitoire (Elgazar-Carmon et al., 2008).

Les neutrophiles semblent participer à la mise en place et au maintien de l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité notamment par la sécrétion de myéloperoxydase et d'élastase. Ceci a été montré à l'aide de souris qui ont reçu des inhibiteurs d'élastase et qui ont eu une diminution de leur inflammation (Talukdar et al., 2012).

La sécrétion d'IL-1 β est fortement augmentée chez les neutrophiles au sein des tissus adipeux blancs chez les souris obèses. Cependant elle ne varie pas dans les autres tissus comme la moelle osseuse. Des expériences de cocultures ont mis en évidence une forte interaction entre

les neutrophiles et les adipocytes par l'augmentation d'expression d'IL-1 β , de TNF α et d'IL-6 (Watanabe et al., 2019).

Chapitre 4 : Comorbidités associées à l'obésité

I. La stéatopathie métabolique

Les acides gras présents dans le foie proviennent de la lipolyse des tissus adipeux périphériques, de la lipogenèse des hépatocytes ou directement de la prise alimentaire pour la synthèse d'adénosine tri phosphate (ATP) et pour la production de corps cétoniques. Il existe cependant une voie alternative qui permet l'estérification des acides gras en triglycérides pouvant être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes.

La surnutrition prolongée provoque à terme une hyper-insulinémie, une hyperglycémie et une hyperlipidémie dans les tissus adipeux. Ces phénomènes conduisent à l'accumulation de lipides dans le foie et notamment dans les hépatocytes. Cette accumulation et la lipotoxicité qui en résulte constituent les premières étapes conduisant au développement de défaillances hépatiques durant l'obésité (Acierno et al., 2020) (Saponaro et al., 2015). Cette étape est appelée stéatose hépatique non alcoolique. Elle se met en place progressivement et est médiée par plusieurs facteurs : La sécrétion par les tissus adipeux de cytokines pro-inflammatoires, les endotoxines dérivées de bactéries intestinales, la génération de ROS, et l'activation des cellules de l'immunité innée qui vont entretenir l'inflammation. L'ensemble de ces facteurs associés à la réponse inflammatoire générée localement par l'accumulation de lipides dans les hépatocytes va provoquer le développement d'une résistance à l'insuline hépatique, d'une inflammation chronique locale et la mise en place de fibrose et peut évoluer en cirrhose et/ou en hépatocarcinome (Acierno et al., 2020) (Godoy-Matos et al., 2020) (Saponaro et al., 2015) **(Figure 9)**.

Histologiquement, il est possible de détecter la stéatose hépatite si certains composants clés sont présents comme des ballonnements hépatocellulaires, la présence d'infiltrat inflammatoire ou encore la présence de fibrose. Bien que cette étape de dysfonctionnement hépatique soit réversible, elle peut évoluer en cirrhose qui est une étape irréversible. Il a également été établi que les patients souffrant de stéatose hépatite non alcoolique ont 3 fois

plus de risques de développer un diabète de type 2 (Moller, 2000).

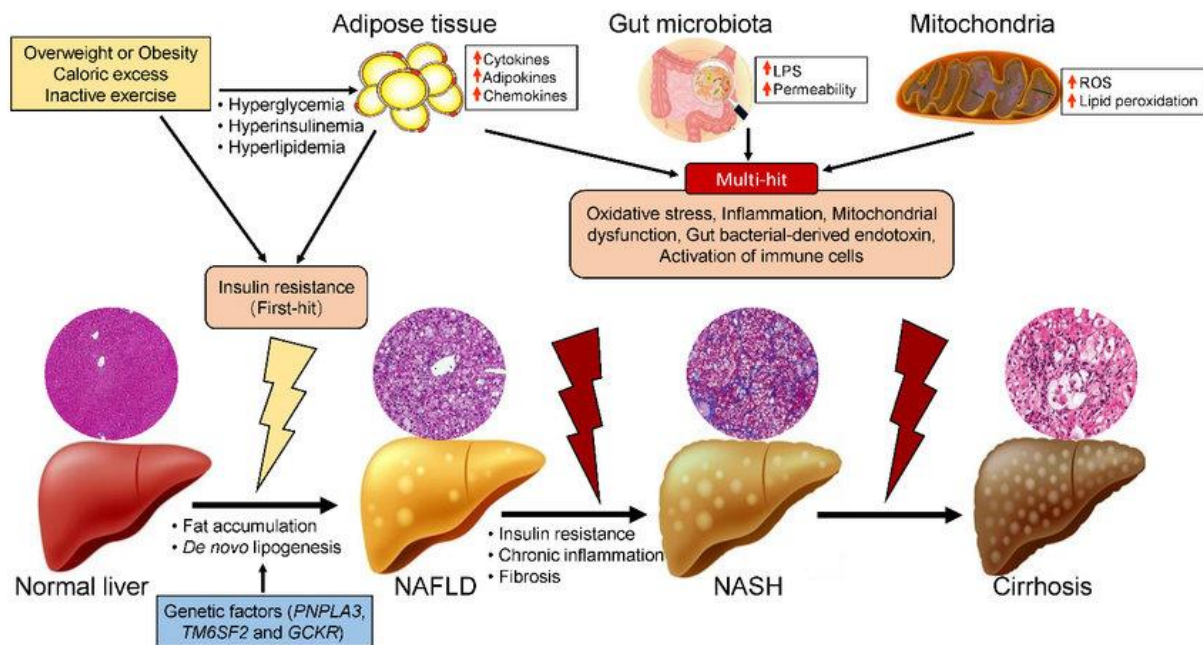


Figure 9 : Mécanismes d'évolutions de la stéatopathie métabolique

(Xu et al., 2019)

II. La résistance à l'insuline et le diabète de type 2

La résistance à l'insuline se définit par la réduction de la réponse à des taux normaux d'insuline circulante. Elle est un marqueur prédictif du développement du diabète de type 2. L'accumulation de lipides ectopiques dans le foie et les muscles sont en grande partie responsables du dysfonctionnement des cellules β du pancréas. De plus il y a une corrélation entre la résistance à l'insuline et l'accumulation de lipides dans les myocytes et dans les hépatocytes (Boden and Shulman, 2002).

Bien que la lipotoxicité joue un rôle majeur dans le développement de la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, plusieurs études ont mis en évidence que l'inflammation chronique de bas grade est impliquée dans le développement de ces comorbidités (Capurso and Capurso, 2012). La phosphorylation des résidus de tyrosines de IRS-1 constitue une étape indispensable pour l'activation des voies de l'insuline. A l'inverse, la phosphorylation de certains résidus de sérines (Serine 307, 612 et 632) au niveau d'IRS-1 entraîne une inhibition des voies de l'insuline (**Figure 10**). Il a été montré que la phosphorylation des résidus de tyrosines est fortement réduite au cours de l'obésité et qu'elle est au cœur du développement de la

résistance à l'insuline (Kanety et al., 1995) (Capurso and Capurso, 2012). Le TNF α et les acides gras libres augmentent les phosphorylations d'IRS-1 au niveau des résidus de sérines et par conséquent inhibent les voies de l'insuline (Hotamisligil et al., 1996). Le TNF α est également capable de promouvoir la lipolyse des adipocytes participant au relargage d'acides gras libres (Sharma and Puri, 2016).

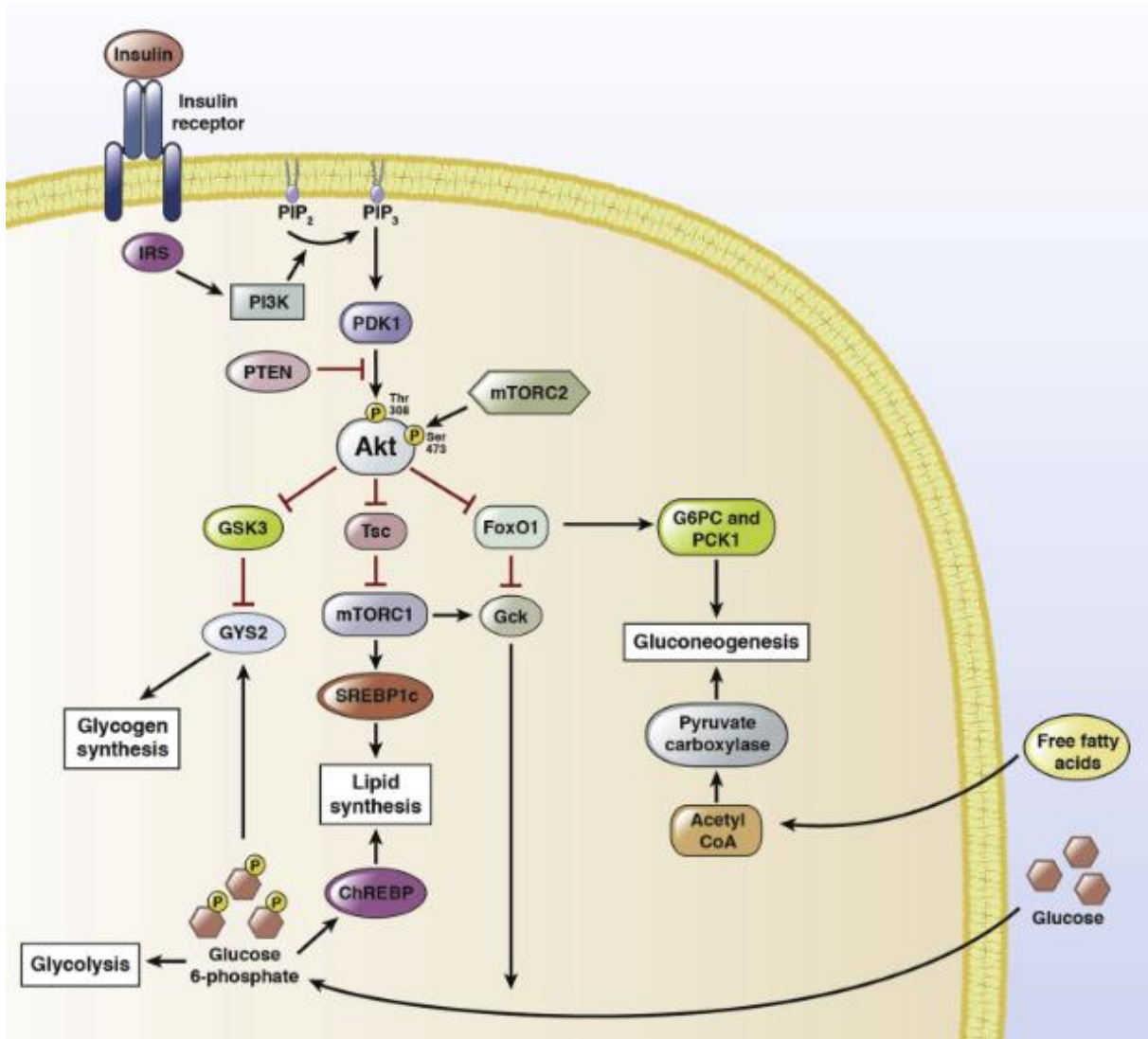


Figure 10 : Voie de signalisation de l'insuline dans les hépatocytes

La fixation de l'insuline sur son récepteur provoque la phosphorylation des résidus de tyrosine de IRS-1 entraînant le recrutement de PI3K qui phosphoryle les résidus de sérine/thréonine de Akt favorisant la synthèse de glycogène via la phosphorylation inhibitrice de GSK3. Akt phosphoryle également FoxO1 (Forkhead box protein O1) inhibant ainsi l'autophagie et permettant la néoglucogénèse. Akt permet également l'activation de mTORC1 qui participe au processus de synthèse lipidique et indirectement à la synthèse de glycogène (D'après Santoleri and Titchenell, 2019).

Dans des conditions physiologiques, l'homéostasie du glucose est régulée par les actions coordonnées des cellules α sécrétant du glucagon et des cellules β du pancréas sécrétant de l'insuline. L'inflammation, le stress oxydatif, l'accumulation d'acides gras saturés et la résistance à l'insuline inhérente à l'obésité induisent la mort des îlots pancréatiques. De plus, la stéatose hépatique associée à l'augmentation de VLDL hépatiques peut accélérer l'accumulation de graisse dans le pancréas. L'accumulation de graisse hépatique favorise davantage la résistance à l'insuline, ce qui entraîne une boucle auto-entretenu dans laquelle l'insuline stimule la synthèse des acides gras libres se déversant dans le pancréas. Pour s'adapter à la mort des cellules β , plusieurs mécanismes compensatoires vont être mis en place : L'hypertrophie, l'hyperplasie, l'activation de voie de survie des cellules β et l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Les mécanismes de compensation permettent de maintenir l'homéostasie du glucose. En revanche, si les mécanismes compensatoires sont dépassés, il y a un dysfonctionnement de la sécrétion d'insuline et apparition d'un diabète de type 2 avancé (Cerf, 2013) (Godoy-Matos et al., 2020) (Figure 11).

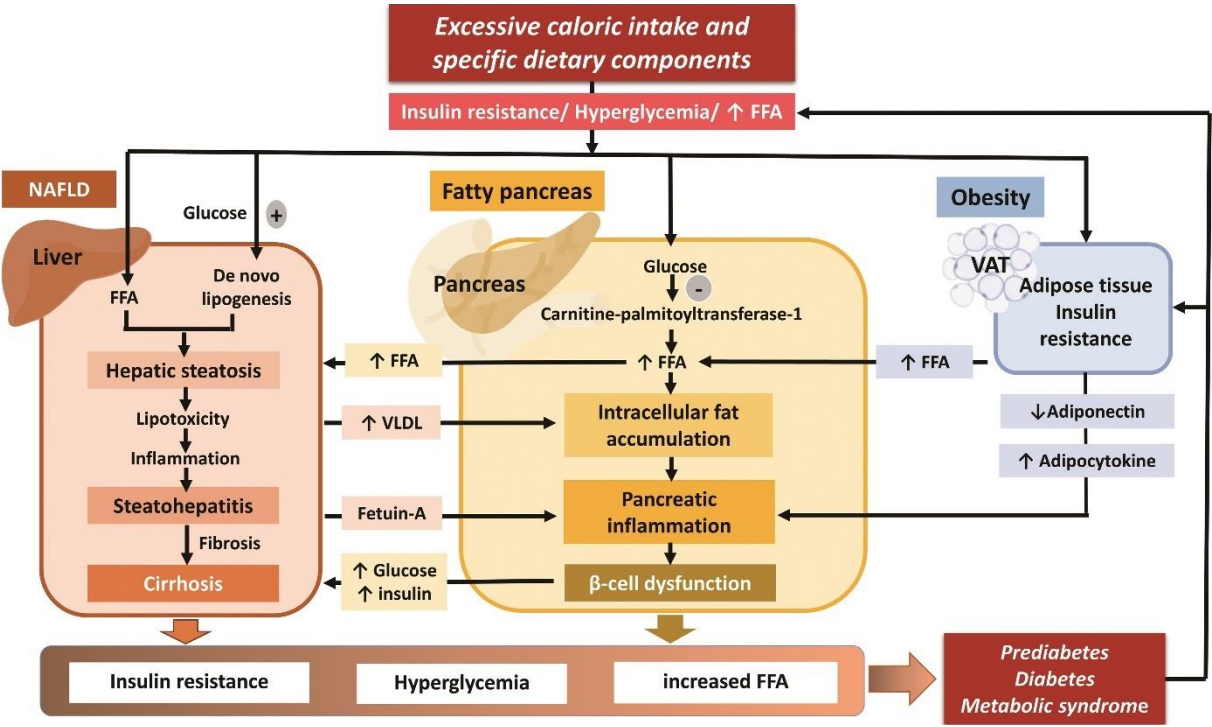


Figure 11 : Mécanisme de mise en place du diabète de type 2

(D'après Rugivarodom et al., 2022)

III. Remodelage et dysfonction cardiaque

L'obésité est responsable de l'apparition de nombreux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires comme par exemple l'hypertension, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 ou l'apnée du sommeil (Wolk et al., 2003).

L'augmentation des apports énergétiques, de la masse adipeuse et des acides gras libres circulants a pour conséquence l'élévation du volume sanguin (Ashraf and Baweja, 2013). Les faibles variations de la fréquence cardiaque ne permettent pas de compenser ce changement. Cela a pour conséquence l'augmentation du débit cardiaque. Ces altérations hémodynamiques appliquent des contraintes chroniques sur les parois du ventricule gauche et provoquent sa dilatation se traduisant par l'élévation de la taille de ces cavités et de l'épaisseur des parois, notamment au niveau du ventricule gauche (**Figure 12**) (Frohlich et al., 1992).

Afin de normaliser la fonction cardiaque, le cœur adopte des mécanismes de compensation impliquant des modifications de structure et de fonction. Parmi les altérations de structure, une hypertrophie du ventricule gauche peut survenir afin de réduire les pressions exercées sur les parois du ventricule gauche. Cependant, cela peut conduire à une défaillance de la diastole. Lorsque l'hypertrophie n'est pas suffisamment importante pour faire face aux contraintes exercées, il y a des défaillances systoliques qui surviennent plus tardivement.

Deux types d'hypertrophies cardiaques peuvent survenir :

- L'hypertrophie cardiaque concentrique, c'est-à-dire l'augmentation de l'épaisseur des parois du ventricule gauche en fonction de l'augmentation de la taille de la chambre. Ces modifications structurelles surviennent principalement chez les patients présentant une masse viscérale importante (Frohlich et al., 1992).
- L'hypertrophie cardiaque excentrique, c'est-à-dire un élargissement de la chambre plus important que l'épaisseur des parois. Cela survient en majorité chez les patients atteints d'obésité périphérique (de Simone et al., 1994).

On peut également observer une légère hypertrophie du ventricule droit chez les personnes obèses en comparaison aux personnes non obèses augmentant le risque de fibrillation atriale (Sokmen et al., 2013). Les modèles animaux *ob/ob* et *db/db* montrent une hypertrophie des

cardiomyocytes. En effet, la résistance à l'insuline augmente l'absorption des acides gras libres des cardiomyocytes provoquant un déséquilibre de la balance absorption/oxydation conduisant à une apoptose des cardiomyocytes (Alex et al., 2018).

Les dysfonctions du ventricule gauche peuvent apparaître chez les patients présentant une obésité seule. Cependant elles sont principalement présentes chez les personnes obèses ayant une hypertrophie du ventricule gauche. Chez les personnes obèses, la fraction d'éjection du ventricule gauche peut être réduite ou inchangée. L'une des difficultés majeures dans les études de l'influence de l'obésité sur la fonction cardiaque est qu'il est difficile de déterminer si les modifications structurelles ou de fonction sont dues à l'obésité ou aux comorbidités associées à l'obésité (hypertension, résistance à l'insuline, diabète de type 2, apnée du sommeil). Il semblerait que chez les personnes obèses sans comorbidités associées, la fraction d'éjection du ventricule gauche reste inchangée. Cependant, il est possible d'observer l'altération de la fonction cardiaque lorsque l'on étudie la fraction de raccourcissement qui évalue l'écart entre deux diamètres diastolique et systolique du ventricule gauche (**Figure 12**) (Alpert et al., 2018).

L'ensemble de ces altérations morphologiques et fonctionnelles peuvent provoquer une dysfonction diastolique et/ou systolique du ventricule gauche pouvant entraîner l'élévation de la pression diastolique ayant pour conséquence l'apparition d'une hypertension pulmonaire facilitée dans certains cas par l'hypoxie générée par un syndrome d'hypoventilation médié par l'obésité ou par des comorbidités associées comme l'apnée du sommeil. Ces phénomènes participent à l'élargissement et à l'hypertrophie du ventricule droit (**Figure 12**) (Alpert et al., 2018) (Sokmen et al., 2013).

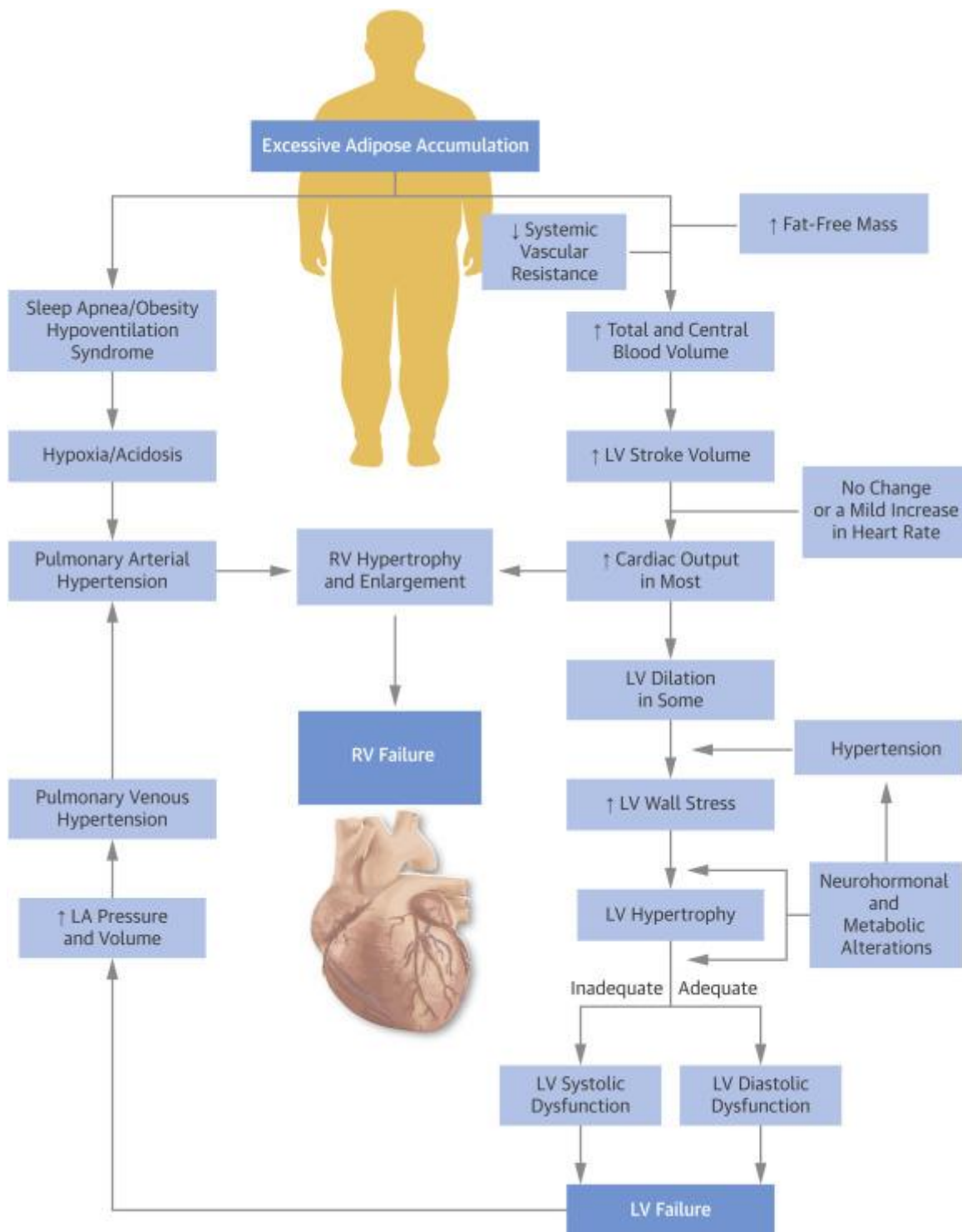


Figure 12 : Mécanismes de remodelage cardiaque au cours de l'obésité
 LA : Left Atrium ; LV : Left Ventricle ; RV : Right Ventricle (D'après Alpert et al., 2018)

Chapitre 5 : Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1

I. La famille des récepteurs TREM

L'immunité innée regroupe un ensemble de mécanismes permettant la défense de l'organisme contre les agents infectieux. Elle met en jeu un certain nombre d'acteurs cellulaires incluant les granulocytes (mastocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles, éosinophiles), les phagocytes (monocyte/macrophages), les cellules dendritiques et les cellules NK. Ces cellules expriment à leur surface un ensemble de récepteurs appelé Pattern Recognition Receptors (PRRs) capables de reconnaître des motifs microbiens conservés appelés (Pathogen Associated Molecular Patterns) PAMPs. Parmi les PRRs on trouve les TLRs capables de reconnaître les PAMPs, mais également les Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs), facteurs endogènes relargués par l'hôte à la suite de dégâts cellulaires non infectieux. L'activation des TLRs par les PAMPs ou les DAMPs a pour conséquence l'initiation de la réponse inflammatoire.

En 1999, un ensemble de récepteurs de la superfamille des immunoglobulines a été mis en évidence à la surface des monocytes, des macrophages et des neutrophiles mais leurs rôles dans l'inflammation était encore inconnu. Ces récepteurs possèdent une homologie de séquences avec des récepteurs activateurs des cellules NK, en particulier au niveau de leur courte queue cytoplasmique dépourvue de motif de signalisation mais possédant un domaine ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) lié à la protéine adaptatrice DAP(DNA-Activating Protein)-12. En 1999, le récepteur NKp44 a été mis en évidence sur les cellules NK. En 2000, Bouchon et *al* ont émis l'hypothèse de l'existence d'un récepteur homologue à NKp44 sur d'autres cellules de l'immunité innée. Il ont alors mis en évidence le Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (TREM-1) qui partage une homologie de séquence avec le récepteur NKp44 des cellules NK chez les monocytes, macrophages et neutrophiles (Bouchon et al., 2000).

TREM-1 est une protéine appartenant à la famille TREM décrite comme capable d'interagir avec les TLRs et de réguler fortement la réponse inflammatoire. Les alignements de séquences réalisés à partir de l'ADNc de TREM-1 ont permis de localiser un cluster de gènes codant pour la famille de ces récepteurs au niveau du bras court du chromosome 6 en position 21 (Bouchon et al., 2000) (Klesney-Tait et al., 2006). Cette famille est également présente chez la souris sur

le chromosome 17C3. Ces gènes codent pour TREM-1, TREM-2 et, chez la souris, TREM-3. Il existe également chez l'Homme et la souris TREM Like Transcript (TLT)-1 et TLT-2 codés respectivement par *TREML1* et *TREML2* chez l'Homme et *Trem1*, *Trem2* chez la souris (Klesney-Tait et al., 2006) (**Figure 13**).

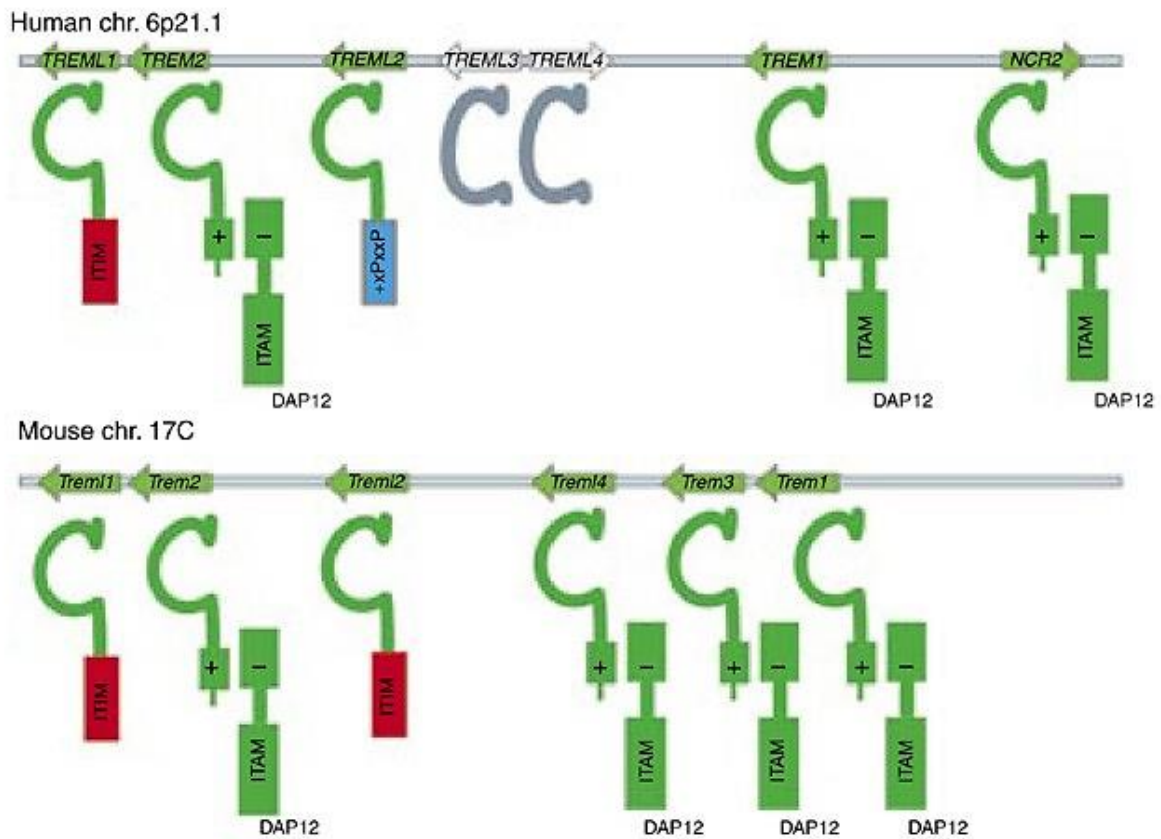


Figure 13 : La famille des récepteurs TREM humains et murins

(D'après Klesney-Tait et al., 2006)

II. La structure de TREM-1

TREM-1 est une glycoprotéine transmembranaire de 30 kDa comprenant un domaine extracellulaire de type immunoglobuline (Ig) constitué de 194 acides aminés, une région transmembranaire de 29 acides aminés et une courte queue cytoplasmique de 5 kDa (Bouchon et al., 2000) (Palazzo et al., 2012). La portion intracellulaire de TREM-1 est dépourvue de motif de signalisation. Cependant il y a présence, au niveau transmembranaire, d'un résidu chargé de lysine qui permet à TREM-1 de s'associer au résidu d'arginine de sa protéine adaptatrice DAP-12 (Bouchon et al., 2000) (**Figure 14**).

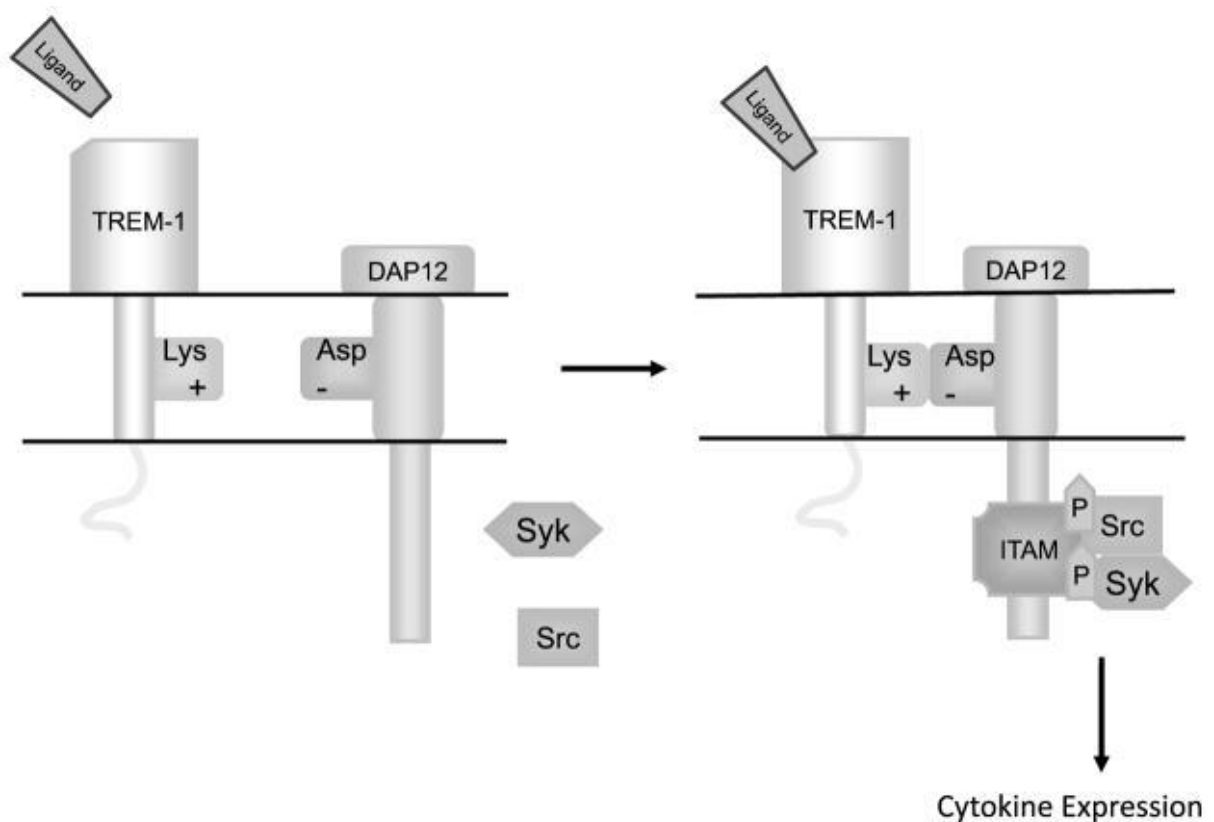


Figure 14 : Mécanisme d'association de TREM-1 et de DAP-12

(D'après Palazzo et al., 2012)

Comme de nombreuses familles de récepteurs, la famille TREM a pour caractéristique la libération de formes solubles. En 2004, Gibot et al ont observé la libération d'une forme soluble de TREM-1 (sTREM-1) par des monocytes humains en cas de stimulation par LPS. Cette forme soluble est également retrouvée dans le sérum de souris en cas d'injection de LPS. La libération de cette forme soluble constitue un mécanisme de rétrocontrôle négatif par

compétition avec le ligand de TREM-1. En effet, il a été mis évidence que le traitement de macrophages par la forme soluble de TREM-1 permettait la réduction de l'expression des gènes codant pour de nombreuses cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16, and IL-18) (Li et al., 2017). Deux hypothèses quant à l'origine de TREM-1 soluble ont été émises : La génération d'une forme tronquée par un épissage alternatif ou un clivage de TREM-1 membranaire par des métalloprotéases. En effet, l'utilisation d'inhibiteur de MMP-9 permet la réduction des concentrations de TREM-1 soluble au cours d'une pneumonie bactérienne chez la souris. TREM-1 soluble est un biomarqueur spécifique de l'activation de la voie de TREM-1 (Jolly et al., 2021). Il a été étudié en tant qu'outil diagnostique ou pronostique dans différentes pathologies notamment le choc septique. En effet, des concentrations plasmatiques élevées de la forme soluble de TREM-1 (sTREM-1) ont été corrélées au diagnostic du choc septique. En 2012, Gibot et al ont proposé un bioscore basé sur l'expression de sTREM-1, de la procalcitonine et de CD64 (Gibot et al., 2012).

III. La fonction de TREM-1

L'activation de TREM-1 induit la dégranulation des neutrophiles et la libération de cytokines et de chimiokines. Lorsque TREM-1 est activé en présence d'un ligand pour les TLRs, une surproduction de cytokines pro-inflammatoire (TNF α et IL-1 β) est observée. TREM-1 n'est pas un initiateur de la réponse inflammatoire : l'activation de TREM-1 par l'intermédiaire d'un anticorps agoniste seul n'induit qu'une faible activation cellulaire. La co-activation de TREM-1 et des TLR entraîne une réponse inflammatoire dont l'amplitude est supérieure à la somme de l'activation induite par les TLRs et TREM-1 isolément (Bouchon, Dietrich and Colonna, 2000) (Bouchon *et al.*, 2001) (Radsak *et al.*, 2004). Chez les monocytes, l'activation des TLRs provoque une surexpression de TREM-1 au niveau protéique et génique. TREM-1 constitue donc une boucle d'amplification de la réponse inflammatoire par synergie avec les TLRs (Bouchon et al., 2001). Par ailleurs, dans les neutrophiles, TREM-1 et TLR4 sont colocalisés lors d'une stimulation par LPS (Arts et al., 2011).

Le ligand de TREM-1 est encore inconnu à ce jour du fait de la faible affinité et la dissociation rapide entre le récepteur et son ligand. Cependant, par l'utilisation de techniques d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse, de potentiels partenaires de TREM-1 associés à un contexte inflammatoire ou infectieux ont été identifiés : Le Peptidoglycan

Recognition Protein 1 (PGLYRP1) (Read et al., 2015), CD177 (Seo et al., 2021), High Mobility Group Box 1 (HMGB1) (Wu et al., 2012) et l'actine extracellulaire (Fu et al., 2017).

Comme décrit précédemment, TREM-1 est dépourvu de motif de signalisation, son partenariat avec DAP-12 permet le déclenchement de nombreuses voies de signalisation. DAP-12 va se coupler avec TREM-1 au niveau de son domaine ITAM et va permettre en plus de la transduction du signal, la stabilisation de l'expression de TREM-1 à la surface des cellules favorisant sa multimérisation. Les phosphorylations du domaine ITAM forment un site d'amarrage pour la Spleen Tyrosine Kinase (SYK) et la Zeta-chain-Associated Protein kinase-70 (ZAP-70). La protéine SYK permet le recrutement et la phosphorylation de complexes tels que Casitas B-lineage Lymphoma (Cbl), Son of Sevenless (SOS) et la Growth Factor Receptor Binding Protein-2 (Grb2) initiant les voies de signalisation intracellulaire associées à TREM-1, notamment les voies impliquant la Janus Kinase(JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription proteins (STATs), la Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), la Extracellular signal-Regulated Kinase ½ (ERK1/2), la Mitogen-Activated Protein kinase (MAPK), la phospholipase C γ (PLC γ) et Akt. L'engagement de ces voies conduit à une mobilisation de calcium intracellulaire, à un réarrangement du cytosquelette, à la production et la libération de ROS et à l'activation de complexes transcriptionnels au sein du noyau. Il s'agit des complexes NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), AP1 (Activator Protein 1) et NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Ces complexes induisent la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation. En effet, l'activation de TREM-1 permet d'aboutir à la production de nombreuses cytokines et chimiokines telles que TNF α , IL-1 β , MCP-1, IL-8, IL-6 et MIP-1 α (Tessarz and Cerwenka, 2008). L'induction des voies PI3K et ERK favorise le maintien de l'intégrité mitochondriale et de la survie cellulaire en inhibant les facteurs pro-apoptotiques : BID (BH3-Interacting Death Domain agonist), BAD (BCL-2 Antagonist of Cell Death) et BAX (BCL-2- Associated X-Protein), et permet également l'inhibition du relargage du cytochrome c provenant des mitochondries (Tessarz et al, 2008) (Yuan et al., 2014). De plus, l'activation de TREM-1 permet d'augmenter l'adhésion des neutrophiles et des monocytes aux molécules de l'endothélium (fibronectine, fibrinogène, VCAM) via la surexpression des hétérodimères CD11b/CD18, CD29/CD49b et CD29/CD49e. Ces mécanismes permettent de préparer la rapide migration des monocytes et neutrophiles vers les sites inflammatoires **(Figure 15)**.

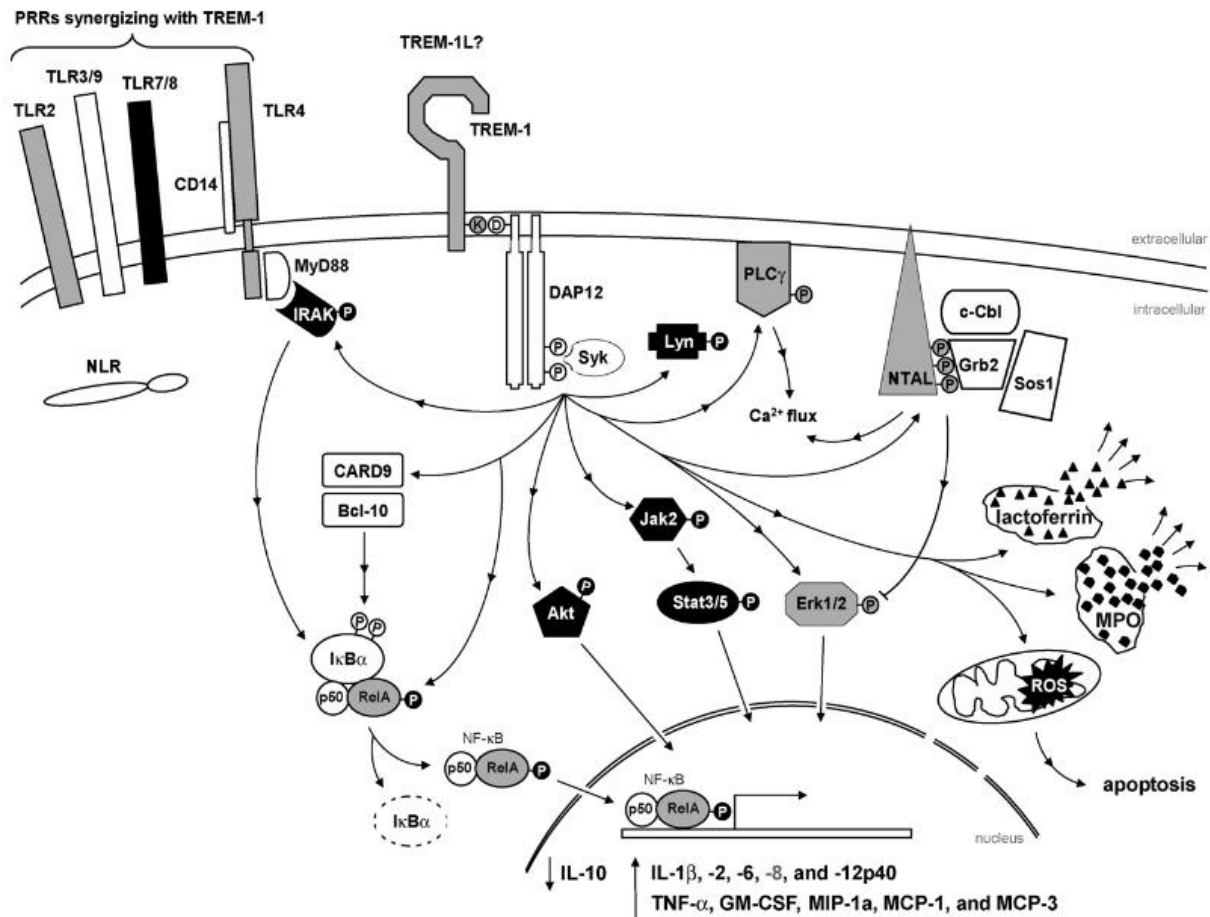


Figure 15 : Voies de signalisation de TREM-1/DAP12

Les protéines impliquées dans les neutrophiles sont indiquées en noir, en blanc pour les monocytes et en gris pour les deux types cellulaires (D'après Tessarz and Cerwenka, 2008).

Initialement, TREM-1 a été identifié comme étant un récepteur présent à la surface de cellules de l'immunité dites « professionnelles ». En effet il est fortement exprimé par les monocytes (Bouchon et al., 2000), les macrophages (Daws et al., 2001), les cellules dendritiques (Bouchon et al., 2001), les neutrophiles (Gibot et al., 2005) et les cellules NK (Matesanz-Isabel et al., 2011). Il a été mis en évidence que TREM-1 est exprimé à la surface de cellules non immunitaire telles que les cellules épithéliales (Rigo et al., 2012) et plus récemment au niveau des cellules endothéliales et des plaquettes (Jolly et al., 2017) (Jolly et al., 2018). Il a également été détecté dans de nombreux tissus tels que la moelle épinière, les poumons, les ganglions lymphatiques, le cœur, le placenta et le tissu adipeux (Roe et al., 2014) (Subramanian et al., 2017). Bien que TREM-1 soit connu comme amplificateur de l'inflammation, on peut lui trouver d'autres fonctions. En effet, l'activation de TREM-1 à la surface des plaquettes permet la mobilisation du calcium, la dégranulation et l'agrégation plaquettaire (Jolly et al., 2017).

IV. La modulation de TREM-1 : Une nouvelle approche thérapeutique

De par sa capacité à amplifier l'inflammation, TREM-1 a été étudié dans de nombreuses pathologies inflammatoires. Son rôle délétère a été dans un premier temps mis en évidence dans des pathologies infectieuses. Il a cependant été montré que TREM-1 est impliqué dans de nombreuses pathologies pro-inflammatoires non infectieuses aiguës (la pancréatite, l'ischémie reperfusion, le choc hémorragique et l'infarctus du myocarde) et chroniques (la polyarthrite rhumatoïde, le cancer, les maladies inflammatoires chroniques intestinales, la fibrose, le psoriasis et l'athérosclérose) (Tammaro et al., 2017).

Du fait de son implication dans de nombreuses pathologies, le ciblage pharmacologique de TREM-1 constitue une nouvelle approche thérapeutique prometteuse. En effet, de nombreuses études ont montré que l'inhibition de TREM-1 a des effets bénéfiques chez la souris dans le cadre de certaines pathologies. On peut prendre comme exemple les modèles de colites murins et les patients souffrants de maladie chroniques de l'intestins où TREM-1 est positivement corrélé avec l'activité de la maladie. L'inhibition de TREM-1 chez la souris permet de réduire les symptômes de colite et notamment les conséquences histopathologiques. En 2017, Kökten et al, ont confirmé que l'inhibition génique et pharmacologique de TREM-1 chez la souris permettait de réduire la sévérité de la colite en restaurant l'activité autophagique et en protégeant contre la dysbiose.

Plusieurs stratégies de modulation de TREM-1 ont été mises en œuvre : Parmi elles, le peptide LR12 développé à partir de recherches sur TLT-1. TLT-1 est un récepteur membre de la famille TREM spécifique aux plaquettes. Lorsqu'elles sont activées, il est transloqué à leur surface. On retrouve également une forme soluble sTLT-1 dans le plasma humain lors du sepsis. sTLT-1 et sTREM-1 partagent une homologie de séquence appelée LP17 potentiellement impliquée dans la liaison du ligand. sTLT-1 est capable de se lier directement à un ligand de TREM-1 via une région appelée LR12 et ainsi inhiber TREM-1 (Gibot et al, 2004). Cependant les récepteurs solubles ont une utilisation limitée en tant qu'agent thérapeutique car ils sont potentiellement immunogènes. Des recherches ont donc été mises en place pour le développement de peptides ayant pour objectif l'inhibition de TREM-1. L'un de ces peptides est le LR12 : Il est composé de 12 acides aminés issus de la portion extracellulaire de TLT-1. La séquence peptidique du LR12 possède des sites de reconnaissance d'un ligand pour TREM et agit comme un récepteur leurre vis à vis du ligand de TREM-1. Ce peptide est capable de réduire les

réponses inflammatoires induites par le LPS en diminuant la libération de cytokines pro-inflammatoires dans le sang (Derive *et al*, 2014). La formulation clinique de ce peptide, MOTREM, est actuellement en cours d'essai clinique dans le cadre du choc septique chez l'Homme (NCT04055909). D'autres outils de modulation de TREM-1 ont été développés comme LP17, un peptide de 17 acides aminés agissant comme un récepteur leurre au ligand de TREM-1 ou encore le peptide SCHOOL qui bloque l'association TREM-1/DAP12 (Sigalov, 2014). Le développement de peptides inhibant l'engagement de TREM-1 permet l'obtention d'outils thérapeutiques importants pour les maladies inflammatoires aiguës. Cependant du fait de leur trop faible demi-vie, le développement d'anticorps antagonistes de TREM-1 est indispensable pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques où TREM-1 est impliqué.

Partie 2 : Etude personnelle

Objectif du travail

L'obésité, composant majeur du syndrome métabolique, est en incidence dramatiquement croissante dans le monde. Elle est responsable d'une explosion du nombre de pathologies cardiovasculaires et de la morbi/mortalité accompagnant ces maladies. D'un point de vue physiopathologique, l'obésité s'accompagne d'un état inflammatoire chronique généré par l'activation des monocytes/macrophages, des lymphocytes et des neutrophiles, et également des adipocytes. L'inflammation associée à l'obésité est marquée par une élévation systémique de cytokines pro-inflammatoires et par l'accumulation, au niveau adipeux, de macrophages. Le changement phénotypique de ces macrophages, qui adoptent un profil pro-inflammatoire M1, est crucial dans le phénomène d'insulino-résistance associé à l'obésité. A l'inverse chez les sujets non-obèses, les adipocytes sécrètent de fortes concentrations d'adiponectines qui favorisent un phénotype M2 et améliore la sensibilité à l'insuline. En revanche, la densité de M2 est plus faible chez les sujets obèses.

Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 est un immuno-récepteur, principalement exprimé à la surface des monocytes/macrophages et neutrophiles dont le rôle est d'amplifier la réponse inflammatoire. Notre laboratoire a pu montrer l'effet bénéfique de la modulation pharmacologique ou de l'inactivation génique de TREM-1 au cours de modèles expérimentaux d'inflammation aiguë (choc septique, colite inflammatoire, infarctus du myocarde) ou chronique (athérosclérose). Subramanian et al ont récemment observé une surexpression de TREM-1 chez des patients obèses et diabétiques.

Nous émettons ici l'hypothèse que TREM-1 joue un rôle majeur dans la genèse et la perpétuation de l'inflammation associée à l'obésité et ses complications. La modulation de TREM-1 devrait pouvoir contraindre cet état inflammatoire chronique et ainsi réduire les complications associées à l'obésité

Matériels et Méthodes

I. Etude *in vitro*

1. Culture cellulaire

Les pré-adipocytes humains issus du tissu adipeux blanc sous cutané et omental utilisés dans cette étude proviennent de donneurs sains masculins ayant un indice de masse corporelle normal ($22,5 \pm 1,5 \text{ kg/m}^2$) (Zen-Bio, USA). Les pré-adipocytes et les adipocytes ont été cultivés selon les instructions du fournisseur dans un incubateur à atmosphère humide à 37°C, 5% de dioxyde de carbone et dans un milieu de croissance complet DMEM/Ham's F-12 de Zen-Bio contenant 3,15 g/L de D-glucose (17,5 mmol/L), de l'HEPES, du sérum bovin fœtal (FBS), de la pénicilline, de la streptomycine et de l'amphotéricine B. Les cellules préalablement cryoconservées ont étéensemencées dans des flasques de 75 cm². Une expansion a systématiquement été réalisée avant la différenciation en rinçant les cellules au PBS chaud puis en les incubant à 37°C en présence d'accutase® (Sigma-Aldrich, France). Le milieu a été remplacé tous les deux jours.

Pour différencier les pré-adipocytes en adipocytes, les cellules sont cultivées dans du milieu de différenciation DMEM-Ham F-12 contenant 3,15 g/L de D-glucose (17,5 mmol/L), de l'HEPES, du FBS, de la biotine, du pantothénate, de l'insuline humaine, de la dexaméthasone, de l'IBMX, un agoniste de PPAR γ , de la pénicilline, de la streptomycine et de l'amphotéricine B (Zen-Bio, USA) pendant 7 jours. Les cellules ont ensuite été cultivées en retirant une partie du milieu de différenciation et en le remplaçant par du milieu adipocytaire DMEM-Ham F-12 contenant 3,15 g/L de D-glucose (17,5 mmol/L), de l'HEPES, du FBS, de la biotine, du pantothénate de calcium, de l'insuline humaine, de la dexaméthasone, de la pénicilline, de la streptomycine et de l'amphotéricine B (Zen-Bio, USA). L'observation de larges gouttelettes lipidiques deux semaines après le début de la différenciation indique la présence d'adipocytes matures.

Chaque expérience *in vitro* a été réalisée entre les 2^{ème} et 4^{ème} passages cellulaires en utilisant des pré-adipocytes d'au moins trois donneurs individuels. Les pré-adipocytes ou adipocytes humains ont été incubés en présence ou non de 100 ng/ml de LPS bactérien provenant de

Escherichia Coli avec ou sans agoniste de TREM-1 à 5 µg/ml (MAB1278, Biotechne, R&D Systems, USA) ou en présence ou non d'immunoglobuline G contrôle à 5 µg/ml (Biotechne, R&D Systems, USA) à 2, 4, 6 et 24 heures. Les surnageants cellulaires et les lysats protéiques ont été collectés pour réaliser respectivement des dosages de cytokines et de protéines. Les échantillons ont été conservés à - 20°C pour doser les cytokines.

2. Western blot : Analyse de l'expression protéique de TREM-1

Les protéines totales des pré-adipocytes et adipocytes provenant des tissus sous cutané et viscéral ont été extraites sur glace à l'aide du tampon RIPA (1% NP-40, 1% désoxycholate de sodium, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M phosphate de sodium pH 7,2, 2mM EDTA, 50mM fluorure de sodium, 0,2mM orthovanate de sodium, 100 U/ml inhibiteur de protéase) (Abcam, Royaume-Uni) puis centrifugées à 16 000 g pendant 5 minutes à 4 °C. Les concentrations protéiques ont été déterminées à l'aide du kit de dosage protéique BCA Pierce (Thermo Fisher Scientific, USA). L'électrophorèse a été réalisée en déposant 10 µg de protéines de chaque échantillon par puits dans un gel d'acrylamide Criterion XT Bis-Tris 4-12% (Bio-Rad, USA) puis en initiant la migration à 170V, 3A et 300W pendant 30 minutes. A la fin de la migration, le gel a été brièvement rincé à l'eau ultrapure. Les protéines ont été transférées sur une membrane de 0,2 µm de nitrocellulose (Transblot Turbo Transfer Pack, Bio-Rad, USA) à l'aide d'un système de Transblot Turbo réglé à 25 V, 2,5 A, durant 7 minutes (Bio-Rad, USA). Une fois le transfert terminé, le gel et la membrane ont été respectivement colorés au bleu de Coomassie et au rouge Ponceau pour contrôler la qualité du transfert. La membrane a été ensuite lavée 3 fois pendant 10 minutes à l'aide du tampon TBST contenant du tampon TBS 0,1% (BioRad, USA) et 0,1% de Tween (Sigma, France). À la suite de cela, la membrane a été saturée avec une solution contenant du TBST et 5% de lait. Elle a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire TREM-1 toute la nuit 4°C. Après trois lavages de 10 minutes au TBST, la membrane a été incubée pendant 1h30 avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la HRP. L'acquisition et l'analyse quantitative des signaux ont été effectuées à l'aide du LAS-4000 imager (Life Science Fujifilm, Japon) et du logiciel Multi Gauge. La membrane a ensuite été incubée deux fois durant 10 minutes dans un tampon de stripping (1% de tween dans de l'eau distillée, 1,5% de glycine, 0,1% de SDS, pH 2,2), lavée deux fois pendant 5 minutes dans du PBS puis deux fois dans du TBST pendant 10 minutes. Afin de mettre en évidence la protéine de

référence GAPDH les étapes de saturations et d'incubations ont été réalisées comme décrit précédemment.

3. Microscopie confocale

Les pré-adipocytes ont étéensemencés dans des chambres LabTek (Thermo Fisher Scientific, USA) et différenciés directement ou non en adipocytes. Les cellules ont été lavées et fixées au paraformaldéhyde 4% durant 20 minutes et perméabilisées avec du Triton 0,1% pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires à 4°C durant une nuit (1/200 hTREM-1 et 1/200 anti-hDAP12, Bioss, USA). Les noyaux ont été marqués avec le TO-PRO-3 (1 µg/ml, Invitrogen, USA) pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont été lavées 3 fois au PBS. Les échantillons ont ensuite été incubés en présence d'une solution de Vectashield permettant la bonne conservation des fluorophores (Vector Laboratories, USA). Les images sont obtenues à l'aide d'un système de microscopie confocale Leica SP5 (Leica, Allemagne) et acquis en mode d'acquisition séquentiel.

4. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Les taux de MCP-1, d'IL-6 et d'IL-8 ont été évalués par immunodosage à l'aide de multiplex dans les surnageants de culture des pré-adipocytes et adipocytes omentales et sous cutanés. Les dosages cytokiniques ont été réalisés grâce au système de micro-fluidique ELLA (Ella Automated Immunoassay Systems ; R&D systems, France) selon les recommandations du fournisseur.

Les niveaux protéiques de la leptine ont été évalués dans les surnageants de cultures de ces mêmes cellules par ELISA (Human leptin, Duoset ELISA Kits R&D systems, France). L'ensemble des kits ont été utilisé selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les anticorps de capture ont été préalablement coatés dans une plaque 96 puits et incubés pendant 24 heures à 4°C. La plaque a été ensuite lavée 4 fois (Immunowash, BIORAD). Un blocage à la BSA de 1 heure a été réalisé avant de réitérer l'étape de lavage. A posteriori les échantillons ont été déposés et incubés durant 2 heures à température ambiante. Après une nouvelle étape de lavage, l'anticorps de détection couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase) a été ajouté dans chacun des puits et la plaque a été incubée 2 heures à température ambiante. Après une nouvelle étape de lavage, les solutions chromogènes A (H₂O₂) et B (Tetramethylbenzidine) ont été ajoutées pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution

STOP (acide sulfurique) a été ajoutée pour stopper la réaction. La densité optique a été mesurée à l'aide du lecteur Multiskan Ex (Labsystems, Thermo Fisher Scientific, USA) à 450 nm avec une correction de 540 nm.

II. Etude *In vivo*

1. Animaux

Toutes les expérimentations impliquant des animaux ont été réalisées selon les législations institutionnelles françaises et européennes concernant les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire et ont été approuvées par le comité d'éthique Lorrain en matière d'expérimentation animale (Saisine n°23273). Les souris ont été hébergées dans des portoirs ventilés placés dans un environnement de type EOPS, maintenues à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, une hygrométrie de $55 \pm 10\%$ et exposées à des cycles de 12 heures de lumière pour 12 heures d'obscurité. Les animaux ont eu un accès libre à l'eau et à la nourriture. Pour cette étude, deux types de souris ont été utilisées (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France):

- Souris KO TREM-1 : Souris C57/BL6 KO constitutives délétées pour *Trem-1*. Ces souris ont été obtenues par délétion de l'exon 1 qui comprend le codon start ce qui permet d'entraîner l'absence de l'ensemble des isoformes de TREM-1.
- Wild Type : Souris C57/BL6 possédant le même fond génétique que les souris délétées pour le gène codant pour TREM-1.

4 groupes ont été constitués :

- Groupe 1 : 10 souris Wild Type (WT) nourries avec un régime standard (HFD)
- Groupe 2 : 10 souris KO TREM-1 (KO) nourries avec un régime standard (LFD)
- Groupe 3 : 10 souris Wild Type (WT) nourries avec un régime riche en graisse (HFD)
- Groupe 4 : 10 souris KO TREM-1 (KO) nourries avec un régime riche en graisse (LFD)

La répartition des souris dans les groupes et dans les cages a été effectuée de sorte que la moyenne des poids de chaque groupe soit similaire. L'âge des souris au début de l'expérimentation était de 6 semaines. Les souris ont été nourries avec un régime standard ou riche en graisse constitué de 60,6% de lipides, 17% de protéines et 22,5 % de glucides. Le régime a été mis en place après 2 semaines d'acclimatation pour une durée de 12 semaines.

Dix grammes de nourriture par jour et par souris ont été répartis dans les mangeoires ainsi qu'au fond des cages afin de faciliter l'accès à la nourriture. La nourriture a été pesée et remplacée 3 fois par semaines afin d'obtenir un suivi de la consommation calorique. Les souris ont été pesées chaque semaine afin de déterminer leur prise de poids (**Figure 16**).

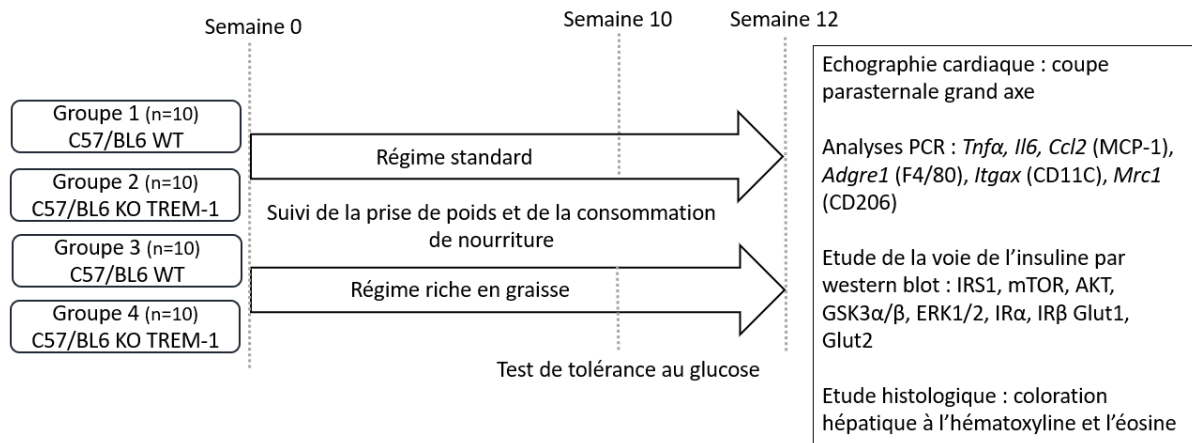


Figure 16 : Plan expérimental de l'étude *in vivo*

2. Echographie cardiaque

Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane 5% avec un flux d'oxygène à 1,5 L/min par l'intermédiaire d'une chambre à induction. Durant toute la procédure, les souris ont été maintenues sous anesthésie par un masque à gaz avec un flux d'isoflurane de 2% et d'oxygène de 0,5 L/min pendant toute la durée de l'opération. La température corporelle a été monitorée et maintenue entre 30°C et 34°C à l'aide d'une plaque chauffante. L'anesthésie était confirmée par l'absence de réponse à une pression ferme sur l'une des pattes postérieures. L'échographie transthoracique a été réalisée à l'aide d'un système VisualSonics 3100. La fraction de raccourcissement, la masse du ventricule gauche, la fréquence cardiaque, l'épaisseur des parois antérieure et postérieure du ventricule gauche ainsi que les fonctions diastolique et systolique du ventricule gauche ont été obtenues par une coupe para sternale grand axe. A la fin de la procédure, l'ensemble des souris se sont rétablies sans difficulté.

3. Test de tolérance au glucose

La procédure utilisée pour les tests de tolérance au glucose est basée sur les travaux de S. Andrikopoulos et al, en 2008, prenant en compte l'influence de la voie d'administration du glucose, le dosage, le temps de jeûne et l'influence de l'anesthésie. Nous avons privilégié la procédure permettant d'obtenir les résultats les plus reproductibles : 10 semaines après le début du régime, les souris ont été mises à jeûne 6 heures avant le test. Les souris ont reçu par voie orale, 2g/kg de poids corporel d'une solution de glucose à 100 mg/ml diluée dans de l'eau stérile. Ce test a été mis en pratique sans anesthésie car celle-ci provoque une hyperglycémie pouvant fausser les résultats. Des prélèvements de sang ont été effectués par incision de 2 mm au niveau de la queue à 0, 15, 30, 60 et 120 minutes et les mesures de glucoses ont été faites à l'aide d'un glucomètre (Accutrend® Plus system, Roche). Le sang restant a été utilisé pour isoler du plasma afin de mesurer l'insuline. Tous les échantillons de plasma ont été conservés à -80°C après le prélèvement et l'insuline a été dosées ultérieurement à l'aide d'un kit ELISA (Merck millipore, Allemagne) selon les recommandations du fabricant.

4. RT-qPCR

Les ARN totaux sont extraits du foie, et des tissus adipeux sous-cutanés, périgonadiques et mésentériques. Pour cela, ils sont découpés en morceaux, maintenus congelés et broyés dans

un homogénéiseur (FastPrep-24, MP bio) à l'aide de billes en céramiques de 1,4 mm de diamètre en présence de 1 ml de Trizol (Thermo Fisher Scientific, USA). Après avoir laissé reposer sur glace pendant 5 minutes, 200 µL de phénol/chloroforme (Thermo Fisher Scientific) ont été ajoutés. Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 minutes à 12 000 g à 4°C afin d'obtenir une phase aqueuse.

Afin de purifier les ARN totaux, le kit RNeasy plus Mini Kit (Qiagen, Pays-Bas) est utilisé selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les surnageants ont été transférés sur des colonnes d'élimination de l'ADN génomique et centrifugés 30 secondes à 8000 g. Après ajout d'éthanol 70% au surnageant, la solution a été placée dans la colonne RNeasy qui, après plusieurs lavages permet de récupérer les ARN totaux. L'évaluation quantitative et qualitative des ARN a été réalisée en utilisant un Micro-Drop (Thermo Fisher Scientific). Chaque échantillon a été dilué de sorte que l'on obtienne la même quantité d'ARN par tubes (1 µg). La rétrotranscription a été effectuée à l'aide du kit iScript cDNA synthesis kit (Biorad, USA) selon les recommandations du fournisseur. La concentration des échantillons a systématiquement été évaluée après la rétrotranscription pour s'assurer du bon déroulement de la réaction.

L'expression des transcrits de *Itgax*, *Mrc1*, *Adgre1*, *Adipoq*, *Retn*, *Tnf-α*, *Il-6*, *Il-10* et *Ccl2* codant respectivement pour CD11c, CD206, F4/80, l'adiponectine, le TNF-α, l'IL-6, l'IL-10 et MCP-1 a été quantifié par PCR quantitative (**Tableau 6**). Les résultats obtenus ont été normalisés à l'aide des gènes de références *β-actine*, *Gapdh* et *Rna18s*. Les PCR quantitatives en temps réel ont été effectuées grâce au Quant Studio 3 Real Time PCR System (Thermo Fisher, USA). Le mélange réactionnel est composé d'ADNc dilué à 10%, d'un mélange d'amorces à 10 µM sens et antisens (Quantitect Primer, Qiagen) et de SYBR Green master mix contenant de l'Itaq DNA polymérase, des dNTPs, du MgCl₂, et du SYBR Green fluorescéine (BioRad, USA). Le protocole de réaction de qPCR est adapté aux amorces utilisées et se déroule selon les paramètres suivants : 40 cycles comprenant une première phase de pré-dénaturation (3 minutes à 95°C), une seconde phase de dénaturation (10 secondes à 95°C), une troisième phase d'hybridation (10 secondes à 95°C) et une quatrième phase d'élongation (30 secondes à 72°C). Une courbe de fusion a ensuite été générée en 3 étapes : 15 secondes à 95°C, 1 minutes à 59°C et 15 secondes à 95°C. Une inspection visuelle des courbes de fusions de chaque amorce a permis de déterminer la spécificité des amorces. Les résultats ont été analysés sur le logiciel

QuantStudio. Afin de comparer les niveaux d'expressions des gènes d'intérêt, une quantification relative ($\Delta\Delta C_t$) a été effectuée.

Gène	Protéine	Rôle
<i>Itgax</i>	CD11c	Marqueur des macrophages M1
<i>Mrc1</i>	CD206	Marqueur des macrophages M2
<i>Adgre1</i>	F4/80	Marqueur des macrophages murins
<i>Adipoq</i>	Adiponectine	Adipokine anti-inflammatoire
<i>Tnf-α</i>	TNF- α	Cytokine pro-inflammatoire
<i>Il-6</i>	IL-6	Cytokine pro-inflammatoire
<i>Il-10</i>	IL-10	Cytokine anti-inflammatoire
<i>Ccl2</i>	MCP-1	Chimiokine

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées au cours de l'étude in vivo

5. Western blot

Les protéines totales du foie ont été extraites à l'aide du Phosphosafe (Merckmillipore, 71296) ou du tampon RIPA (1% NP-40, 1% désoxycholate de sodium, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M phosphate de sodium pH 7,2, 2mM EDTA, 50mM fluorure de sodium, 0,2mM orthovanate de sodium, 100U/ml inhibiteur de protéase) (Abcam, ab156034). Les organes ont été découpés en morceaux, maintenus congelés dans de l'azote liquide, et placés dans des tubes contenant des billes en céramiques de 1,4 mm de diamètre. Ces tubes ont ensuite été placés dans un homogénéiseur (FastPrep-24, MP bio) permettant le broyage de l'organe et la récupération des protéines. Les échantillons ainsi obtenus ont été centrifugés durant 30 minutes à 16000 g à 4°C pour collecter les surnageants. Les westerns blot ont été réalisés comme décrit dans précédemment. Les protéines (P-)IRS-1 (Serine 612), (P-)GSK3 α/β , (P-)Akt, (P-)P44/P42 et (P-)mTOR ont été étudiées à partir des échantillons extraits en phosphosafe (Cell signalling). Glut1, Glut2, IR α , IR β ont été étudié à partir des lysats protéiques extraits à l'aide du RIPA (Abclonal Technology).

6. Etude histologique

Les tissus hépatiques ont été prélevés lors de la mise à mort puis fixés dans du paraformaldéhyde à 4 % pendant 24 heures. Les tissus ont ensuite été rincés et conservés dans de l'éthanol 70% à 4°C. Les tissus ont été inclus dans de la paraffine et sectionnés à 4 μ m. Le déparaffinage a été effectué à l'aide de bains de xylène. La réhydratation a été faite progressivement en utilisant des bains d'éthanol à différentes concentrations successives (éthanol absolu, 95%, 80%) puis a été achevée par un rinçage à l'eau distillée. L'hématoxyline et l'éosine ont été utilisés pour les colorations.

III. Statistiques

Sauf indication contraire, les données générées ont une distribution normale et sont présentées en moyenne +/- SEM. La normalité de distribution des données a été déterminée par le test Shapiro-Wilk. Les différences significatives ont été obtenues à l'aide du test t de Student en cas de comparaison de deux groupes et à l'aide du test ANOVA en cas de comparaison de plus de deux groupes. En l'absence d'une distribution normale, les tests de Mann-Whitney et de Kruskal Wallis ont été effectués respectivement lors de la comparaison

de deux groupes et de plus de deux groupes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Prism Version 8.0.1 (GraphPad). Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme significative.

Résultats

I. Le rôle de TREM-1 au sein des (pré-)adipocytes

1. TREM-1 est exprimé par les (pré-)adipocytes sous cutanés et omentaux

Les pré-adipocytes et adipocytes utilisés dans cette étude sont des cellules primaires isolées provenant de tissus adipeux sous cutanés et omentaux de différents donneurs ayant un indice de masse corporel dit « normal » ($22,5 \pm 1,5 \text{ kg/m}^2$).

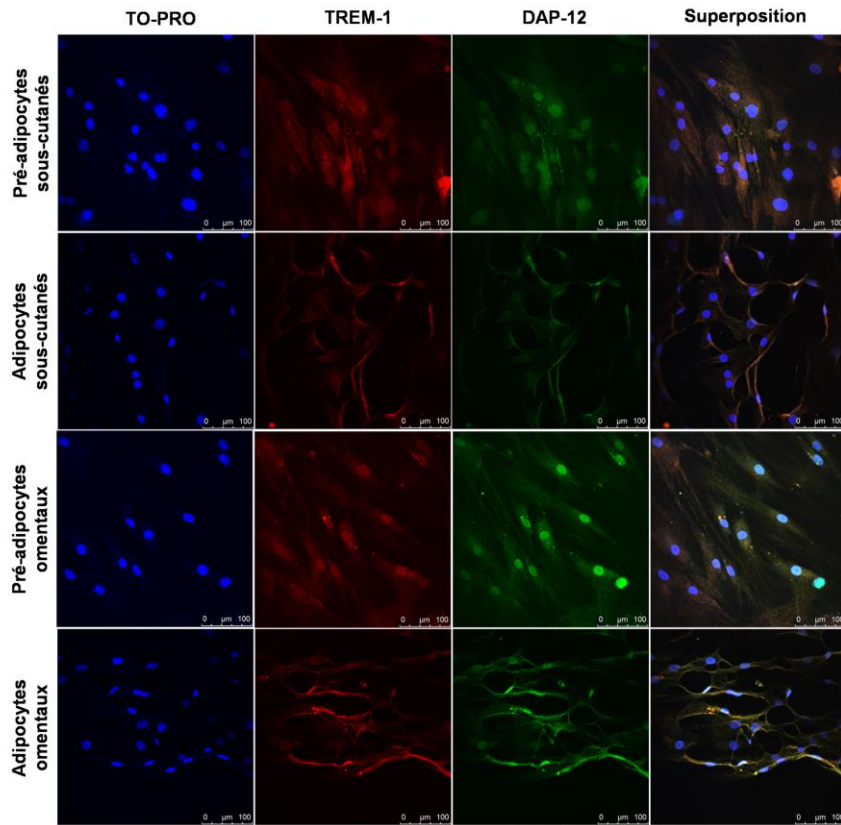
Les expressions basales de TREM-1 et de sa protéine adaptatrice DAP-12 ont été dans un premier temps mises en évidence par microscopie confocale. TREM-1 semble être réparti de manière uniforme dans l'ensemble des cellules. L'augmentation de l'intensité des marqueurs pour TREM-1 et DAP-12 que l'on peut observer au niveau des adipocytes résulte de la structure particulière de ces cellules qui possèdent une large gouttelette lipidique constituant la majorité de l'espace et concentrant le reste des structures dans un espace restreint (**Figure 17A**).

L'expression basale de TREM-1 a été confirmée en western blot. De plus nous avons réalisé une série de stimulations par LPS à différents temps et différentes concentrations afin d'obtenir les conditions les plus reproductibles pour nos expérimentations. La concentration de LPS retenue pour cette étude a été de 100 ng/ml car celle-ci permettait une réponse cellulaire suffisamment importante pour être observable tout en limitant la mortalité.

Nous avons montré que la stimulation des (pré-)adipocytes provenant du tissu omental entraîne une augmentation de l'expression TREM-1. Ce phénomène ne semble pas être présent chez les (pré-)adipocytes provenant du tissu adipeux sous cutané. De plus, l'expression protéique de TREM-1 semble être plus importante dans les cellules omentales que chez les sous cutanée (**Figure 17B**).

Ces résultats permettent de conclure que TREM-1 et sa protéine adaptatrice DAP-12 sont exprimés chez les (pré-)adipocytes et adipocytes sous cutanés et omentaux et que l'expression de TREM-1 est augmentée en présence de LPS au sein des cellules provenant du tissu omental.

A



B

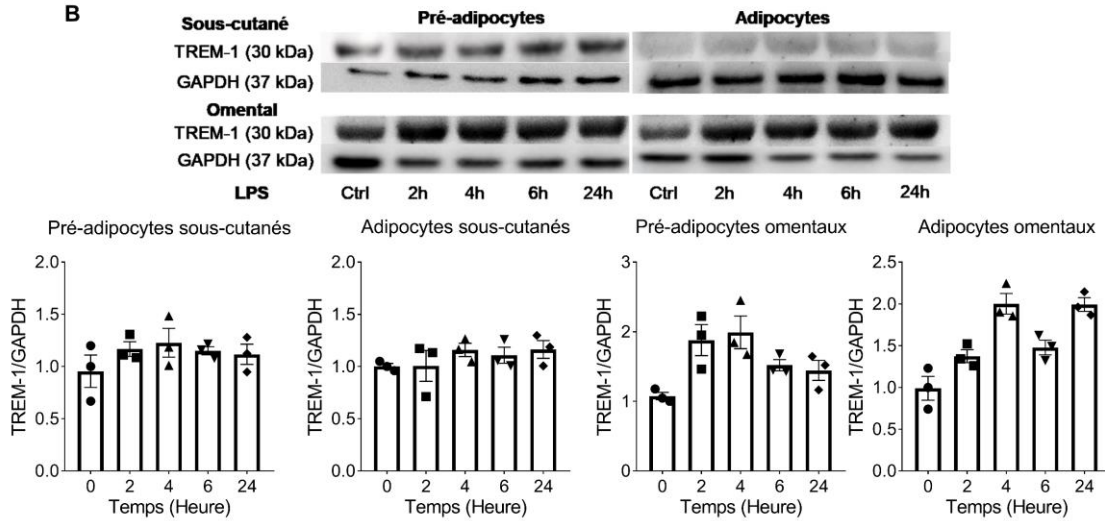


Figure 17 : TREM-1 est exprimé par les (pré)-adipocytes sous-cutanés et omentaux

(A) Microscopie confocale des (pré)-adipocytes sous-cutanés (panel du haut) et omental (panel du bas). Les cellules ont été marquées pour TREM-1 (rouge), DAP12 (vert) et au niveau du noyau (bleu). Barre d'échelle : 100 μ m **(B)** Analyse par western blot de l'expression de TREM-1 des (pré)-adipocytes omentaux et sous-cutanés. Les images sont représentatives de trois expérimentations réalisées sur trois donneurs différents.

2. TREM-1 est fonctionnel au sein des (pré)-adipocytes sous cutanés et omentaux

Nous avons ensuite voulu déterminer si le récepteur TREM-1 est fonctionnel sur ces cellules. TREM-1 étant un amplificateur de la réponse inflammatoire fonctionnant en synergie avec les TLRs, c'est pourquoi nous avons stimulé les cellules avec du LPS à 100 ng/ml provenant de la souche *Escherichia coli* en présence d'un anticorps agoniste de TREM-1 (MAB1278) ou une Immunoglobuline G contrôle à 2h, 4h, 6h et 24h. Nous avons dosé les concentrations d'IL-8, d'IL-6 et de MCP-1 dans les surnageants de culture. De manière prévisible, la stimulation par LPS entraîne l'élévation de la sécrétion de ces cytokines en fonction du temps. Cette élévation est plus importante chez les (pré-)adipocytes provenant du tissu omental que du sous cutané. La costimulation par LPS et par mab1278 amplifie ce phénomène, particulièrement chez les cellules omentales par rapport aux cellules sous cutanées. Ces données sont d'autant plus intéressantes que l'expression de TREM-1 est plus importante chez les cellules omentales que chez les pré-adipocytes et adipocytes provenant du tissu adipeux sous cutané (**Figure 18**).

Nous avons également dosé les concentrations de leptine et d'adiponectine dans le surnageant de culture des adipocytes sous-cutanés et omentaux. La stimulation par LPS provoque l'augmentation des sécrétions de ces adipokines. Cependant, l'activation de TREM-1 après ajout du mab1278 n'amplifie pas les sécrétions de manière significative à 2, 4, 6 et 48 heures (Data non présentées).

Ces expérimentations nous ont permis de mettre en évidence l'expression de TREM-1 et la fonctionnalité de ce récepteur.

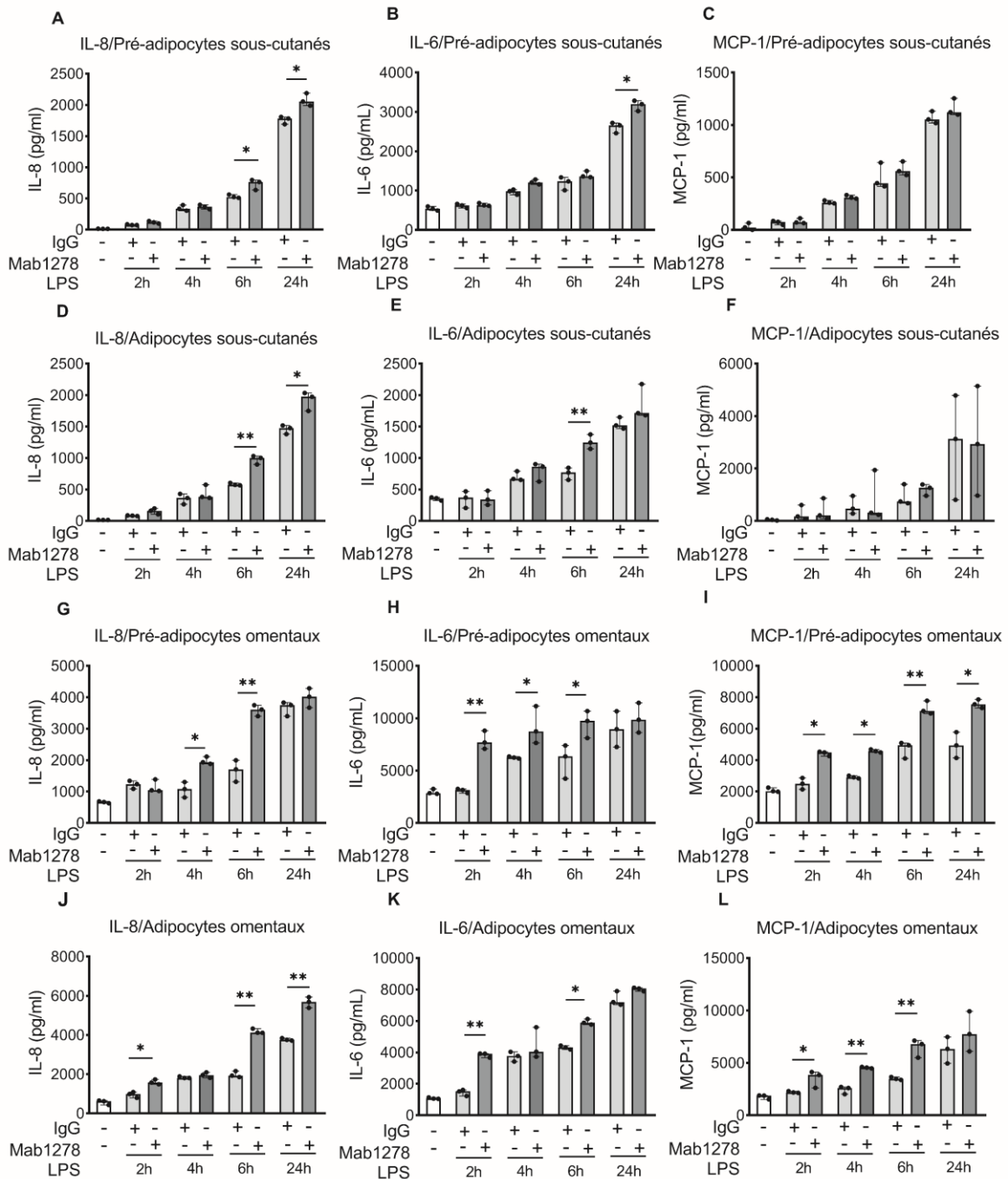


Figure 18 : L'activation de TREM-1 amplifie l'inflammation induite par LPS dans les (pré-)adipocytes sous-cutanés et omentaux humains

(A) Quantification en ELISA multiplex automatisé de l'IL-8, de l'IL-6 et du MCP-1 dans les surnageants cellulaires des pré-adipocytes (A-C) et des adipocytes (D-F) sous-cutanés ainsi que des pré-adipocytes (G-I) et des adipocytes (J-L) omentaux préalablement stimulés ou non par LPS (100 ng/ml), mab1278 (5µg/ml) et une IgG témoin pendant 2, 4, 6 ou 24h. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes réalisées chacune sur trois donneurs différents. Les différences significatives ou non entre les conditions IgG et Mab1278 ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney *p < 0,05, **p < 0,01. Les données sont présentées sous forme de médianes.

II. La délétion de *Trem-1* réduit les conséquences de l'obésité

1. La délétion de *Trem-1* limite la prise de poids chez la souris

Cette étude a été réalisée sur 40 souris âgées de 8 semaines. Vingt souris, dont dix n'exprimant pas le récepteur TREM-1, ont été nourries avec un régime riche en graisse (HFD). Le groupe de 20 souris restantes, dont la moitié était composé de souris sauvage (WT) et dont l'autre moitié était constitué de souris délétée pour *Trem-1* (KO), ont été nourries avec un régime standard, pauvre en graisse (LFD). Les souris ont été suivies pendant 12 semaines. Afin de déterminer si TREM-1 avait une influence sur la prise de poids et sur la consommation de nourriture nous avons réalisé un suivi hebdomadaire de la prise de poids (**Tableau 7**).

Comme attendu, l'ensemble des souris ont eu un gain de poids significatif. Celui-ci est modeste dans les groupes nourris avec un régime standard quel que soit le génotype (+ 19,14% ± 4,31). Ce gain de poids est un phénomène physiologique qui s'explique par le fait que les souris étaient âgées de 8 semaines seulement. De manière prévisible, les souris nourries avec le régime riche en graisse ont eu un gain de poids bien plus important que les souris ayant eu accès au régime standard (53,50 % ± 11,48 contre 19,14% ± 4,31). En revanche, bien que les souris délétées pour *Trem1* soient devenues obèses, leur gain de poids est plus faible comparé aux souris sauvages (47 % ± 4,11 contre 60 % ± 3,73) (**Figure 19A-C**).

Le suivi de la prise alimentaire que nous avons réalisé indique que cette prise de poids ne provient pas d'une consommation de calories différente entre les souris ko et les souris sauvages (**Figure 19E-F**).

Le gain de poids se situe au niveau de la masse grasse (Tissu adipeux mésentérique, sous cutané et perigonadal) et également au niveau du foie. Il convient de noter que le poids ces organes était plus faible chez les souris délétée pour *Trem1* que chez les souris sauvages (**Figure 19G-J**). Il n'y a pas de différences significatives de prise de poids au niveau des reins, de la rate et du cœur (Données non présentées).

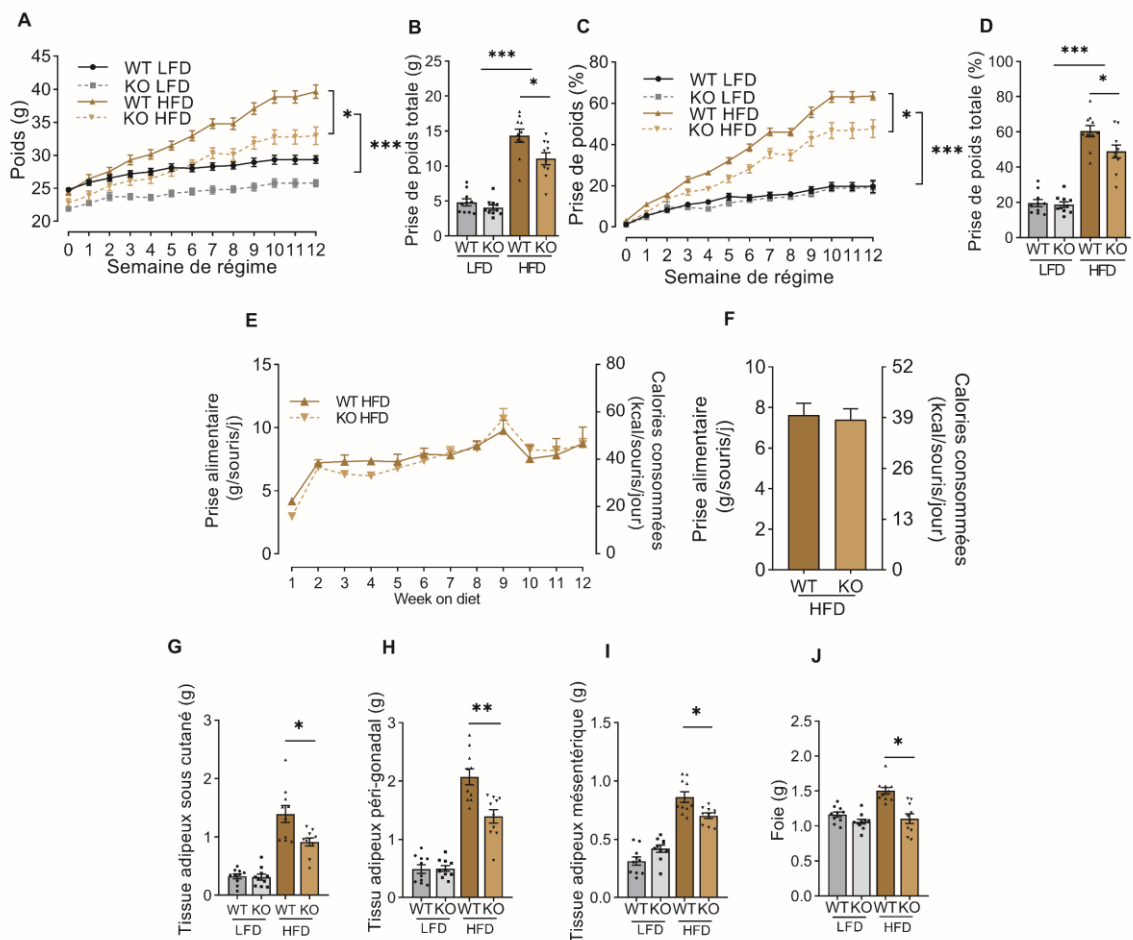


Figure 19 : La délétion de *Trem1* limite la prise de poids chez les souris nourries avec un régime riche en graisse

(A) Prise de poids (g) des souris sauvages (WT), délétées pour *Trem1* (KO) nourries avec un régime standard (LFD) ou un régime riche en graisses (HFD) pendant 12 semaines. **(B)** Prise de poids totale, **(C)** prise de poids (%), **(D)** prise de poids totale (%), **(E)** prise alimentaire et calorique pendant 12 semaines, **(F)** moyenne de la prise alimentaire et des apports caloriques sur 12 semaines ($n = 10$ souris par groupes (ANOVA)). **(G)** Moyenne des poids des tissus sous-cutanés, **(H)** périgonadiques et **(I)** mésentériques ainsi que **(J)** des poids des foies des souris sauvages (WT) et délétées pour *Trem1* (KO) après 12 semaines de régime riche en graisse (HFD) ($n=10$ souris par groupe ; test t de Student). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

WT LFD	KO LFD	WT HFD	KO HFD
27,2	29,3	35,5	36,6
30,7	27,5	35	38,4
31,2	24,7	40,9	36,6
30,3	26,1	36,4	36
26,9	24,6	37,2	34,3
29,4	22,9	42,6	27,5
29	26,1	40,6	30,7
30	25,3	37,2	33,5
26,3	25,6	42,6	31,4
30,6	25,8	43,8	33,1

Tableau 7 : Poids (g) des souris à 12 semaines de régime

2. L'inflammation de bas grade est réduite chez les souris n'exprimant pas TREM-1

L'obésité entraîne le développement d'une inflammation chronique de bas grade. TREM-1 étant un amplificateur de la réponse inflammatoire, nous avons cherché à déterminer son rôle dans l'obésité. Pour cela nous avons quantifié l'expression des gènes pro-inflammatoires *Tnf- α* , *Il-6*, et *Ccl2* codant respectivement pour TNF- α , IL-6 et MCP-1 (**Figure 20**).

Aucune différence significative de l'expression de ces gènes n'a été observée entre les souris ko et les souris sauvages nourries avec un régime standard, excepté pour *Tnf- α* où l'on observe une diminution de son expression chez les souris délétées pour TREM-1. De manière générale l'expression de ces gènes est plus faible chez les souris non obèses que chez les souris nourries avec le régime riche en graisse hormis pour *Tnf- α* , *Il-6* dans le tissu adipeux sous cutané et pour *Ccl2* dans le foie.

La suppression de TREM-1 chez les obèses a permis la diminution de l'expression de *Tnf- α* , *Il-6*, et *Ccl2* dans l'ensemble des tissus observé à l'exception de *Ccl2* dans le foie et de l'ensemble de ces cytokines au sein du tissu adipeux blanc. Il est important de noter que la délétion de *Trem1* n'abroge pas totalement l'inflammation. Ceci s'explique par le fait que ce récepteur est un amplificateur de la réponse inflammatoire et non un initiateur.

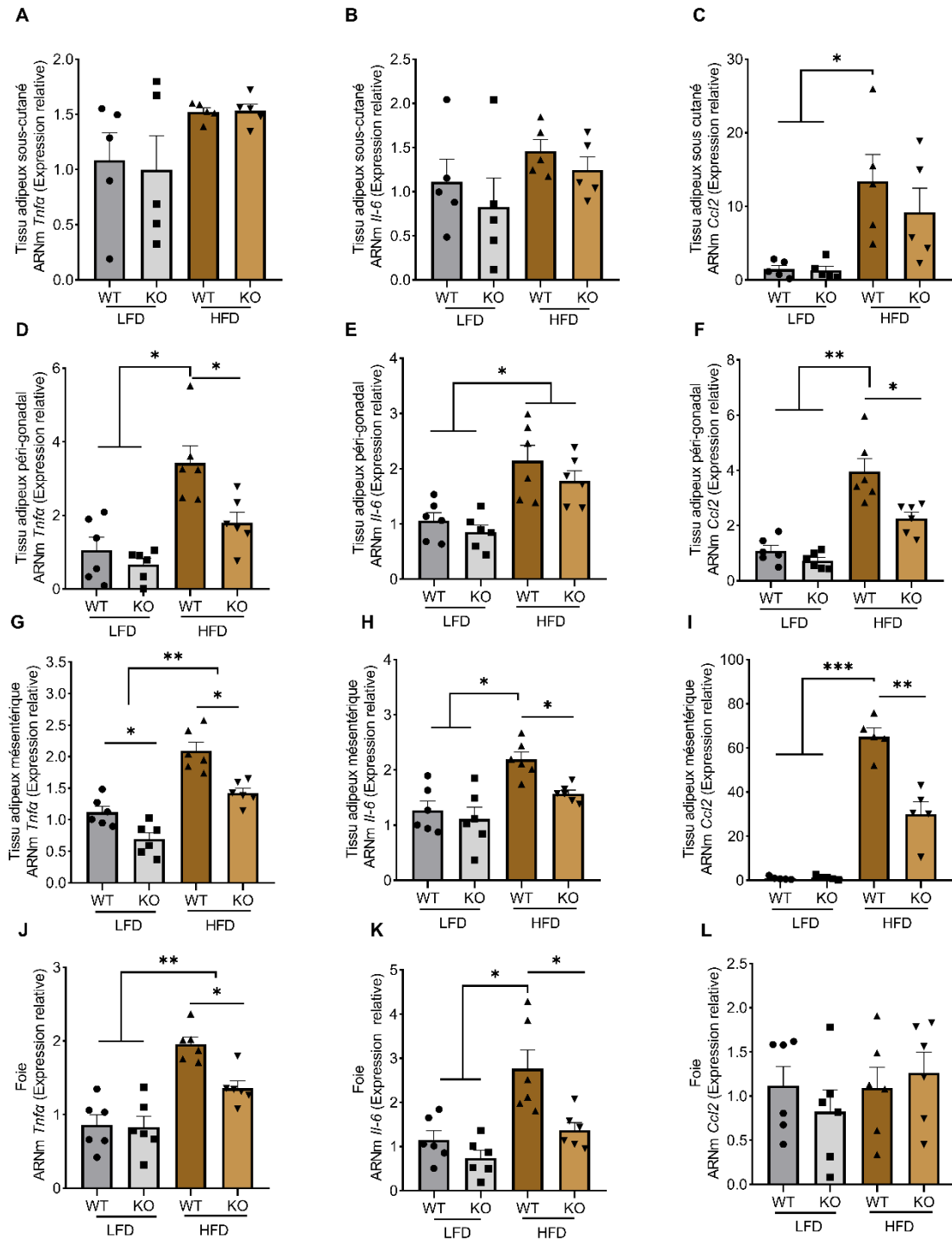


Figure 20 : La délétion de *Trem1* diminue l'inflammation chez les souris obèses

Quantification de l'expression de *Tnfα*, *Il-6* et *Ccl2* par qPCR en temps réel dans les tissus adipeux (A-C) sous-cutané, (D-F) périgonadique, (G-I) mésentérique et (J-L) dans le foie. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 5$ souris par groupe ; test de Kruskal Wallis ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Le tissu adipeux est composé en partie de nombreuses cellules immunitaires. Les macrophages y ont un rôle important notamment dans la génération et le maintien de l'inflammation. L'infiltration et la polarisation des macrophages au sein des tissus adipeux sont des phénomènes importants dans la physiopathologie de l'obésité. Nous avons donc quantifié l'infiltration des macrophages par RT-qPCR au sein des tissus sous cutané, mésentérique et périgonadique en mesurant l'expression de *Adgre1* codant pour F4/80, un marqueur des macrophages chez la souris. L'élévation de ce marqueur chez les souris obèses indique un nombre plus important de macrophages dans les différents tissus adipeux observés chez les souris obèses comparé aux souris non obèses (**Figure 20**).

Cependant ces résultats ne nous permettent pas de savoir quel type de macrophages est majoritairement présent dans ces tissus. Nous avons donc réalisé des mesures d'expression par RT-qPCR de *Itagx* et de *Mrc-1* codant respectivement pour CD11c, considéré comme un marqueur des macrophages de type M1 (pro-inflammatoire), et CD206 qui est un marqueur des macrophages de type M2 (anti-inflammatoire). Les souris obèses présentent une augmentation du marqueur CD11c comparé aux souris non obèses dans les tissus adipeux sous cutané, périgonadal et mésentérique. Chez les souris obèses sauvages il y a une expression significativement plus importante de *Itagx* comparativement aux Ko dans les tissus périgonadique et mésentérique. Nous observons cependant une tendance à l'augmentation dans le tissu sous cutané.

Excepté dans le tissu périgonadique, nous remarquons une faible influence du régime riche en graisse sur l'expression de *Mrc-1*. Dans l'ensemble des tissus adipeux étudiés, la délétion de *Trem1* ne semble pas avoir de conséquences significatives sur l'expression de ce gène. Chez les souris obèses, les ratios *Mrc-1/Itagx* sont préférentiellement en faveur du marqueur CD11c chez les sauvages comparées aux souris délétées pour *Trem1* que cela soit dans le tissu sous cutané, mésentérique ou périgonadique.

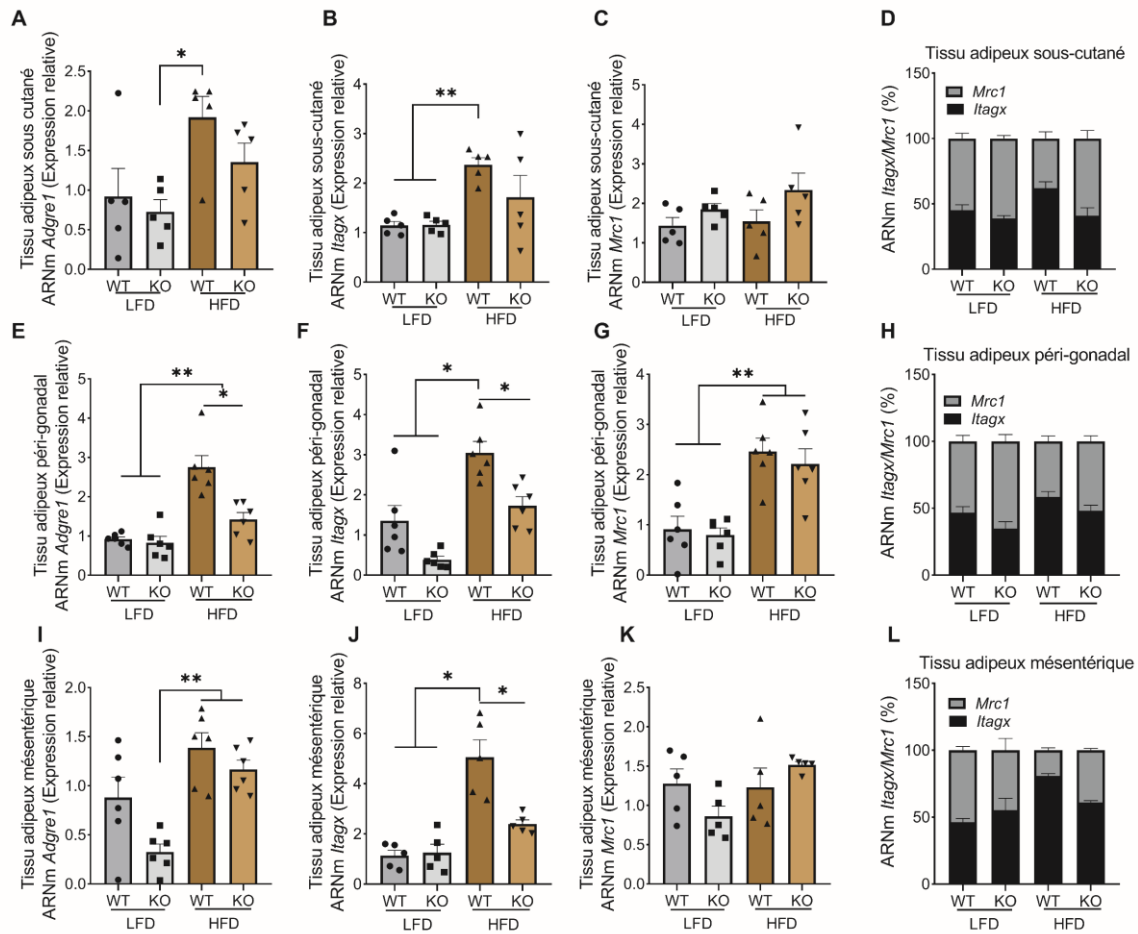


Figure 21 : La délétion de *Trem1* réduit l'infiltrat inflammatoire dans les tissus adipeux des souris obèses

Quantification de l'expression d'*Adgre1*, *Itagx* et de *Mrc1* par qPCR en temps réel dans les tissus adipeux (A-C) sous-cutané, (E-G) périgonadique et (I-K) mésentérique. (D, L, H) Les rapports d'expression *Itagx/Mrc1* ont été calculés à partir des données obtenues en qPCR. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 5$ souris par groupe ; test de Kruskal Wallis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3. La délétion de *Trem1* protège de la résistance à l'insuline

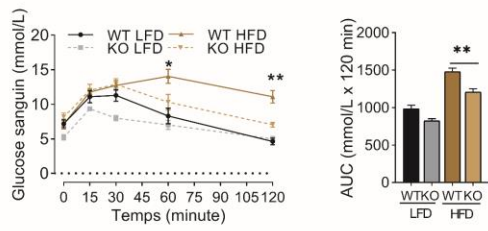
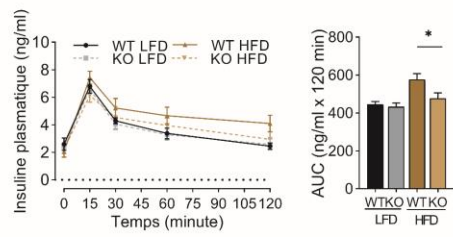
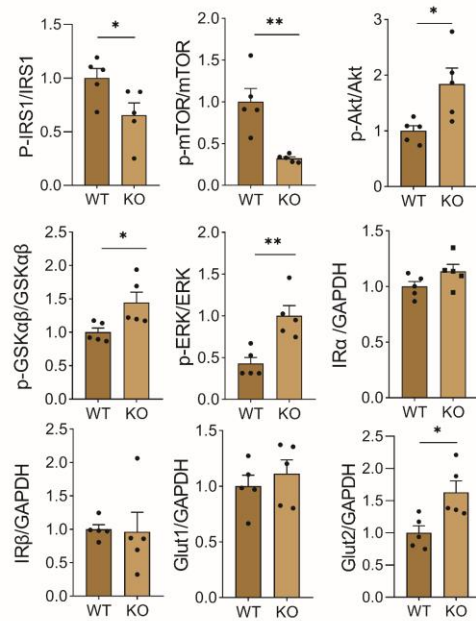
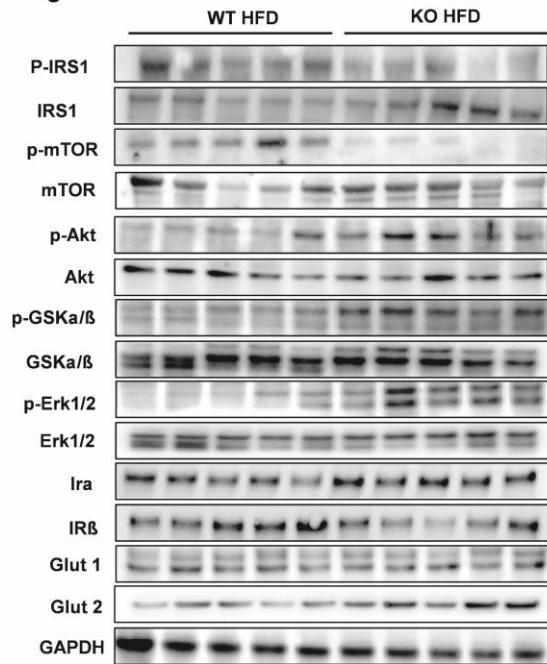
Nous avons mis en évidence que la délétion de *Trem1* chez les souris obèses permettait de limiter l'inflammation chronique de bas grade dans les tissus adipeux mais également dans le foie. Nous avons donc dans un second temps voulu explorer l'effet de la délétion de *Trem1* sur les conséquences associées à l'obésité. L'une des conséquences majeures de l'obésité que nous avons voulu explorer, est le développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et des conséquences associées (Rétinopathie, néphropathie, infarctus du myocarde...).

Pour cela nous avons réalisé des tests de tolérance au glucose qui consistent à réaliser des gavages au glucose puis de mesurer la glycémie et l'insuline à différents temps afin de déterminer en combien de temps la glycémie revient à un état basal. Les souris nourries avec un régime riche en graisses présentent une concentration de glucose sanguin plus élevée que les souris nourries avec un régime standard. En revanche, chez les souris obèses KO, le pic de glycémie provoqué par les gavages de glucose est plus précoce et moins important ($12,9 \pm 1,44$ à 30 minutes) que chez les souris obèses sauvages ($14,04 \pm 1,83$ à 60 minutes). De plus, contrairement aux souris obèses délétées pour *Trem1*, la glycémie des souris sauvages HFD n'est toujours pas revenue à un niveau basal à 120 minutes. Les souris sauvages HFD ont un taux d'insuline circulant plus élevé que chez les souris KO HFD. Le développement de l'intolérance au glucose associé à l'hyper-insulinémie observée laisse penser à un défaut de signalisation de l'insuline chez les souris obèses sauvages qui est moins présent chez les souris KO (**Figure 22A-B**).

Pour mieux comprendre les phénomènes observés, nous avons effectué l'analyse d'un ensemble de protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline par western blot dans le foie des souris ayant suivi un régime riche en graisse. Chez les obèses, les transporteurs au glucose GLUT-1 ainsi que le récepteur à l'insuline (IR- α et IR- β) ne présentent pas de variation d'expression quel que soit le génotype. En revanche il y a une augmentation de GLUT-2 chez les KO. On observe également une diminution de la phosphorylation de la sérine 612 d'IRS-1 et de mTOR chez les souris KO. Néanmoins, il y a une phosphorylation plus importante de Akt, GSK3 α/β et de Erk1/2 chez les souris délétées pour *Trem1* que chez les souris sauvages. Il a été démontré que ces voies favorisent la survie et la croissance cellulaire grâce à leur action sur l'absorption de glucose, le glycogène et la synthèse des protéines. L'ensemble de ces

données montrent que la délétion de *Trem1* permet de prévenir le développement de la résistance à l'insuline chez les souris obèses (**Figure 22C**).

Afin d'approfondir l'effet de la délétion de *Trem1* dans l'évolution des comorbidités associées à l'obésité dans le foie, nous avons réalisé une série de coupes histologiques que nous avons coloré à l'hématoxyline et éosine. Cela avait pour but d'observer la présence ou non de l'accumulation des lipides au sein du foie. Les expérimentations ont été effectuées sur 5 souris par groupes. Comme attendu, aucune des souris ayant été nourrie avec un régime standard présentent un foie anormal. Il en est de même pour les souris délétée pour *Trem1*. On observe cependant des gouttelettes lipidiques dans les foies de deux souris obèses sauvages sur les 5 étudiées. L'accumulation de lipides associés à l'inflammation que nous avons mis en évidence plus tôt est le signe d'un développement d'une stéatose hépatique non alcoolique. Il est important de noter que les deux souris qui présentent ces changements au niveau du foie sont celles qui avaient un poids plus important lors de la mise à mort (43,8 g et 42,6 g) (**Tableau 7**). Or, aucune des souris délétée pour *Trem1* n'a atteint ce poids. Il nous est donc impossible de savoir si ces différences observées sont dues à la différence de poids des souris ou à un effet protecteur du à l'absence du récepteur *Trem1*. La variabilité des poids des souris étudiées et la faible reproductibilité des résultats ne nous permettent donc pas de conclure à un réel effet protecteur de *Trem1* sur l'accumulation des lipides dans le foie (**Figure 22 D**).

A**B****C**

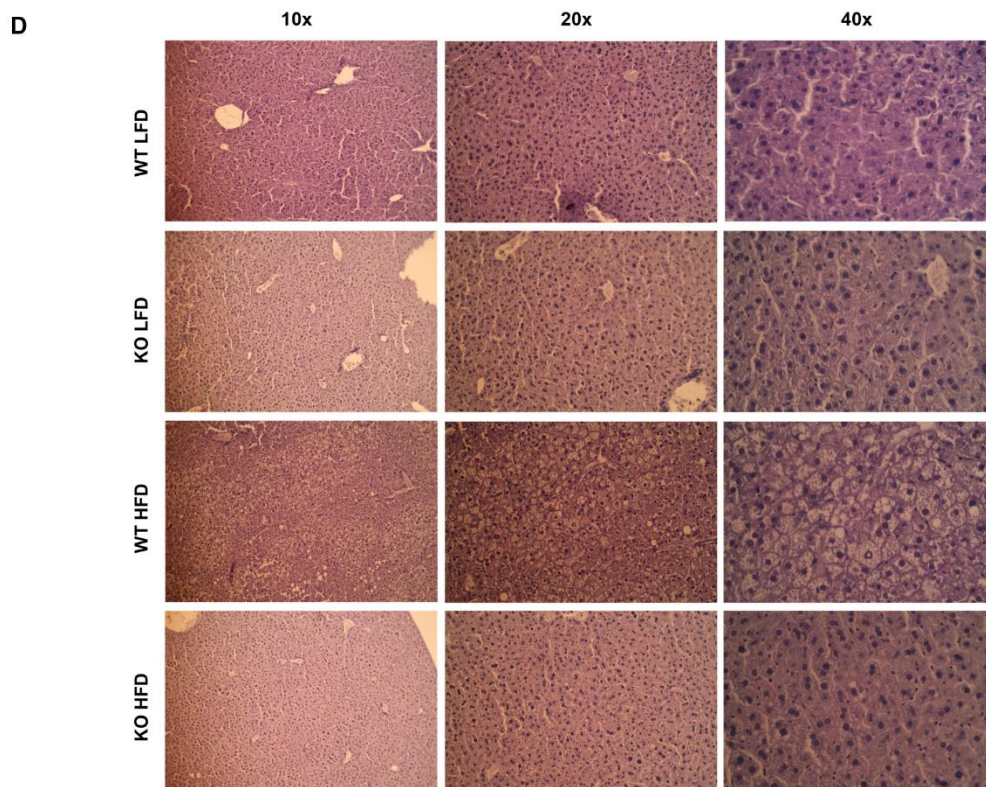


Figure 22 : La délétion de *Trem1* préserve la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses

(A) La glycémie et **(B)** l'insuline ont été mesurées lors d'un test de tolérance au glucose sur les souris sauvages (WT) ou délétées pour *Trem1* (KO) nourries après 10 semaines de régime standard (LFD) ou riche en graisse (HFD). Les souris ont été mises à jeûne pendant 6 heures avant le test. (AUC correspond au calcul de l'aire sous la courbe). **(C)** Analyse des lysats hépatiques par western blot des voies impliquées dans la signalisation de l'insuline et leurs quantifications densitométriques. **(D)** Coupes histologiques hépatiques colorées à l'hématoxyline/éosine. Les données ont été présentées sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 5$ souris par groupe ; test de Mann-Whitney * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4. La délétion de *Trem1* protège les souris de la dysfonction myocardique

L'une des conséquences majeures de l'obésité est le développement d'une dysfonction cardiaque. Nous avons évalué la fonction cardiaque à la fin des 12 semaines de régime riche en graisse. Il n'y a pas de différences significatives de l'épaisseur des parois antérieures et postérieures du ventricule gauche quel que soit le groupe observé. De plus la masse du ventricule gauche ne varie pas de manière significative. L'acquisition des différents paramètres cardiaques nous a permis de calculer la fraction de raccourcissement qui est l'écart entre les deux diamètre diastolique et systolique du ventricule gauche. Nous observons une diminution de la fraction de raccourcissement chez les souris obèses sauvages comparées aux KO (41,01 % \pm 7,55 vs 28,58 % \pm 7,21). Cela laisse supposer un début de dysfonctionnement de la fonction cardiaque qui est absente chez les souris délétées pour *Trem1* (Figure 23).

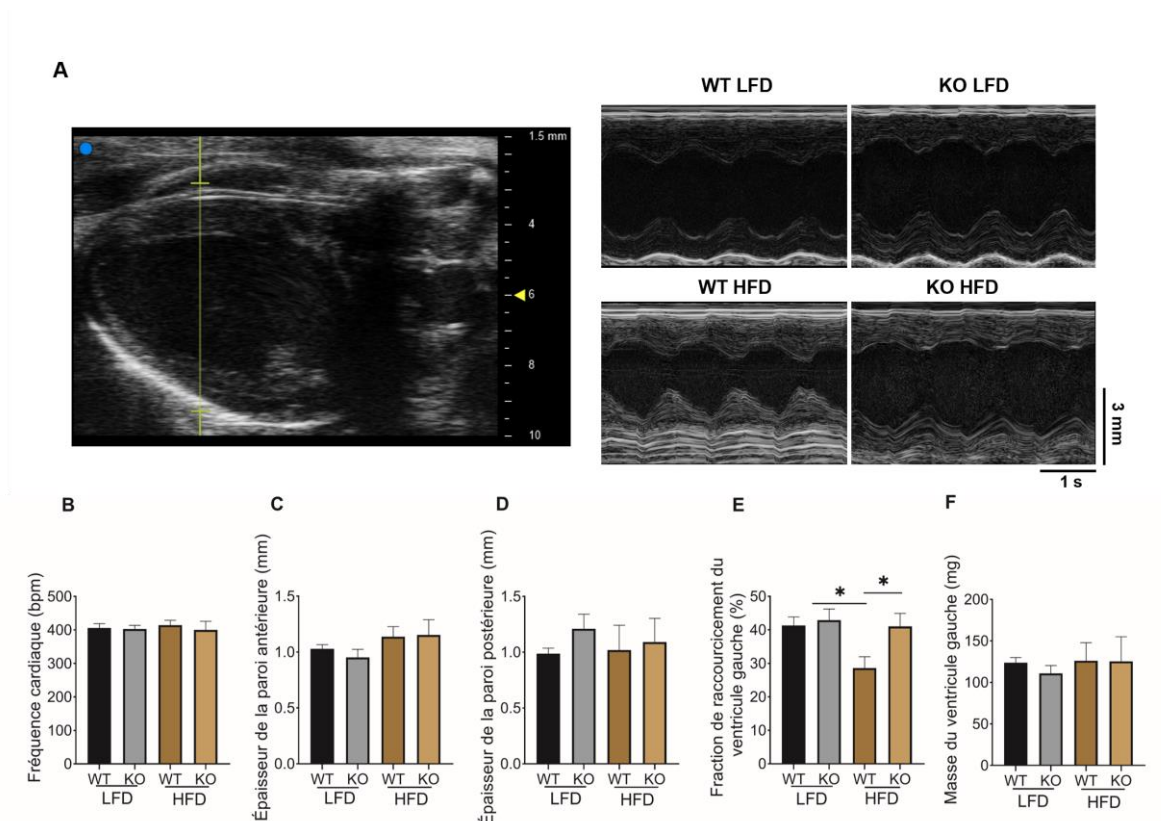


Figure 23 : La délétion de *Trem1* préserve la fraction de raccourcissement chez les souris obèses

(A) Les échocardiographies ont été réalisées à 12 semaines. **(B)** La fréquence cardiaque, **(C)** l'épaisseur des parois antérieures et **(D)** postérieures du ventricule gauche, la fraction de raccourcissement et **(E)** la masse ventriculaire gauche ont été déterminés. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 6-10$ souris par groupe ; ANOVA * $p < 0,05$).

Paramètres/Groupes	WT LFD	KO LFD	WT HFD	KO HFD
Poids initial (g)	24,81 ± 0,37	21,93 ± 0,37	24,47 ± 0,56	22,81 ± 0,66
Poids final (g)	29,16 ± 0,56	25,79 ± 0,54	39,18 ± 1,03	33,81 ± 1,04
Prise de poids (g)	4,81 ± 1,56	4,07 ± 1,19	14,34 ± 2,98	11,06 ± 2,66
Prise de poids (%)	19,58 ± 2,00	18,69 ± 1,57	60 ± 3,73	47 ± 4,11
Poids foie (g)	1,16 ± 0,04	1,06 ± 0,04	1,50 ± 0,05	1,10 ± 0,07
Poids tissu adipeux blanc sous cutané (g)	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,05	1,39 ± 0,14	0,91 ± 0,07
Poids tissu adipeux blanc périgonadal (g)	0,49 ± 0,07	0,5 ± 0,049	2,07 ± 0,14	1,39 ± 0,12
Poids tissu adipeux mésentérique (g)	0,31 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,86 ± 0,05	0,7 ± 0,02
Glucose sanguin (AUC mmol/L x 120 min)	987,6 ± 44,86	824,6 ± 25,94	1481 ± 46,11	1208 ± 43,28
Insuline plasmatique (AUC ng/ml x 120 min)	444,3 ± 16,42	433,1 ± 19,54	577,1 ± 30,49	477,3 ± 28,71
Fraction de raccourcissement du ventricule gauche (%)	41,3 ± 2,571	42,9 ± 3,315	28,59 ± 3,378	41,01 ± 3,883

Tableau 8 : Résultats des principaux paramètres étudiés

Discussion

TREM-1 fut pour la première fois mis en évidence en 2000 par Bouchon et al. Depuis, il a été décrit comme étant un acteur majeur et délétère dans de nombreuses maladies pro-inflammatoires aiguës (choc septique, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral) et chroniques (maladies inflammatoires de l'intestin, athérosclérose, arthrite, lupus, cancer) (Tammaro et al., 2017). Dans cette étude nous avons mis en évidence l'implication de TREM-1 dans l'obésité et le développement des comorbidités associées.

Les premiers travaux traitant de l'implication de TREM-1 au cours de l'obésité ont été réalisés en 2017 par Subramanian et son équipe. Ils ont mis en évidence, chez des patients obèses, une augmentation de l'expression génique et protéique de TREM-1 dans des biopsies de tissus adipeux sous cutané et omental ainsi que dans le foie. De plus, ils ont également observé une élévation de la forme soluble de TREM-1 dans le plasma de ces patients. Or, TREM-1 soluble est un marqueur de l'activation de la voie de TREM-1 et il a été étudié comme biomarqueur dans certaines pathologies inflammatoires comme le choc septique (Brenner et al., 2017). De façon intéressante, l'expression de TREM-1 est plus élevée chez les patients obèses et diabétiques que chez les individus obèses non diabétiques (Subramanian et al., 2017). Dans une étude incluant 187 jeunes adultes sains et non obèses qui présentaient des facteurs de risque cardiométaboliques tel que l'hypertension, l'hypertriglycémie, un tour de taille élevé ou un faible taux de HDL, Vazquez et al ont montré une élévation de la concentration plasmatique de la forme soluble de TREM-1. Ces données suggèrent que l'élévation plasmatique de la forme soluble de TREM-1 pourrait être le signe du développement d'un futur syndrome métabolique (Vázquez et al., 2019).

Initialement, TREM-1 était considéré comme étant uniquement exprimé par les cellules myéloïdes (neutrophiles, monocytes/ macrophages). Il a cependant été observé dans d'autres types cellulaires non immunitaires notamment dans les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes, ainsi qu'au niveau tissulaire dans les poumons, le cœur, la moelle épinière, le placenta et les ganglions lymphatiques (Roe et al., 2014). Quel que soit le type cellulaire où il est exprimé, son activation a pour conséquence l'amplification de la réponse inflammatoire initialement générée par les TLRs (Bouchon et al., 2001). Nous montrons ici pour la première fois que TREM-1 et sa protéine adaptatrice DAP-12 sont exprimés par les pré-adipocytes et

adipocytes provenant des tissus sous cutanés et omentaux. L'utilisation de LPS permet de surexprimer TREM-1 chez les (pré-) adipocytes omentaux. Ce phénomène a déjà été mis en évidence dans d'autres types cellulaires tels que les monocytes et les neutrophiles (Bouchon et al., 2000). Nous avons montré que, de manière similaire aux autres types cellulaires dans lesquels TREM-1 est présent, son activation permet d'amplifier la réponse inflammatoire chez les (pré-)adipocytes. Cela se traduit par l'augmentation des sécrétions des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, MCP-1) sans jouer un rôle direct les libérations de leptine et d'adiponectine. Nous avons donc montré que TREM-1 est exprimé et fonctionnel sur les (pré-)adipocytes sous cutanés et omentaux améliorant ainsi les connaissances sur l'expression de TREM-1.

Contrairement aux tissus adipeux omental et mésentérique, le tissu adipeux sous cutané est considéré comme protecteur au cours de l'obésité. En effet, les pré-adipocytes sous cutanés ont une meilleure capacité de prolifération, de différenciation et de stockage (Jo et al., 2009) (Tchernof and Després, 2013) (Baglioni et al., 2012). De plus les sécrétions des dépôts omental et mésentérique ont des effets délétères sur le foie via le système porte contrairement au dépôt sous cutané (Nielsen et al., 2004). Il a également été mis en évidence que les (pré-) adipocytes viscéraux ont une capacité de sécrétion accrue de médiateurs pro-inflammatoires. Or nous avons mis en évidence que l'expression de TREM-1 est plus élevée dans les cellules omentales que sous cutanées au niveau basal. De plus, l'ajout de LPS, contrairement aux cellules sous cutanées, permet d'augmenter l'expression de TREM-1 au sein des (pré-)adipocyte omentaux. Il a également été mis évidence que l'infiltrat inflammatoire était bien plus important dans les tissus viscéraux (omental, mésentérique) que dans le tissu sous cutané (Harman-Boehm et al., 2007). Or l'activation de TREM-1 permet une libération accrue de MCP-1, facteur majeur dans le recrutement de l'infiltrat inflammatoire, par les cellules omentales et non sous cutanées. Ces résultats suggèrent que TREM-1 pourrait être l'une des causes majeures du comportement délétère du tissu adipeux omental au cours de l'obésité.

Après avoir montré l'expression et la fonctionnalité de TREM-1 dans les cellules adipeuses, nous avons étudié le rôle de TREM-1 dans le développement de l'obésité en utilisant un modèle classique d'obésité murine induite par un régime riche en graisse et des souris délétées pour *Trem1*. Le suivi hebdomadaire de la prise de poids a mis en évidence que l'absence de TREM-1 permet de limiter celle-ci. Ces différences de poids se situent

principalement au niveau de la masse grasse et du foie. Il est intéressant de noter que la prise de poids s'est accompagnée d'une consommation équivalente de calorie chez les souris HFD délétées ou non pour *Trem1* suggérant que cette différence de prise de poids ne provient pas d'une différence de sécrétion ou de résistance à la leptine. Des résultats similaires de limitation de prise de poids ont été obtenus dans la littérature par l'utilisation de modèles de souris délétées pour *Tnf- α* (Chen et al., 2016) ou par l'inhibition des sialidases, enzymes impliquées dans la dégradation de l'acide sialique (Pilling et al., 2021).

Par définition, l'obésité est un déséquilibre de la balance apport/dépense énergétique en faveur des apports. Ici nous avons montré que la prise alimentaire n'était pas impactée par la délétion de *Trem1*. Bien que nous n'ayons pas déterminé le mécanisme responsable de ces différences de prise de poids, plusieurs hypothèses pouvant expliquer ces phénomènes peuvent être décrits :

Depuis plusieurs années, de nombreuses études se sont intéressées aux interactions entre les populations bactériennes présentes dans l'intestin et l'hôte. Il a été montré que l'apparition du surpoids et de l'obésité peut changer de manière drastique la composition du microbiote intestinal chez l'humain et l'animal. D'autres études ont démontré que la manipulation du microbiote intestinal et de ses voies métaboliques peut affecter l'adiposité et le métabolisme de l'hôte. En 2018, Kokten et al, ont étudié le rôle thérapeutique de TREM-1 dans le cadre de la colite chez la souris. Comme pour notre étude, ils ont utilisé des souris délétées pour *Trem1* et ont mis en évidence que la composition du microbiote intestinal de ces souris était significativement différente par rapport aux souris sauvages. On peut donc émettre l'hypothèse que les différences de prises de poids observées durant notre étude peuvent provenir de la différence de composition du microbiote intestinal entre les souris sauvages et les souris KO.

Au cours de l'obésité, en plus de la présence d'un infiltrat inflammatoire important au niveau des dépôts adipeux, il y a un déséquilibre de la balance macrophagique M1/M2 en faveur des macrophages pro-inflammatoires de type M1 (Fujisaka et al., 2009). Ce déséquilibre s'explique notamment par la polarisation des macrophages de type M2 en M1. Les différences de poids observées entre les sauvages et les Ko peuvent être due à des différences dans les dépenses énergétiques. L'une des dépenses les plus importante provient de la thermogénèse générées par les adipocytes bruns et beiges (Chen et al., 2020). Comme décrit précédemment, le

recrutement d'adipocytes beiges augmente la vitesse d'absorption du glucose et des lipides circulants conduisant à une plus grande dépense énergétique par l'intermédiaire de la thermogénèse. L'analyse des marqueurs macrophagiques dans le tissu sous cutané a révélé que le ratio M1/M2 (*Mrc1/Itagx*) est en faveur des M2 chez les souris délétées pour TREM-1 contrairement aux souris sauvages dont le ratio est en faveur des M1. Or il a été établi que les macrophages de types M2 sécrètent des catécholamines provoquant l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la thermorégulation et la lipolyse des adipocytes blancs. Il est intéressant de noter que la génération d'adipocyte beige se fait préférentiellement dans le tissu adipeux sous cutané. Il est possible que la délétion de *Trem1* permettrait de favoriser la transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocyte beiges et donc d'augmenter les dépenses énergétique ce qui pourrait expliquer les différences de prises poids observées.

Nous avons mis en évidence que la délétion de *Trem1* permettait de diminuer l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité dans les tissus adipeux mésentériques, périgonadiques et dans le foie. Nous avons également montré une réduction du nombre de macrophages présents dans les tissus adipeux chez ces mêmes souris ainsi que la réduction de CD11c dans les tissus périgonadiques et mésentériques, considéré comme étant un marqueur des M1. Suggérant un rôle majeur de TREM-1 dans la genèse et la perpétuation de l'inflammation au cours de l'obésité. Cependant TREM-1 est un amplificateur de la réponse inflammatoire, il n'abroge donc pas totalement cette inflammation. Nous avons voulu déterminer si la délétion de *Trem1* permet de réduire suffisamment l'inflammation pour prévenir les comorbidités associées à l'obésité.

Nous avons dans un premier temps étudié l'effet de la délétion de *Trem1* dans le foie. Notre première observation fut la réduction de la masse hépatique chez les souris KO comparées aux souris sauvages. Cela peut être dû à une réduction de l'accumulation de lipides au sein des hépatocytes ainsi qu'une diminution des dépôts ectopiques au niveau hépatique. Au cours de l'obésité, il peut y avoir apparition d'une stéatose hépatique qui est caractérisée par l'accumulation de lipides au sein des hépatocytes. Du fait de la faible reproductibilité des résultats obtenus suites aux coupes et aux colorations histologiques, nous n'avons pas pu déterminer avec certitude si cette stéatose est bien présente dans notre modèle. En revanche nous avons mis en évidence une surexpression de *Tnfa* et de *Il-6* traduisant une activité pro-inflammatoire au sein du foie, ce qui est bien caractérisé dans l'obésité. Cette inflammation

est réduite dans les souris délétées pour *Trem1* comparées aux souris sauvages. La présence d'inflammation dans le foie associée à l'accumulation de lipides est un signe précurseur de la stéatose hépatite, conséquence bien connue dans l'obésité. Cependant les données générées ne nous permettent pas de conclure à la présence de stéatose hépatite dans notre modèle. Néanmoins, l'hyperglycémie provoquée par voie orale chez les souris obèses nous ont permis de mettre en évidence la mise en place d'une diminution de la tolérance au glucose chez les souris obèses. Ce phénomène est moins marqué chez les souris délétées pour *Trem1*. En effet, l'hyperglycémie provoquée est anormalement élevée et longue chez les souris sauvages. L'intolérance au glucose est l'étape qui précède le diabète de type 2 (Andrikopoulos *et al.*, 2008). La littérature montre que la présence de cytokines pro-inflammatoires dans le foie telles que l'IL-6 et le TNF- α a un rôle direct sur les voies de l'insuline et donc sur la résistance à l'insuline. La réduction de l'inflammation dans le foie des souris délétées pour *Trem1* est donc suffisante pour protéger les souris obèses de l'intolérance au glucose induite par un régime hyperlipidique.

L'étude des voies de signalisations liées à l'insuline nous a permis d'approfondir nos observations : La phosphorylation de la sérine 612 d'IRS-1 est plus importante chez les sauvages que chez les KO. Or cette phosphorylation est corrélée au développement de la résistance à l'insuline car elle inhibe les voies de signalisation de l'insuline (Kanety *et al.*, 1995) (Rhodes *et al.*, 2013). L'activité de mTOR est diminuée chez les souris obèses délétées pour *Trem1* comparée aux souris sauvages. Dans des conditions physiologiques, l'activation de mTOR a pour rôle, dans le foie, de favoriser la lipogenèse et, en cas de jeûne, d'inhiber la cétogenèse. Cependant, l'hyperactivation chronique de mTOR qui survient dans l'obésité conduit à la diminution de la sensibilité à l'insuline (Saxton and Sabatini, 2017). Nous avons également montré une phosphorylation plus importante de Akt, GSK3 α/β et de Erk1/2 chez les souris délétées pour *Trem1* sans variation de l'expression des transporteurs au glucose GLUT1. En revanche GLUT2 est exprimé de manière plus importante chez les KO que chez les sauvages. GLUT2 est le principal transporteur du glucose dans le foie. La défaillance de ce transporteur est associé à la diminution de la tolérance au glucose et à l'augmentation de la résistance à l'insuline (Mueckler *et al.*, 1994). L'activation de Akt via sa phosphorylation Akt a pour conséquence l'inhibition de l'autophagie et la phosphorylation de GSK3 α/β . Cette phosphorylation inhibe l'activité de GSK3 α/β sérine/thréonine kinase, qui est impliquée dans

de nombreux processus cellulaires comme l'inhibition de l'activité de la glycogène synthase. Plus globalement, les protéines Akt et GSK3 α/β sont impliquées dans les voies de survie et la synthèse protéique. Erk1/2 est, quant à lui, impliqué dans la croissance cellulaire, la différenciation et la mitogenèse (Santoleri and Titchenell, 2019).

Dans cette étude, nous avons montré qu'inhiber l'inflammation en ciblant le récepteur TREM-1 dans le cadre de l'obésité permettait de limiter la prise de poids et les comorbidités associées (résistance à l'insuline, dysfonction cardiaque). Comme décrit précédemment, différentes études pré-cliniques ont été réalisées ciblant l'inflammation au cours l'obésité. Bien que l'inflammation chronique de bas grade constitue un lien important entre l'obésité et sa physiopathologie, les recherches de Asterholm et son équipe ont montré que la signalisation pro-inflammatoire dans l'adipocyte est nécessaire au remodelage et à l'expansion de tissu adipeux. Pour cela ils ont utilisé des modèles de souris nourries avec un régime riche en graisse incapables de générer une réponse inflammatoire locale au niveau des adipocytes (modèle dominant négatif pour TNF α). Comme pour notre étude, leurs souris génétiquement modifiées ont eu une réduction du poids total et leur masse grasse. Cependant, ils ont également observé une diminution de la tolérance au glucose, l'augmentation de dépôts ectopiques, ainsi que le développement de stéatose hépatique et de colites (Wernstedt Asterholm et al., 2014). Notre étude a montré que l'absence de TREM-1 ne provoque pas ces effets délétères. En effet, inhiber TREM-1 permet de diminuer la réponse inflammatoire sans l'abroger laissant ainsi la capacité aux tissus adipeux à s'expandre et à se renouveler. Ces observations renforcent le potentiel thérapeutique de l'inhibition de TREM-1 dans le cadre de l'obésité.

Dans cette étude nous avons mis en évidence l'effet protecteur de la délétion de *Trem-1* chez la souris au cours de l'obésité. En effet, la délétion de *Trem1* a permis de limiter la prise de poids, réduire l'inflammation et protéger de la résistance à l'insuline. Cependant les mécanismes précis qui expliquent comment l'inhibition TREM-1 peut conférer une protection restent à élucider. Nous avons fait l'hypothèse que la réduction de l'inflammation par la délétion de *Trem1* permettrait de briser le cercle vicieux de l'obésité : Les apports excessifs de calories provoquent le développement de l'obésité induisant une inflammation chronique de bas grade conduisant à l'apparition de la résistance à l'insuline ce générant, entre autres, une hyperglycémie et un taux d'acide gras circulant perpétuant l'inflammation.

Perspectives et limites de l'étude

Le modèle Ko *Trem1* peut être considéré comme un modèle préventif. Pour évaluer au mieux l'effet thérapeutique de TREM-1, il serait nécessaire de moduler TREM-1 après l'induction de l'obésité pour déterminer si l'inhibition de ce récepteur est capable d'inverser le phénotype établi. Il est également nécessaire de déterminer jusqu'à quel point l'inhibition de TREM-1 est protecteur des comorbidités associées à l'obésité. Bien que nous ayons observé une protection, par la délétion de *Trem1*, de la tolérance au glucose et de la dysfonction cardiaque, le modèle utilisé dans cette étude n'est pas le plus optimisé pour la prise de poids, le développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et des dysfonctions cardiaques. Afin de centrer nos recherches sur le développement de maladies cardiovasculaires associées à l'obésité, nous pourrions utiliser sur notre modèle un inhibiteur de la nitric oxyde synthase (L-NAME ; N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester) tout en augmentant la durée du régime. Nous pourrions également utiliser des modèles de souris déficientes pour la leptine (*ob/ob*) ou pour son récepteur (*db/db*) afin de simuler l'obésité morbide et le développement du syndrome métabolique. Pour mettre en place ces plans expérimentaux, nous pourrions utiliser le peptide inhibiteur de TREM-1 Nangibotide (en cours d'étude clinique chez les patients en choc septique) mais cela nécessiterait des injections répétées car sa demi-vie est très courte. La meilleure option serait l'administration d'un anticorps antagoniste de TREM-1 mais malheureusement non disponible à ce jour.

Il a été mis en évidence que le blocage de NLRP3 permet de protéger les souris obèses de nombreuses complications associées à l'obésité même en cas de régime hypercalorique prolongé (20 mois) (Cañadas-Lozano et al., 2019). Bien qu'elle soit atténuée chez les souris délétées pour *Trem1*, l'intolérance au glucose reste présente comparée aux souris contrôles. Afin de déterminer si la délétion de *Trem1* est suffisante pour protéger du développement du diabète de type 2, il serait nécessaire de prolonger le régime. Cela permettrait de déceler d'éventuelles limites de cette protection mais également d'étudier d'autres conséquences liées à l'obésité telles que la résistance à la leptine, l'insuffisance cardiaque et la stéatose hépatique.

Au cours de cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la différence de prise de poids provient de l'accroissement des dépenses énergétiques chez les souris délétées pour *Trem1*

dû à l'augmentation de la population d'adipocytes beiges. Différencier les adipocytes beiges, des adipocytes blancs et bruns n'est pas aisé de par les similitudes de leurs caractéristiques physiologiques. Cependant il est possible de les identifier en dosant certains marqueurs protéiques tels que Cox8b , CITED1 et UCP1 (Garcia et al., 2016).

Il serait intéressant d'étudier l'influence de l'activation et l'inhibition de TREM-1 sur la lipogenèse et la lipolyse. En effet, il a été démontré que la délétion du gène codant pour TNF- α dans le tissu adipeux permettait la réduction de la lipogenèse. A défaut de pouvoir utiliser un anticorps antagoniste de TREM-1, cela pourrait être étudié *in vitro* par l'utilisation d'ARN interférents ciblant les transcrits de TREM-1. Cela nous permettrait également de confirmer l'ensemble des données *in vitro* que nous avons obtenues dans cette étude.

Afin d'étudier TREM-1 sur les (pré)-adipocytes, nous avons stimulé ces cellules par du LPS provenant de *Escherichia coli* pour permettre l'initiation de l'inflammation par l'intermédiaire de l'activation de TLR4. Bien qu'il y ait une apparition de LPS circulant en cas d'obésité, les concentrations utilisées dans cette étude ne sont pas physiologiques. Pour approfondir nos analyses sur le rôle de TREM-1 au sein des (pré)-adipocytes, il serait intéressant d'utiliser des lipoprotéines de basses densité oxydées (oxLDL) dont la production est augmentée au cours de l'obésité. En effet, Li et al ont montré une surexpression de TREM-1 dose dépendante aux LDL oxydées sur la lignée macrophagique RAW264.7 qui à son tour contribue à l'athérogenèse et à l'apparition de cellules spumeuses en amplifiant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Le lien entre les oxLDL et l'inflammation induite par TREM-1 a récemment été confirmé par Wang et al. L'utilisation de conditions hypoxiques peut être une autre piste pour étudier TREM-1 dans des conditions plus physiologiques. En effet, il a été montré que TREM-1 est surexprimé dans les cellules dendritiques en cas d'hypoxie (Bosco et al., 2011). De plus, l'hypoxie est présente de manière importante au sein des tissus adipeux au cours de l'obésité. Enfin, pour confirmer nos observation sur le rôle de TREM-1 comme amplificateur de la réponse inflammatoire au sein des (pré)-adipocytes humain, il serait nécessaire d'inhiber ce récepteur par son invalidation génique ou par l'utilisation du peptide LR12.

Conclusion

Au cours de ce projet, nous avons dans un premier temps mis en évidence l'expression de TREM-1 sur les pré-adipocytes et adipocytes omentaux et sous cutanés. Nous avons également démontré la fonctionnalité de ce récepteur et son rôle dans l'amplification de la réponse inflammatoire. L'utilisation d'un modèle de souris délétées pour *Trem1* et nourries avec un régime hypercalorique nous a permis d'étudier le rôle de ce récepteur au cours de l'obésité et dans le développement des comorbidités associées. Nous avons montré que l'ablation de TREM-1 atténue le gain de poids, l'inflammation et la résistance à l'insuline induits par l'obésité. Bien que les mécanismes précis par lesquels l'inhibition de TREM-1 confère une protection restent à déterminer, sa modulation pharmacologique mérite d'être étudiée dans le but de briser le cercle vicieux d'insulino-résistance et l'inflammation.

Bibliographie

- Acierno, C. *et al.* (2020) 'Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: pathophysiological mechanisms shared between the two faces of the same coin', *Exploration of Medicine*, 1(5), pp. 287–306. Available at: <https://doi.org/10.37349/emed.2020.00019>.
- Ahima, R.S. and Flier, J.S. (2000) 'Adipose Tissue as an Endocrine Organ', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(8), pp. 327–332. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00301-5](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00301-5).
- Alex, L. *et al.* (2018) 'Characterization of a mouse model of obesity-related fibrotic cardiomyopathy that recapitulates features of human heart failure with preserved ejection fraction', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 315(4), pp. H934–H949. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00238.2018>.
- Alpert, M.A. *et al.* (2018) 'Obesity and Cardiac Remodeling in Adults: Mechanisms and Clinical Implications', *Progress in Cardiovascular Diseases*, 61(2), pp. 114–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.07.012>.
- Anderson, A.S. *et al.* (2015) 'European Code against Cancer 4th Edition: Obesity, body fatness and cancer', *Cancer Epidemiology*, 39 Suppl 1, pp. S34-45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.01.017>.
- Andrikopoulos, S. *et al.* (2008) 'Evaluating the glucose tolerance test in mice', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(6), pp. E1323–E1332. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90617.2008>.
- Arch, J.R.S. (2002) 'beta(3)-Adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress', *European Journal of Pharmacology*, 440(2–3), pp. 99–107. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01421-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01421-8).
- Arkan, M.C. *et al.* (2005) 'IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance', *Nature Medicine*, 11(2), pp. 191–198. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1185>.
- Arts, R.J.W. *et al.* (2011) 'TREM-1 interaction with the LPS/TLR4 receptor complex', *European Cytokine Network*, 22(1), pp. 11–14. Available at: <https://doi.org/10.1684/ecn.2011.0274>.
- Ashraf, M.J. and Baweja, P. (2013) 'Obesity: The “Huge” Problem in Cardiovascular Diseases', *Missouri Medicine*, 110(6), pp. 499–504.
- Aucouturier, J. *et al.* (2009) 'Effect of android to gynoid fat ratio on insulin resistance in obese youth', *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 163(9), pp. 826–831. Available at: <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.148>.
- Bäckhed, F. *et al.* (2004) 'The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44), pp. 15718–15723. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>.
- Baglioni, S. *et al.* (2012) 'Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell', *PLoS ONE*. Edited by J.M. Gimble, 7(5), p. e36569. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036569>.

- Bai, Y. and Sun, Q. (2015) 'Macrophage recruitment in obese adipose tissue', *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 16(2), pp. 127–136. Available at: <https://doi.org/10.1111/obr.12242>.
- Barouch, L.A. *et al.* (2003) 'Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice', *Circulation*, 108(6), pp. 754–759. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000083716.82622.FD>.
- Batra, A. *et al.* (2010) 'Leptin: A Critical Regulator of CD4+ T-cell Polarization in Vitro and in Vivo', *Endocrinology*, 151(1), pp. 56–62. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2009-0565>.
- Bergouignan, A. and Blanc, S. (2006) 'Énergétique de l'obésité', *Journal de la Société de Biologie*, 200(1), pp. 29–35. Available at: <https://doi.org/10.1051/jbio:2006004>.
- Betz, M.J. and Enerbäck, S. (2018) 'Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease', *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), pp. 77–87. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.132>.
- Björntorp, P. (1990) "'Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes.', *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 10(4), pp. 493–496. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.10.4.493>.
- Blackshear, C.P. *et al.* (2018) 'Utilizing Confocal Microscopy to Characterize Human and Mouse Adipose Tissue', *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 24(10), pp. 566–577. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2018.0154>.
- Boden, G. and Shulman, G.I. (2002) 'Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction', *European Journal of Clinical Investigation*, 32 Suppl 3, pp. 14–23. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.32.s3.3.x>.
- Bosco, M.C. *et al.* (2011) 'Hypoxia modulates the gene expression profile of immunoregulatory receptors in human mature dendritic cells: identification of TREM-1 as a novel hypoxic marker in vitro and in vivo', *Blood*, 117(9), pp. 2625–2639. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-292136>.
- Bouchard, C. *et al.* (1990) 'The response to long-term overfeeding in identical twins', *The New England Journal of Medicine*, 322(21), pp. 1477–1482. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM199005243222101>.
- Bouchon, A., Hernández-Munain, C., *et al.* (2001) 'A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 194(8), pp. 1111–1122. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.194.8.1111>.
- Bouchon, A., Facchetti, F., *et al.* (2001) 'TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock', *Nature*, 410(6832), pp. 1103–1107. Available at: <https://doi.org/10.1038/35074114>.
- Bouchon, Axel *et al.* (2001) 'TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock', *Nature*, 410(6832), pp. 1103–1107. Available at: <https://doi.org/10.1038/35074114>.

- Bouchon, A., Dietrich, J. and Colonna, M. (2000a) 'Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(10), pp. 4991–4995. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.4991>.
- Bouchon, A., Dietrich, J. and Colonna, M. (2000b) 'Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(10), pp. 4991–4995. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.4991>.
- Brahimi-Horn, M.C. and Pouyssegur, J. (2007) 'Oxygen, a source of life and stress', *FEBS letters*, 581(19), pp. 3582–3591. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.018>.
- Brenner, T. *et al.* (2017) 'Soluble TREM-1 as a diagnostic and prognostic biomarker in patients with septic shock: an observational clinical study', *Biomarkers*, 22(1), pp. 63–69. Available at: <https://doi.org/10.1080/1354750X.2016.1204005>.
- Caldefie-Chezet, F. *et al.* (2001) 'Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action?', *Journal of Leukocyte Biology*, 69(3), pp. 414–418. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.69.3.414>.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A. and Vasson, M.-P. (2003) 'Leptin Regulates Functional Capacities of Polymorphonuclear Neutrophils', *Free Radical Research*, 37(8), pp. 809–814. Available at: <https://doi.org/10.1080/1071576031000097526>.
- Cañadas-Lozano, D. *et al.* (2019) 'Blockade of the NLRP3 inflammasome improves health and lifespan in obese mice', *Journal of the American Aging Association*, 42. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00151-6>.
- Canello, R. *et al.* (1998) 'Leptin and UCP1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue', *Endocrinology*, 139(11), pp. 4747–4750. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.139.11.6434>.
- Canello, R. and Clément, K. (2006) 'Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue', *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 113(10), pp. 1141–1147. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x>.
- Cani, P.D. *et al.* (2007) 'Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance', *Diabetes*, 56(7), pp. 1761–1772. Available at: <https://doi.org/10.2337/db06-1491>.
- Cao, D. *et al.* (2016) 'CD36 regulates lipopolysaccharide-induced signaling pathways and mediates the internalization of Escherichia coli in cooperation with TLR4 in goat mammary gland epithelial cells', *Scientific Reports*, 6(1), p. 23132. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep23132>.
- Capurso, C. and Capurso, A. (2012) 'From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids', *Vascular Pharmacology*, 57(2–4), pp. 91–97. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.05.003>.
- Carneiro, C. *et al.* (2019) 'All about portal vein: a pictorial display to anatomy, variants and physiopathology', *Insights into Imaging*, 10(1), p. 38. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0716-8>.

- Castoldi, A. *et al.* (2016) 'The Macrophage Switch in Obesity Development', *Frontiers in Immunology*, 6, p. 637. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637>.
- Cerf, M. (2013) 'Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance', *Frontiers in Endocrinology*, 4. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00037> (Accessed: 23 May 2022).
- Chen, K.Y. *et al.* (2020) 'Opportunities and challenges in the therapeutic activation of human energy expenditure and thermogenesis to manage obesity', *The Journal of Biological Chemistry*, 295(7), pp. 1926–1942. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007363>.
- Chen, X. *et al.* (2016) 'High-Fat Diet Induces Distinct Metabolic Response in Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Knockout Mice', *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 36(10), pp. 580–588. Available at: <https://doi.org/10.1089/jir.2016.0022>.
- Cho, C.-H. *et al.* (2007) 'Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue', *Circulation Research*, 100(4), pp. e47-57. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000259564.92792.93>.
- Cho, K.W. *et al.* (2016) 'Adipose Tissue Dendritic Cells Are Independent Contributors to Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance', *The Journal of Immunology*, 197(9), pp. 3650–3661. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600820>.
- Chughtai Haroon L. *et al.* (2010) 'Renal Sinus Fat and Poor Blood Pressure Control in Middle-Aged and Elderly Individuals at Risk for Cardiovascular Events', *Hypertension*, 56(5), pp. 901–906. Available at: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.157370>.
- Cinti, S. *et al.* (2005) 'Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans', *Journal of Lipid Research*, 46(11), pp. 2347–2355. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>.
- Cinti, S. (2006) 'The role of brown adipose tissue in human obesity', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(8), pp. 569–574. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.07.009>.
- Clément, K. *et al.* (1998) 'A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction', *Nature*, 392(6674), pp. 398–401. Available at: <https://doi.org/10.1038/32911>.
- Coll, A.P., Farooqi, I.S. and O'Rahilly, S. (2007) 'The Hormonal Control of Food Intake', *Cell*, 129(2), pp. 251–262. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.001>.
- Combs, T.P. *et al.* (2001) 'Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30', *The Journal of Clinical Investigation*, 108(12), pp. 1875–1881. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI14120>.
- Cone, R.D. (2005) 'Anatomy and regulation of the central melanocortin system', *Nature Neuroscience*, 8(5), pp. 571–578. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn1455>.
- Considine, R.V. *et al.* (1996) 'Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans', *New England Journal of Medicine*, 334(5), pp. 292–295. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>.

Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes - PubMed (no date). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10799849/> (Accessed: 17 August 2022).

Dalmas, E., Clément, K. and Guerre-Millo, M. (2011) 'Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue', *Trends in Immunology*, 32(7), pp. 307–314. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.008>.

Daws, M.R. *et al.* (2001) 'Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family', *European Journal of Immunology*, 31(3), pp. 783–791. Available at: [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200103\)31:3<783::AID-IMMU783>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200103)31:3<783::AID-IMMU783>3.0.CO;2-U).

DeFuria, J. *et al.* (2013) 'B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), pp. 5133–5138. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1215840110>.

Derive, M., Boufenzler, A. and Gibot, S. (2014) 'Attenuation of responses to endotoxin by the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 inhibitor LR12 in nonhuman primate', *Anesthesiology*, 120(4), pp. 935–942. Available at: <https://doi.org/10.1097/ALN.000000000000078>.

Diraison, F. *et al.* (2003) 'Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans', *Journal of Lipid Research*, 44(4), pp. 846–853. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M200461-JLR200>.

Divella, R. *et al.* (2016) 'Obesity and cancer: The role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation', *Journal of Cancer*, 7, pp. 2346–2359. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.16884>.

Eckburg, P.B. *et al.* (2005) 'Diversity of the human intestinal microbial flora', *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), pp. 1635–1638. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1110591>.

Elgazar-Carmon, V. *et al.* (2008) 'Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding', *Journal of Lipid Research*, 49(9), pp. 1894–1903. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M800132-JLR200>.

Engeli, S. *et al.* (2004) 'Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue', *Journal of Lipid Research*, 45(9), pp. 1640–1648. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M300322-JLR200>.

Erridge, C. and Samani, N.J. (2009) 'Saturated Fatty Acids Do Not Directly Stimulate Toll-Like Receptor Signaling', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(11), pp. 1944–1949. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.194050>.

Fantuzzi, G. (2013) 'Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases', *Cytokine*, 64(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.06.317>.

Farmer, S.R. (2006) 'Transcriptional control of adipocyte formation', *Cell Metabolism*, 4(4), pp. 263–273. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.001>.

- Farooqi, I.S. *et al.* (2002) 'Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency', *Journal of Clinical Investigation*, 110(8), pp. 1093–1103. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI0215693>.
- Ferrante, A.W. (2013) 'The Immune Cells in Adipose Tissue', *Diabetes, obesity & metabolism*, 15(0 3), pp. 34–38. Available at: <https://doi.org/10.1111/dom.12154>.
- Ferreira, I. *et al.* (2004) 'Central fat mass versus peripheral fat and lean mass: opposite (adverse versus favorable) associations with arterial stiffness? The Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), pp. 2632–2639. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031619>.
- Feuerer, M. *et al.* (2009) 'Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters', *Nature Medicine*, 15(8), pp. 930–939. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.2002>.
- Foster, M.T. *et al.* (2011) 'Transplantation of non-visceral fat to the visceral cavity improves glucose tolerance in mice: investigation of hepatic lipids and insulin sensitivity', *Diabetologia*, 54(11), pp. 2890–2899. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2259-5>.
- Fox, C.S. *et al.* (2012) 'Genome-Wide Association for Abdominal Subcutaneous and Visceral Adipose Reveals a Novel Locus for Visceral Fat in Women', *PLOS Genetics*, 8(5), p. e1002695. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002695>.
- Franczyk, M.P., He, M. and Yoshino, J. (2021) 'Removal of Epididymal Visceral Adipose Tissue Prevents Obesity-Induced Multi-organ Insulin Resistance in Male Mice', *Journal of the Endocrine Society*, 5(bvab024). Available at: <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab024>.
- Fredrikson, G., Tornqvist, H. and Belfrage, P. (1986) 'Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 876(2), pp. 288–293. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90286-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90286-9).
- Frohlich, E.D. *et al.* (1992) 'The heart in hypertension', *The New England Journal of Medicine*, 327(14), pp. 998–1008. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM199210013271406>.
- Fu, L. *et al.* (2017) 'Identification of Extracellular Actin As a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Signaling', *Frontiers in Immunology*, 8, p. 917. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00917>.
- Fujisaka, S. *et al.* (2009) 'Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice', *Diabetes*, 58(11), pp. 2574–2582. Available at: <https://doi.org/10.2337/db08-1475>.
- Gaggini, M., Saponaro, C. and Gastaldelli, A. (2015) 'Not all fats are created equal: adipose vs. ectopic fat, implication in cardiometabolic diseases', *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 22(1). Available at: <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0006>.
- Garcia, R., Roemmich, J. and Claycombe, K. (2016) 'Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse', *Nutrition & Metabolism*, 13. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0081-2>.

- Garg, A. (2004) 'Acquired and inherited lipodystrophies', *The New England Journal of Medicine*, 350(12), pp. 1220–1234. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra025261>.
- Gariballa, S. *et al.* (2019) 'Total adiponectin in overweight and obese subjects and its response to visceral fat loss', *BMC endocrine disorders*, 19(1), p. 55. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0386-z>.
- Gepts, W., Christophe, J. and Mayer, J. (1960) 'Pancreatic islets in mice with the obese-hyperglycemic syndrome: lack of effect of carbutamide', *Diabetes*, 9, pp. 63–69. Available at: <https://doi.org/10.2337/diab.9.1.63>.
- Gerhard, G.S. *et al.* (2014) 'Gene expression profiling in subcutaneous, visceral and epigastric adipose tissues of patients with extreme obesity', *International Journal of Obesity*, 38(3), pp. 371–378. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.152>.
- Gesta, S. *et al.* (2006) 'Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), pp. 6676–6681. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0601752103>.
- Gesta, S. and Kahn, C.R. (2017) 'White Adipose Tissue', in M.E. Symonds (ed.) *Adipose Tissue Biology*. Cham: Springer International Publishing, pp. 149–199. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-52031-5_5.
- Gibot, S. *et al.* (2004) 'A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis', *The Journal of Experimental Medicine*, 200(11), pp. 1419–1426. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20040708>.
- Gibot, S. *et al.* (2005) 'Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock', *Intensive Care Medicine*, 31(4), pp. 594–597. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00134-005-2572-x>.
- Gibot, S. *et al.* (2012) 'Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(1), pp. 65–71. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0037OC>.
- Godoy-Matos, A.F., Silva Júnior, W.S. and Valerio, C.M. (2020) 'NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes', *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 12(1), p. 60. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00570-y>.
- Haemmerle, G. *et al.* (2002) 'Hormone-sensitive Lipase Deficiency in Mice Causes Diglyceride Accumulation in Adipose Tissue, Muscle, and Testis *', *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp. 4806–4815. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110355200>.
- Halaas, J.L. *et al.* (1995) 'Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene', *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223), pp. 543–546. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.7624777>.
- Hall, K.D. *et al.* (2011) 'Quantification of the effect of energy imbalance on bodyweight', *Lancet (London, England)*, 378(9793), pp. 826–837. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60812-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60812-X).
- Harman-Boehm, I. *et al.* (2007) 'Macrophage Infiltration into Omental Versus Subcutaneous Fat across Different Populations: Effect of Regional Adiposity and the Comorbidities of

Obesity', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(6), pp. 2240–2247. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1811>.

Harris, R.B.S. (2014) 'Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), pp. 414–423. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.009>.

Heiss, C.N. and Olofsson, L.E. (2018) 'Gut Microbiota-Dependent Modulation of Energy Metabolism', *Journal of Innate Immunity*, 10(3), pp. 163–171. Available at: <https://doi.org/10.1159/000481519>.

Hellwig-Bürgel, T. *et al.* (2005) 'Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions', *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 25(6), pp. 297–310. Available at: <https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.297>.

Heni, M. *et al.* (2010) 'Pancreatic fat is negatively associated with insulin secretion in individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance: a nuclear magnetic resonance study', *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 26(3), pp. 200–205. Available at: <https://doi.org/10.1002/dmrr.1073>.

Hill, A.A. *et al.* (2015) 'Activation of NF- κ B drives the enhanced survival of adipose tissue macrophages in an obesogenic environment', *Molecular Metabolism*, 4(10), pp. 665–677. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.07.005>.

Himms-Hagen, J. *et al.* (2000) 'Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 279(3), pp. C670–681. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.3.C670>.

Hofmann, C. *et al.* (1994) 'Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance', *Endocrinology*, 134(1), pp. 264–270. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.134.1.8275942>.

Hotamisligil, G.S. *et al.* (1995) 'Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance', *The Journal of Clinical Investigation*, 95(5), pp. 2409–2415. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI117936>.

Hotamisligil, G.S. *et al.* (1996) 'IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance', *Science (New York, N.Y.)*, 271(5249), pp. 665–668. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.271.5249.665>.

Hotamisligil, G.S. (2000) 'Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte', *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24 Suppl 4, pp. S23–27. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801497>.

Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. (1993) 'Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance', *Science (New York, N.Y.)*, 259(5091), pp. 87–91. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.7678183>.

Howard, J.K. *et al.* (1999) 'Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in *ob/ob* mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 104(8), pp. 1051–1059. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI6762>.

- Hsiao, W.-Y. and Guertin, D.A. (2019) 'De Novo Lipogenesis as a Source of Second Messengers in Adipocytes', *Current Diabetes Reports*, 19(11), p. 138. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1264-9>.
- Huang, S. *et al.* (2012) 'Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways', *Journal of Lipid Research*, 53(9), pp. 2002–2013. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.D029546>.
- Ikeda, K., Maretich, P. and Kajimura, S. (2018) 'The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 29(3), pp. 191–200. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.01.001>.
- Jiang, N. *et al.* (2019) 'Cytokines and inflammation in adipogenesis: an updated review', *Frontiers of Medicine*, 13(3), pp. 314–329. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0625-0>.
- Jiao, P. *et al.* (2009) 'Obesity-Related Upregulation of Monocyte Chemotactic Factors in Adipocytes: Involvement of Nuclear Factor- κ B and c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathways', *Diabetes*, 58(1), pp. 104–115. Available at: <https://doi.org/10.2337/db07-1344>.
- Jimenez, M. *et al.* (2003) 'Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat', *European Journal of Biochemistry*, 270(4), pp. 699–705. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03422.x>.
- Jo, J. *et al.* (2009) 'Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth', *PLOS Computational Biology*, 5(3), p. e1000324. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000324>.
- Jolly, L. *et al.* (2017) 'Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: a new player in platelet aggregation', *Thrombosis and Haemostasis*, 117(9), pp. 1772–1781. Available at: <https://doi.org/10.1160/TH17-03-0156>.
- Jolly, L. *et al.* (2018) 'Targeted endothelial gene deletion of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 protects mice during septic shock', *Cardiovascular Research*, 114(6), pp. 907–918. Available at: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy018>.
- Jolly, L. *et al.* (2021) 'sTREM-1 is a specific biomarker of TREM-1 pathway activation', *Cellular & Molecular Immunology*, 18(8), pp. 2054–2056. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00733-5>.
- Jung, S.M., Sanchez-Gurmaches, J. and Guertin, D.A. (2019) 'Brown Adipose Tissue Development and Metabolism', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 251, pp. 3–36. Available at: https://doi.org/10.1007/164_2018_168.
- Kanda, H. *et al.* (2006) 'MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity', *The Journal of Clinical Investigation*, 116(6), pp. 1494–1505. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI26498>.
- Kanety, H. *et al.* (1995) 'Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(40), pp. 23780–23784. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.40.23780>.

- Karelis, A.D. *et al.* (2005) 'The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(7), pp. 4145–4150. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0482>.
- Katsiki, N., Mikhailidis, D.P. and Banach, M. (2018) 'Leptin, cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus', *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), pp. 1176–1188. Available at: <https://doi.org/10.1038/aps.2018.40>.
- Kawai, T., Autieri, M.V. and Scalia, R. (2021a) 'Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 320(3), pp. C375–C391. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>.
- Kawai, T., Autieri, M.V. and Scalia, R. (2021b) 'Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 320(3), pp. C375–C391. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>.
- Khan, T. *et al.* (2009) 'Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI', *Molecular and Cellular Biology*, 29(6), pp. 1575–1591. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.01300-08>.
- Klein, S. *et al.* (2004) 'Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease', *The New England Journal of Medicine*, 350(25), pp. 2549–2557. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa033179>.
- Klesney-Tait, J., Turnbull, I.R. and Colonna, M. (2006) 'The TREM receptor family and signal integration', *Nature Immunology*, 7(12), pp. 1266–1273. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1411>.
- Korbecki, J. and Bajdak-Rusinek, K. (2019) 'The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms', *Inflammation Research*, 68(11), pp. 915–932. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01273-5>.
- Kosteli, A. *et al.* (2010) 'Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue', *The Journal of Clinical Investigation*, 120(10), pp. 3466–3479. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI42845>.
- Lair, B. *et al.* (2020) 'Novel Insights and Mechanisms of Lipotoxicity-Driven Insulin Resistance', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), p. 6358. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21176358>.
- Lätt, E., Mäestu, J. and Jürimäe, J. (2018) 'Longitudinal associations of android and gynoid fat mass on cardiovascular disease risk factors in normal weight and overweight boys during puberty', *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council*, 30(5), p. e23171. Available at: <https://doi.org/10.1002/ajhb.23171>.
- Lee, J.Y. *et al.* (2003) 'Reciprocal Modulation of Toll-like Receptor-4 Signaling Pathways Involving MyD88 and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT by Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids', *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), pp. 37041–37051. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M305213200>.
- Lemos, T. and Gallagher, D. (2017) 'Current body composition measurement techniques', *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 24(5), pp. 310–314. Available at: <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000360>.

- Ley, R.E. *et al.* (2006) 'Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity', *Nature*, 444(7122), pp. 1022–1023. Available at: <https://doi.org/10.1038/4441022a>.
- Li, H. *et al.* (2017) 'Expression and Purification of a Functional Porcine Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1', *Animal Biotechnology*, 28(4), pp. 237–241. Available at: <https://doi.org/10.1080/10495398.2016.1267016>.
- Lindström, P. (2007) 'The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [*ob/ob* Mice]', *The Scientific World JOURNAL*, 7, pp. 666–685. Available at: <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.117>.
- Loffreda, S. *et al.* (no date) 'Leptin regulates proinflammatory immune responses', *The FASEB Journal*, p. 9.
- Lolmède, K. *et al.* (2003) 'Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes', *International Journal of Obesity*, 27(10), pp. 1187–1195. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802407>.
- Loos, R.J.F. and Yeo, G.S.H. (2022) 'The genetics of obesity: from discovery to biology', *Nature Reviews Genetics*, 23(2), pp. 120–133. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00414-z>.
- Lord, G.M. *et al.* (1998) 'Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression', *Nature*, 394(6696), pp. 897–901. Available at: <https://doi.org/10.1038/29795>.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L. and Saltiel, A.R. (2007a) 'Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization', *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), pp. 175–184. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI29881>.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L. and Saltiel, A.R. (2007b) 'Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization', *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), pp. 175–184. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI29881>.
- Luo, L. and Liu, M. (2016) 'Adipose tissue in control of metabolism', *Journal of Endocrinology*, 231(3), pp. R77–R99. Available at: <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>.
- Madani, S. *et al.* (2006) 'Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes', *Cardiovascular Research*, 69(3), pp. 716–725. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.11.022>.
- Mandard, S. *et al.* (2006) 'The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(2), pp. 934–944. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M506519200>.
- Manolopoulos, K.N., Karpe, F. and Frayn, K.N. (2010) 'Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health', *International Journal of Obesity*, 34(6), pp. 949–959. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.286>.
- Martín-Romero, C. *et al.* (2000) 'Human Leptin Enhances Activation and Proliferation of Human Circulating T Lymphocytes', *Cellular Immunology*, 199(1), pp. 15–24. Available at: <https://doi.org/10.1006/cimm.1999.1594>.

- Matesanz-Isabel, J. *et al.* (2011) 'New B-cell CD molecules', *Immunology Letters*, 134(2), pp. 104–112. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.09.019>.
- Mattioli, B. *et al.* (2005) 'Leptin Promotes Differentiation and Survival of Human Dendritic Cells and Licenses Them for Th1 Priming', *The Journal of Immunology*, 174(11), pp. 6820–6828. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6820>.
- McGavock, J.M. *et al.* (2006) 'Adiposity of the heart, revisited', *Annals of Internal Medicine*, 144(7), pp. 517–524. Available at: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-7-200604040-00011>.
- Membrez, M. *et al.* (2008a) 'Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(7), pp. 2416–2426. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.07-102723>.
- Membrez, M. *et al.* (2008b) 'Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice', *The FASEB Journal*, 22(7), pp. 2416–2426. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.07-102723>.
- Min, S.Y. *et al.* (2016) 'Human "brite/beige" adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice', *Nature Medicine*, 22(3), pp. 312–318. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4031>.
- Mittal, R. *et al.* (2017) 'Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut–Brain Axis', *Journal of Cellular Physiology*, 232(9), pp. 2359–2372. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.25518>.
- Moller, D.E. (2000) 'Potential Role of TNF- α in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes', 11(6), p. 6.
- Montague, C.T. *et al.* (1997) 'Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans', *Nature*, 387(6636), pp. 903–908. Available at: <https://doi.org/10.1038/43185>.
- Mozaffarian, D. *et al.* (2011) 'Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men', *The New England Journal of Medicine*, 364(25), pp. 2392–2404. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1014296>.
- Mueckler, M. *et al.* (1994) 'A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(27), pp. 17765–17767.
- Murano, I. *et al.* (2008) 'Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice', *Journal of Lipid Research*, 49(7), pp. 1562–1568. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M800019-JLR200>.
- Naukkarinen, J. *et al.* (2014) 'Characterising metabolically healthy obesity in weight-discordant monozygotic twins', *Diabetologia*, 57(1), pp. 167–176. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3066-y>.

- Nawaz, A. *et al.* (2017) 'CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors', *Nature Communications*, 8(1), p. 286. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00231-1>.
- Nedergaard, J. and Cannon, B. (2010) 'The Changed Metabolic World with Human Brown Adipose Tissue: Therapeutic Visions', *Cell Metabolism*, 11(4), pp. 268–272. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.007>.
- Nguyen, K.D. *et al.* (2011) 'Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis', *Nature*, 480(7375), pp. 104–108. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature10653>.
- Nielsen, S. *et al.* (2004) 'Splanchnic lipolysis in human obesity', *Journal of Clinical Investigation*, 113(11), pp. 1582–1588. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI21047>.
- Nielsen, T.S. *et al.* (2014) 'Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease', *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(3), pp. R199–R222. Available at: <https://doi.org/10.1530/JME-13-0277>.
- Nishimura, S. *et al.* (2009) 'CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity', *Nature Medicine*, 15(8), pp. 914–920. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.1964>.
- Nuttall, F.Q. (2015) 'Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review', *Nutrition Today*, 50(3), pp. 117–128. Available at: <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000092>.
- Obregon, M.-J. (2014) 'Adipose tissues and thyroid hormones', *Frontiers in Physiology*, 5. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00479>.
- Okura, T. *et al.* (2004) 'Regional body composition changes exhibit opposing effects on coronary heart disease risk factors', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(5), pp. 923–929. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000125702.26272.f6>.
- Palazzo, S.J., Simpson, T. and Schnapp, L.M. (2012) 'Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells Type 1 as a Potential Therapeutic Target in Sepsis', *Dimensions of critical care nursing : DCCN*, 31(1), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1097/DCC.0b013e31823a5298>.
- Pelleymounter, M.A. *et al.* (1995) 'Effects of the obese Gene Product on Body Weight Regulation in ob/ob Mice', *Science*, 269(5223), pp. 540–543. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.7624776>.
- Pilling, D., Karhadkar, T.R. and Gomer, R.H. (2021) 'High-Fat Diet–Induced Adipose Tissue and Liver Inflammation and Steatosis in Mice Are Reduced by Inhibiting Sialidases', *The American Journal of Pathology*, 191(1), pp. 131–143. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.09.011>.
- Poggi, M. *et al.* (2007) 'C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet', *Diabetologia*, 50(6), pp. 1267–1276. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0654-8>.
- Porter, S.A. *et al.* (2009) 'Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: A Protective Fat Depot?', *Diabetes Care*, 32(6), pp. 1068–1075. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc08-2280>.

- Rabinowitz, D. and Zierler, K.L. (1962) 'FOREARM METABOLISM IN OBESITY AND ITS RESPONSE TO INTRA-ARTERIAL INSULIN. CHARACTERIZATION OF INSULIN RESISTANCE AND EVIDENCE FOR ADAPTIVE HYPERINSULINISM', *The Journal of Clinical Investigation*, 41(12), pp. 2173–2181. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI104676>.
- Radsak, M.P. *et al.* (2004) 'Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(8), pp. 4956–4963. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.4956>.
- Read, C.B. *et al.* (2015) 'Cutting Edge: identification of neutrophil PGLYRP1 as a ligand for TREM-1', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 194(4), pp. 1417–1421. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402303>.
- Reilly, J.J. *et al.* (2005) 'Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study', *BMJ*, 330(7504), p. 1357. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.38470.670903.E0>.
- Reverchon, M. *et al.* (2014) *Adipokines and the Female Reproductive Tract*, *International Journal of Endocrinology*. Hindawi. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/232454>.
- Rhodes, C.J. *et al.* (2013) 'Direct Autocrine Action of Insulin on β -Cells: Does It Make Physiological Sense?', *Diabetes*, 62(7), pp. 2157–2163. Available at: <https://doi.org/10.2337/db13-0246>.
- Rigo, I. *et al.* (2012) 'Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)₂ vitamin D₃', *Innate Immunity*, 18(2), pp. 250–257. Available at: <https://doi.org/10.1177/1753425911399796>.
- Robblee, M.M. *et al.* (2016) 'Saturated Fatty Acids Engage an IRE1 α -Dependent Pathway to Activate the NLRP3 Inflammasome in Myeloid Cells', *Cell Reports*, 14(11), pp. 2611–2623. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.053>.
- Roe, K., Gibot, S. and Verma, S. (2014) 'Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1): a new player in antiviral immunity?', *Frontiers in Microbiology*, 5, p. 627. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00627>.
- Rosenwald, M. *et al.* (2013) 'Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes', *Nature Cell Biology*, 15(6), pp. 659–667. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb2740>.
- Ruan, H. *et al.* (2002) 'Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory', *Diabetes*, 51(5), pp. 1319–1336. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1319>.
- Rugivarodom, M. *et al.* (2022) 'Fatty Pancreas: Linking Pancreas Pathophysiology to Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 0(000), pp. 0–0. Available at: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2022.00085>.
- Russo, L. and Lumeng, C.N. (2018) 'Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity', *Immunology*, 155(4), pp. 407–417. Available at: <https://doi.org/10.1111/imm.13002>.
- Rutkowski, J.M., Stern, J.H. and Scherer, P.E. (2015) 'The cell biology of fat expansion', *Journal of Cell Biology*, 208(5), pp. 501–512. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201409063>.

- Rytka, J.M. *et al.* (2011) 'The Portal Theory Supported by Venous Drainage–Selective Fat Transplantation', *Diabetes*, 60(1), pp. 56–63. Available at: <https://doi.org/10.2337/db10-0697>.
- Sabaratnam, R. and Svehningsen, P. (2021) 'Adipocyte-Endothelium Crosstalk in Obesity', *Frontiers in Endocrinology*, 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.681290> (Accessed: 18 August 2022).
- Samaras, K. *et al.* (1999) 'Genetic and Environmental Influences on Total-Body and Central Abdominal Fat: The Effect of Physical Activity in Female Twins', *Annals of Internal Medicine*, 130(11), pp. 873–882. Available at: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-130-11-199906010-00002>.
- Santoleri, D. and Titchenell, P.M. (2019) 'Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(2), pp. 447–456. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.016>.
- Santos-Alvarez, J., Goberna, R. and Sánchez-Margalet, V. (1999) 'Human Leptin Stimulates Proliferation and Activation of Human Circulating Monocytes', *Cellular Immunology*, 194(1), pp. 6–11. Available at: <https://doi.org/10.1006/cimm.1999.1490>.
- Saponaro, C., Gaggini, M. and Gastaldelli, A. (2015) 'Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes: Common Pathophysiologic Mechanisms', *Current Diabetes Reports*, 15(6), p. 34. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0607-4>.
- Saxton, R.A. and Sabatini, D.M. (2017) 'mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease', *Cell*, 168(6), pp. 960–976. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>.
- Scherer, P.E. *et al.* (1995) 'A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45), pp. 26746–26749. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26746>.
- Seo, D.H. *et al.* (2021) 'Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Agonist Regulates Intestinal Inflammation via Cd177+ Neutrophils', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 650864. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.650864>.
- Sethi, J. and Vidal-Puig, A. (2007) 'Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation', *Journal of lipid research*, 48, pp. 1253–62. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.R700005-JLR200>.
- Shao, M. *et al.* (2019) 'Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited', *Diabetes*, 68(10), pp. 1874–1885. Available at: <https://doi.org/10.2337/db19-0308>.
- Sharma, V.M. and Puri, V. (2016) 'Mechanism of TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes uncovered', *Obesity*, 24(5), pp. 990–990. Available at: <https://doi.org/10.1002/oby.21492>.
- Shrestha, C. *et al.* (2013) 'Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: A possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(4), pp. 573–578. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.117>.

- Sigalov, A.B. (2014) 'A novel ligand-independent peptide inhibitor of TREM-1 suppresses tumor growth in human lung cancer xenografts and prolongs survival of mice with lipopolysaccharide-induced septic shock', *International Immunopharmacology*, 21(1), pp. 208–219. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.05.001>.
- Silva, K.R. *et al.* (2017) 'Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots', *PLOS ONE*. Edited by Y. Böttcher, 12(3), p. e0174115. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174115>.
- de Simone, G. *et al.* (1994) 'Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults', *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 23(5), pp. 600–606. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.hyp.23.5.600>.
- Singh, A.M. and Dalton, S. (2018) 'What Can "Brown-ing" Do For You?', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(5), pp. 349–359. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.03.002>.
- Skurk, T. *et al.* (2007) 'Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(3), pp. 1023–1033. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1055>.
- Snijder, M.B. *et al.* (2004) 'Regional body composition as a determinant of arterial stiffness in the elderly: The Hoorn Study', *Journal of Hypertension*, 22(12), pp. 2339–2347. Available at: <https://doi.org/10.1097/00004872-200412000-00016>.
- Sokmen, A. *et al.* (2013) 'The Impact of Isolated Obesity on Right Ventricular Function in Young Adults', *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 101(2), pp. 160–168. Available at: <https://doi.org/10.5935/abc.20130142>.
- Song, Z., Xiaoli, A.M. and Yang, F. (2018) 'Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues', *Nutrients*, 10(10), p. E1383. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu10101383>.
- Spalding, K.L. *et al.* (2008) 'Dynamics of fat cell turnover in humans', *Nature*, 453(7196), pp. 783–787. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature06902>.
- Spencer, M. *et al.* (2011) 'Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(12), pp. E1990–1998. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1567>.
- Stefanovic-Racic, M. *et al.* (2012) 'Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver', *Diabetes*, 61(9), pp. 2330–2339. Available at: <https://doi.org/10.2337/db11-1523>.
- Stevens, V.J. *et al.* (2001) 'Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II', *Annals of Internal Medicine*, 134(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-1-200101020-00007>.
- Stijn, C.M.W. van *et al.* (2015) 'Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response', *The FASEB Journal*, 29(2), pp. 636–649. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.14-253831>.

- Stunkard, A.J. *et al.* (1986) 'An Adoption Study of Human Obesity', *New England Journal of Medicine*, 314(4), pp. 193–198. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM198601233140401>.
- Subramanian, S. *et al.* (2017) 'Increased expression of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in the population with obesity and insulin resistance', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 25(3), pp. 527–538. Available at: <https://doi.org/10.1002/oby.21714>.
- Subramanian, V. and Ferrante, A.W. (2009) 'Obesity, inflammation, and macrophages', *Nestle Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme*, 63, pp. 151–159; discussion 159-162, 259–268. Available at: <https://doi.org/10.1159/000209979>.
- Sun, K., Kusminski, C.M. and Scherer, P.E. (2011) 'Adipose tissue remodeling and obesity', *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), pp. 2094–2101. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI45887>.
- Talukdar, S. *et al.* (2012) 'Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase', *Nature Medicine*, 18(9), pp. 1407–1412. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.2885>.
- Tammaro, A. *et al.* (2017) 'TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives', *Pharmacology & Therapeutics*, 177, pp. 81–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.043>.
- Tchernof, A. and Després, J.-P. (2013) 'Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update', *Physiological Reviews*, 93(1), pp. 359–404. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2011>.
- Tchkonia, T. *et al.* (2007) 'Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(1), pp. E298–E307. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00202.2006>.
- Tessarz, A.S. and Cerwenka, A. (2008) 'The TREM-1/DAP12 pathway', *Immunology Letters*, 116(2), pp. 111–116. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.11.021>.
- Tian, Z. *et al.* (2002) 'Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(3), pp. 297–302. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02462-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02462-2).
- Tran, T.T. *et al.* (2008) 'Beneficial Effects of Subcutaneous Fat Transplantation on Metabolism', *Cell Metabolism*, 7(5), pp. 410–420. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.004>.
- Trayhurn, P. (1981) 'Fatty acid synthesis in mouse brown adipose tissue. The influence of environmental temperature on the proportion of whole-body fatty acid synthesis in brown adipose tissue and the liver', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 664(3), pp. 549–560. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(81\)90132-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(81)90132-6).
- Turnbaugh, P.J. *et al.* (2006) 'An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest', *Nature*, 444(7122), pp. 1027–1031. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05414>.

- Uusitupa, M. *et al.* (2003) 'Long-term improvement in insulin sensitivity by changing lifestyles of people with impaired glucose tolerance: 4-year results from the Finnish Diabetes Prevention Study', *Diabetes*, 52(10), pp. 2532–2538. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.10.2532>.
- Vázquez, C.M.P. *et al.* (2019) 'Oxidized Low-Density Lipoprotein (Ox-LDL) and Triggering Receptor-Expressed Myeloid Cell (TREM-1) Levels Are Associated with Cardiometabolic Risk in Nonobese, Clinically Healthy, and Young Adults', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, p. 7306867. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/7306867>.
- Vohl, M.-C. *et al.* (2004) 'A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men', *Obesity Research*, 12(8), pp. 1217–1222. Available at: <https://doi.org/10.1038/oby.2004.153>.
- Walker, G.E. *et al.* (2007) 'Deep Subcutaneous Adipose Tissue: A Distinct Abdominal Adipose Depot', *Obesity*, 15(8), pp. 1933–1943. Available at: <https://doi.org/10.1038/oby.2007.231>.
- Wang, B., Wood, I.S. and Trayhurn, P. (2008) 'PCR arrays identify metallothionein-3 as a highly hypoxia-inducible gene in human adipocytes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(1), pp. 88–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.036>.
- Wang, H. and Eckel, R.H. (2009) 'Lipoprotein lipase: from gene to obesity', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(2), pp. E271–E288. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90920.2008>.
- Watanabe, Y. *et al.* (2019) 'Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation', *The FASEB Journal*, 33(11), pp. 11821–11835. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.201900477RR>.
- Weisberg, S.P. *et al.* (2003) 'Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue', *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), pp. 1796–1808. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI19246>.
- Weisberg, S.P. *et al.* (2006) 'CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding', *The Journal of Clinical Investigation*, 116(1), pp. 115–124. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI24335>.
- Wernstedt Asterholm, I. *et al.* (2014) 'Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling', *Cell Metabolism*, 20(1), pp. 103–118. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.005>.
- Winer, D.A. *et al.* (2011) 'B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies', *Nature Medicine*, 17(5), pp. 610–617. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.2353>.
- Winer, D.A. *et al.* (2016) 'The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance', *Cell Metabolism*, 23(3), pp. 413–426. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.003>.
- Wolk, R., Shamsuzzaman, A.S.M. and Somers, V.K. (2003) 'Obesity, Sleep Apnea, and Hypertension', *Hypertension*, 42(6), pp. 1067–1074. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000101686.98973.A3>.

- Wu, D. *et al.* (2011) 'Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis', *Science*, 332(6026), pp. 243–247. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1201475>.
- Wu, J.J. *et al.* (2012) 'The Proinflammatory Myeloid Cell Receptor TREM-1 Controls Kupffer Cell Activation and Development of Hepatocellular Carcinoma', *Cancer research*, 72, pp. 3977–86. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0938>.
- Xu, H. *et al.* (2003) 'Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance', *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), pp. 1821–1830. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI19451>.
- Xu, L., Nagata, N., and Ota (2019) 'Impact of Glucoraphanin-Mediated Activation of Nrf2 on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease with a Focus on Mitochondrial Dysfunction', *International Journal of Molecular Sciences*, 20, p. 5920. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20235920>.
- Xu, X. *et al.* (2013) 'Obesity Activates a Program of Lysosomal-Dependent Lipid Metabolism in Adipose Tissue Macrophages Independently of Classic Activation', *Cell Metabolism*, 18(6), pp. 816–830. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.001>.
- Yamauchi, T. *et al.* (2002) 'Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase', *Nature Medicine*, 8(11), pp. 1288–1295. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm788>.
- Yang, H. *et al.* (2010) 'Obesity Increases the Production of Proinflammatory Mediators from Adipose Tissue T Cells and Compromises TCR Repertoire Diversity: Implications for Systemic Inflammation and Insulin Resistance', *The Journal of Immunology*, 185(3), pp. 1836–1845. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000021>.
- Yao, L. *et al.* (2017) 'Cold-Inducible SIRT6 Regulates Thermogenesis of Brown and Beige Fat', *Cell Reports*, 20(3), pp. 641–654. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.069>.
- Ye, J. *et al.* (2007) 'Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice', *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 293(4), pp. E1118–1128. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00435.2007>.
- Ye, J. and Gimble, J.M. (2011) 'Regulation of Stem Cell Differentiation in Adipose Tissue by Chronic Inflammation', *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 38(12), pp. 872–878. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05596.x>.
- Yuan, Z. *et al.* (2014) 'Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1)-mediated Bcl-2 induction prolongs macrophage survival', *The Journal of Biological Chemistry*, 289(21), pp. 15118–15129. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.536490>.
- Zeng, X. *et al.* (2022) 'Artemisia sphaerocephala Krasch polysaccharide promotes adipose thermogenesis and decreases obesity by shaping the gut microbiota', *Food & Function*, 13(20), pp. 10651–10664. Available at: <https://doi.org/10.1039/d2fo02257e>.
- Zhang, F. *et al.* (2018) 'An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents', *Cell Metabolism*, 27(1), pp. 252–262.e3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.004>.

- Zhang, Y. *et al.* (1994) 'Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue', *Nature*, 372(6505), pp. 425–432. Available at: <https://doi.org/10.1038/372425a0>.
- Zhang, Yiyi *et al.* (1994) 'Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue', *Nature*, 372(6505), pp. 425–432. Available at: <https://doi.org/10.1038/372425a0>.
- Zhang, Y. and Chua, S. (2017) 'Leptin Function and Regulation', *Comprehensive Physiology*, 8(1), pp. 351–369. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c160041>.
- Zhao, L. *et al.* (2015) 'Globular adiponectin ameliorates metabolic insulin resistance via AMPK-mediated restoration of microvascular insulin responses', *The Journal of Physiology*, 593(17), pp. 4067–4079. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP270371>.
- Zhou, H., Urso, C.J. and Jadeja, V. (2020) 'Saturated Fatty Acids in Obesity-Associated Inflammation', *Journal of Inflammation Research*, Volume 13, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.2147/JIR.S229691>.
- Ziccardi, P. *et al.* (2002) 'Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year', *Circulation*, 105(7), pp. 804–809. Available at: <https://doi.org/10.1161/hc0702.104279>.
- Zimmermann, R. *et al.* (2004) 'Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase', *Science*, 306(5700), pp. 1383–1386. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1100747>.
- Zlotnikov-Klionsky, Y. *et al.* (2015) 'Perforin-Positive Dendritic Cells Exhibit an Immunoregulatory Role in Metabolic Syndrome and Autoimmunity', *Immunity*, 43(4), pp. 776–787. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.015>.

Annexes

Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 deletion in mice attenuates high-fat diet-induced obesity

Benjamin Brustolin^{1*}, Nina Touly¹, Marine Maillefer², Lola Parisot², Elisa Di Pillo¹, Marc Derive², Sébastien Gibot^{1,3}

¹ Inserm UMR_S1116, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Inotrem SA, Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpital Central, Nancy, France

* Correspondence:

Benjamin Brustolin

benjamin.brustolin@gmail.com

Keywords: Obesity, TREM-1, adipocyte, inflammation, insulin resistance

Abstract

TREM-1 (Triggering Receptor of Expressed on Myeloid Cells-1) is an immunoreceptor mainly expressed by innate immune cells and plays a crucial role in the amplification of the inflammatory process mediated by Toll-Like Receptors engagement. The low-grade inflammation state present in obesity is responsible for the development and perpetuation of obesity-associated comorbidities (Type 2 diabetes, cardiovascular diseases...). Using primary human cells we showed that TREM-1 is expressed and functional in subcutaneous and omental (pre-)adipocytes. *In vivo*, in a mouse model of high-fat diet-induced obesity, we found that *Trem1* deletion limited inflammation, weight gain, and insulin resistance. Our findings suggest that TREM-1 plays a significant role in the development of obesity and insulin resistance and may thus be a novel therapeutic target in this setting.

1. Introduction

Obesity is a complex and heterogeneous disease in which the interplay between adipocytes and adipose tissue macrophages or other surrounding immune cells (CD4, CD8, NKT, mastocytes...) drives the development of a chronic inflammatory state (1). This inflammation is considered to be responsible for insulin resistance that causes or exacerbates obesity-

associated complications such as type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, hypertension, liver, kidney, or heart dysfunction (2). In this context, numerous agents have been tested in pre-clinical models of obesity, from curcumin to inhibitors of Interleukin-1 beta (3,4). However, none of these successfully applied to humans. Indeed, as of today, only 6 anti-obesity medications have been approved by the FDA, all of them promoting weight loss through appetite suppression or decreased fat absorption (5).

The Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) is an immune receptor mostly expressed at the membrane of neutrophils, mature monocytes, and macrophages (6). Following activation of Toll-Like Receptors (TLRs), the expression of TREM-1 is up-regulated and dimerization occurs, allowing the binding of its still unknown ligand that triggers the association of TREM-1 with the adaptor protein DAP-12, leading to intracellular signaling (6-8). The engagement of TREM-1 yields to an amplification of the inflammatory response (6,9). The role of TREM-1 in mounting a dysregulated and deleterious inflammation has been proven in acute diseases or syndromes such as septic shock (9), myocardial infarction (10), or stroke (11), but also in chronic disorders: inflammatory bowel diseases, atherosclerosis, arthritis, lupus, and cancer (12-16).

Vasquez *et al* showed that serum concentrations of the soluble form of TREM-1 (sTREM-1), which is known to be a marker of the TREM-1 pathway activation (17), were elevated in non-obese young healthy adults with cardiometabolic risk factors (abdominal obesity, fasting hyperglycemia, hypertriglyceridemia, high blood pressure) (18).

To get more insights into the role of TREM-1 in obesity, we submitted mice to a high-fat diet and investigated the effects of the genetic *Trem1* deletion on obesity development and its consequences.

2. Material and methods

Cells maintenance, differentiation, and stimulation

Cryopreserved, subcutaneous and omental preadipocytes from male donors with normal body mass index (22.5 +/- 1.5 kg/m²) were purchased from Zen-Bio Inc (Durham, USA). Cells were maintained at 5% CO₂ in preadipocyte DMEM/Ham's F-12 medium from Zen-Bio with 3.15

g/L D-glucose (17.5 mmol/L), HEPES, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B. Cells were seeded into T75 flasks and expanded once before differentiating using accutase (Sigma-Aldrich, France). The medium was replaced every 2 days.

For differentiation, the preadipocyte medium was replaced with DMEM-Ham's F-12 medium supplemented with HEPES, FBS, biotin, pantothenate, human Insulin, dexamethasone, IBMX, PPAR γ agonist, penicillin, streptomycin, and amphotericin B during 7 days. Cells were then fed by removing some of the media and replacing it with fresh adipocyte DMEM/Ham's F-12 medium containing HEPES, FBS, biotin, pantothenate, human insulin, dexamethasone, penicillin, streptomycin and amphotericin B (Zen-Bio, USA). 2 weeks after the initiation of differentiation, cells appear with large lipid droplets and are considered mature adipocytes.

Each *in vitro* experiment was conducted using preadipocytes from at least three individual donors. Human preadipocytes or adipocytes were incubated under resting conditions or with LPS from *Escherichia coli* 0127:B8 at 100 ng/ml (Sigma-Aldrich, France) with or without TREM-1 agonists at 5 μ g/ml (MAB1278, Biotechne, R&D Systems, USA) or IgG control (Biotechne, R&D Systems, USA) at 2, 4, 6 and 24h. Cells supernatants and protein lysates were recovered to perform cytokine and protein assays respectively.

Confocal microscopy

Cells were seeded and differentiated or not on LabTek chambers (Thermo Fisher Scientific, USA). Cells were washed using PBS and tween 20 (0.05%) and fixed with paraformaldehyde (4%) for 20 min and permeabilized with Triton 0.1% for 30 min before incubation with 1/200 anti-TREM-1-AF488 and 1/200 anti-DAP12-AF555 antibodies (Bioss, USA) at 4°C overnight. Nuclei were stained with TO-PRO-3 at 1 μ g/ml (Invitrogen, USA) for 1h at 37°C. After washing, coverslips were mounted using a Vectashield solution (Vector Laboratories, USA). Confocal images were obtained using a Leica SP5 confocal laser-scanning microscope system (Leica, Germany) fitted with appropriated filter sets and acquired in sequential scan mode.

TREM-1 protein analysis

Pre-adipocytes and adipocytes proteins were extracted using RIPA extraction buffer containing (1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate pH 7.2, 2mM EDTA, 50mM sodium fluoride, 0.2 mM orthovanate sodium, 100 U/ml protease inhibitor) (Abcam, U.K). Mouse liver proteins were extracted using PhosphoSafe buffer (Novagen, Merck Biosciences, Nottingham, U.K). Total protein concentration was measured

by Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and used for protein normalization. Lysates were then analyzed by western blot. Electrophoresis was performed with 10 µg of proteins per well using a polyacrylamide Criterion XT Bis-Tris Gel, 4-12%, and XTMES buffer (Bio-Rad, USA). Migration was carried out at 170V, 3A, and 300W for 30 minutes. Then, proteins were transferred on a 0.2 µm nitrocellulose membrane (Transblot Turbo Transfer Pack, Bio-Rad, USA) with a Transblot Turbo system set to 2.5A, 25V for 7 minutes (Bio-Rad, USA). Coomassie blue (Thermo Fisher Scientific, USA) and ponceau (Sigma-Aldrich, France) stains were performed on the membrane and the gel respectively to control the transfer. TREM-1 (Bio-Rad, USA) antibody with its corresponding secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Bio-Rad, USA) and Super-Signal West Femto Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) were used for protein detection. GAPDH antibody (Cell Signalling Technology, USA) was used for normalization on the same membranes after stripping for 20 minutes in stripping buffer (1% tween, 1.5% glycine, and 0.1% SDS, pH 2.2). For mouse liver analysis mouse p-ERK/ERK, p-mTOR/mTOR, p-GSK3αβ/GSK3αβ, Glut1, Glut2, p-AKT/AKT, IRα, IRβ, and GAPDH with their corresponding secondary antibodies were used. The acquisition was performed with LAS-4000 imager (Fujifilm, Japan) and Multi-Gauge software (LifeScience Fujifilm, Japan).

Cytokines measurements

Supernatants from stimulated cells were recovered after 2, 4, 6, and 24h LPS (100 ng/ml) stimulation. MCP-1, IL-6, and IL-8 were assessed by multiplex assay using the ELLA microfluidic system (Ella Automated Immunoassay Systems, R&D Systems, U.K) according to the supplier's recommendation.

Animals

The homozygous knock-out animals were produced at Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France), AALAC-accredited mouse breeder. Mating duos or trios are established for maintaining and producing animals. Animals remain undisturbed during pregnancy; newborns are genotyped by PCR screening on tail biopsies taken at 2 weeks' of age. Colony maintenance is done in compliance with the 3-R guidelines. Animal health and welfare are verified during bedding changes. All experimentations involving animals have been carried out according to the French and European institutional legislation concerning the care and use of laboratory animals and have been approved by the French ethics committee (Number 23273) for animal experimentation. 20 six-week-old male *Trem1* knockout (KO) and 20 C57Bl/6 wild-type

littermate (WT) mice were used. Mice were housed in ventilated racks placed in an EOPS-Type environment maintained at a temperature of 21 +/- 1°C, an humidity of 55% +/- 10%, and exposed to a cycle of 12 hours of light for 12 hours of darkness. The animal had free access to water and food. Four groups were constituted: 10 littermate C57Bl/6 wild-type mice with a standard diet (LFD Low Fat Diet), 10 littermate C57Bl/6 wild-type mice with a high-fat diet (HFD), 10 *Trem1* ko mice with a standard diet, and 10 *Trem1* ko mice with a high-fat diet. High-fat diet was composed of 60.6% of the calories from lipids, 17% from proteins, and 22.5% from carbohydrates (Safe-Lab, France). 10 grams of food per day and per mouse were distributed in the feeders and at the bottom of the cages to facilitate access to food. The food was weighed and extended 3 times per week in to monitor calorie consumption. Mice were weighed weekly to monitor weight gain. The diet started after two weeks of acclimatization, for 12 weeks.

Oral Glucose Tolerance Test

The procedure used to perform glucose tolerance tests is based on the work of Andrikopoulos *et al* (19) taking into account the influence of the glucose administration route, dosage, fasting time, and the influence of anesthesia. The oral glucose tolerance tests were performed following 10 weeks of diet feeding. Mice were fasted for 6 hours before the test and transferred to a procedure room. Blood was obtained by removing the distal 2 mm of the tail and was assessed for baseline glucose levels using the Accutrend® Plus glucometer (Roche, Switzerland). Mice then received 2g/kg body weight of a 100 mg/ml glucose solution in sterile water. 20 µl of blood was collected at each time and glucose concentration was measured at 15, 30, 60, and 120 min after the administration of glucose by oral gavage. Plasma samples were collected and stored at -80°C for measuring insulin levels. Plasma insulin concentrations were determined in the same mice by a commercially available mouse insulin ELISA kit (Merck, Germany).

Real-Time quantitative PCR

Frozen liver, subcutaneous, mesenteric, and perigonadal white adipose tissue were cut into small pieces, kept frozen, and ground in a homogenizer (FastPrep-24, MP biomedical SARL, France) using ceramic balls 1.4 mm in diameter in the presence of Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) to extract total RNA. RNA purification was performed using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Netherlands) according to the manufacturer's instructions and quantified with MicroDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) to determine RNA purity and concentration. Samples were diluted to the same concentration before being reverse transcribed using the

iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA) and quantified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) using Qiagen probes (Quantitect Primers) for murine *Tnfa*, *Il6*, and *Ccl2*. Murine *Gapdh*, *ActinB*, *Rna18S* probes served as housekeeping genes.

Statistical analyses

Unless otherwise stated, data were normally distributed and are presented as mean +/- SEM. The normality of the data distribution was determined by the Shapiro-Wilk test. Between-group differences were tested using Student's t-test or ANOVA or with Mann-Whitney or Kruskal Wallis tests when appropriate. Statistical analysis was performed using Prism Version 8.0.1 software (GraphPad, USA). P-value < 0.05 was deemed significant.

3. Results

TREM-1 is expressed by (pre-) adipocytes and is functional

Although TREM-1 is known to be mostly expressed by myeloid cells, it has been found on the surface of some epithelial and endothelial cells.

Confocal microscopy analysis revealed the presence of TREM-1 along with its adaptive protein DAP-12 in unstimulated subcutaneous and omental pre-adipocytes and adipocytes (**Figure 1a**). We confirmed this finding by Western blot (**Figure 1b**). Moreover, we observed that TREM-1 was more expressed by omental than subcutaneous cells and that lipopolysaccharide (LPS) increased its expression.

To decipher whether TREM-1 was functional, we stimulated cells with LPS along with a TREM-1 agonist antibody (MAB1278, Bio-Techne, clone 193015) or a control IgG and measured IL-8, IL-6, and MCP-1 concentrations in the supernatants (**Figure 2**). LPS stimulation time-dependently increased the concentrations of these proteins. Co-stimulation with MAB1278 potentiated this elevation, more in omental than subcutaneous (pre-) adipocytes following the higher expression of TREM-1 on the former.

Thus, TREM-1 is expressed by (pre-)adipocytes and is functional.

Trem1 deletion limits weight gain in mice fed with a high-fat diet

TREM-1 KO mice and wild-type (WT) littermates were fed with a low (LFD) or high fat diet (HFD) and followed up for 12 weeks. As expected, weight gain was modest in LFD mice, whatever the genotype (**Figure 3a-d**). By contrast, HFD animals became obese but weight gain

was lower in TREM-1 KO than in WT mice (47% +/- 4,11% vs. 60% +/- 3,73%, $p < 0.05$) (**Figure 3 a-d**). Of note, food and calorie intake were similar in TREM-1 KO and WT animals all along the experiment (**Figure 3 e,f**). Subcutaneous, perigonadal, and mesenteric adipose tissue, as well as liver, were less heavy in KO than in WT mice (**Figure 3 g-j**).

Trem-1 genetic ablation reduces weight gain, and adipose tissue and liver enlargement during HFD.

Inflammation is reduced in TREM-1 KO mice

To investigate the inflammatory response induced by HFD, we quantified *Tnfa*, *Il6*, and *Ccl2* mRNA by qRT-PCR in adipose and liver tissues (**Figure 4**). Expression of these genes remained at a low level after an LFD, with no difference between genotypes except for a mild reduction of *Tnfa* in mesenteric adipose tissue from KO mice (**Figure 4g**). By contrast, *Tnfa*, *Il6*, and *Ccl2* mRNA increased in most tissues following HFD. With the noticeable exception of subcutaneous adipose tissue (**Figure 4a-c**), *Trem1* deletion was associated with a decrease in these cytokines expression as compared to WT littermates (**Figure 4d-l**), but importantly, inflammation was not totally abrogated.

Adipose tissue macrophages have an important role in generating or perpetuating inflammation. We, therefore, quantified macrophage infiltration in adipose tissues by qRT-PCR. HFD increased the macrophage population as assessed by higher *Adgre1* gene expression (encoding for the macrophage marker F4/80) in subcutaneous, perigonadal, and mesenteric adipose tissues (**Supplementary Figure 1**). In these tissues, *Itagx* (CD11c) may be considered a marker of type 1 (M1) and *Mrc1* (CD206) a marker for type 2 (M2) macrophages. We observed that HFD mostly induced an increase of M1 macrophages with few effects on M2 (except in perigonadal tissue). This was reduced in TREM-1 KO mice.

Therefore, *Trem1* deletion dampens HFD-induced inflammation in several adipose tissues and the liver.

Trem1 deletion protects against insulin resistance

One of the major consequences of obesity is insulin resistance which may lead to type 2 diabetes and its related complications. We performed an oral glucose tolerance test in LFD and HFD mice. As expected, HFD animals displayed higher blood glucose concentrations than LFD

(**Figure 5a**). However, hyperglycemia was reduced and shortened in TREM-1 KO mice as compared to WT littermates. In parallel, hyperinsulinemia was more pronounced in WT than in TREM-1 KO HFD mice, witnessing the presence of insulin resistance (**Figure 5b**).

To get insights into the mechanisms of insulin resistance, we performed a western blot analysis of crucial proteins involved in this phenomenon (**Figure 5c**). Glucose transporters GLUT1 and insulin receptor (IR- α and IR- β) expression did not differ regarding the genotype. By contrast, activation of mTOR, known to down-regulate insulin signaling (20), was reduced in TREM-1 KO. On another side, glucose transporter GLUT2 and AKT, GSK3, and ERK phosphorylation was increased in TREM-1 KO animals: these pathways have been shown to promote cell survival and growth through their action on insulin-stimulated glucose uptake, glycogen, and protein synthesis (21). These data show that *Trem1* deletion prevents HFD-induced insulin resistance.

As part of the deleterious consequences of obesity, heart dysfunction may occur. We thus evaluated cardiac function at the end of the 12 weeks of HFD. Echocardiography revealed a decrease in left ventricular fractional shortening in HFD WT but not in TREM-1 KO mice (**Supplementary Figure 2**).

4. Discussion

Here we show that TREM-1 is expressed and functional in (pre-) adipocytes and that its genetic ablation confers favorable effects in HFD mice including reduction of weight gain, inflammation, and insulin resistance.

Although TREM-1 was initially considered to be only expressed by myeloid cells (neutrophils, monocytes/macrophages), it has been observed in many other cell types including epithelial or endothelial cells (22, 23). Whatever its cellular localization, TREM-1 activation leads to an amplification of the inflammatory response triggered by the previous engagement of TLRs. The deleterious role of TREM-1 over-activation is established in acute diseases such as septic shock (9) or myocardial infarction (10), as well as during chronic disorders such as atherosclerosis (13).

In 187 young, healthy, non-obese adults, Vasquez *et al* showed that those with several cardiometabolic risk factors (hypertension, hypertriglyceridemia, low HDL, or abdominal obesity) had higher serum concentrations of sTREM-1 (18), a biomarker of the TREM-1 pathway activation (24), and suggested that the follow-up of this marker may alert on the development of a future metabolic syndrome.

In a small population (n=22) of obese patients, Subramanian *et al* observed the presence of TREM-1 in tissue biopsies (liver, omental, and subcutaneous tissues), as well as elevated plasma sTREM-1 concentrations as compared to non-obese control subjects (25). Interestingly, TREM-1 expression was higher in diabetic obese as compared to non-diabetic obese patients, suggesting an association between insulin resistance and TREM-1 activation.

As adipose tissue is made of many different cell types (adipocytes, myeloid cells, stromal cells...), we first confirmed the presence of TREM-1 in pre-, and adipocytes and observed that its expression seems to be higher in omental than in subcutaneous adipose cells. Moreover, TREM-1 expression was upregulated following LPS stimulation in omental (pre-)adipocytes. In line with its role in amplifying the inflammatory response, we observed that TREM-1 activation increased the production of some cytokines and chemokines by adipose cells, especially the omental ones.

Having demonstrated the expression and functionality of TREM-1 in adipose cells, we moved to the classical diet-induced obesity model in mice. Although the difference is not statistically significant, the body weight of TREM-1 KO mice is slightly lower than wild mice of the same age. To study the evolution of weight gain, we expressed the results in percentages. We observed that the genetic ablation of *Trem1* dampened HFD-induced weight gain, inflammation, and insulin resistance, hallmarks of obesity. Although the precise mechanisms by which TREM-1 inhibition confers protection remain to be elucidated, we hypothesized that the reduction of the HFD-induced inflammation may be the *primum movens* preventing the development of insulin resistance and thus breaking the vicious circle (HFD induces inflammation that leads to insulin resistance that alters energy use and fat deposition and perpetuates inflammation). Indeed, Li *et al* (26) showed that oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), whose production is increased during HFD, can activate TREM-1 that in turn contributes to atherogenesis and foam cell formation by enhancing proinflammatory cytokine production. The link between oxLDL and TREM-1-induced inflammation has recently been confirmed by Wang *et al* (27).

However, as we used TREM-1 KO animals, we are left with the question of the cell type(s) involved in this protective genotype: is it the deletion of *Trem1* on adipocytes, myeloid cells, or both that confers beneficial effects? Further studies are needed using adipocyte-specific *Trem1* deletion, or irradiated TREM-1 KO mice reconstituted with bone marrow from WT littermates.

The TREM-1 KO model can be viewed as a 'preventive' model, and then another important question arises: is the modulation of TREM-1 able to reverse an established phenotype? To address this we could use the TREM-1 inhibitory peptide Nangibotide (under clinical study in

septic shock patients) but this would require repeated injection as its half-life is very short (28). The administration of an antagonist antibody would be more practical but it does not exist yet.

Several questions remain unanswered. We were able to determine the mechanisms involved in weight gain differences. Food intake monitoring indicated it was not due to fluctuation in calorie intake and that *Trem1* ablation didn't modify leptin secretion. TREM-1 could have affected food assimilation by influencing the intestinal microbiota or energy expenditure through variation in the population of beige adipocytes. Moreover, it is necessary to determine whether *Trem1* deletion could provide long-term protection for mice from the development of obesity-related comorbidities. Finally, we could not determine whether the reduction in insulin resistance was due to weight differences or to a more direct protective effect of the *Trem1* deletion. Anyway, TREM-1 activation seems to have a role in diet-induced obesity in mice by reducing weight gain, liver inflammation and protecting against associated comorbidities such as insulin resistance and cardiac dysfunction. Its pharmacological modulation deserves further investigation with the aim to break the vicious circle of insulin resistance and inflammation.

5. Conflict of Interest

Marc Derive and Marine Maillefer are employees of Inotrem SA, a French company that develops TREM-1 inhibitors. Sebastien Gibot and Marc Derive are the co-founders of Inotrem SA.

6. Author Contribution

Benjamin Brustolin and Sebastien Gibot conceived the study. Benjamin Brustolin, Nina Touly, Marine Maillefer, Lola Parisot, and Elisa Di Pillo performed experiments. Marc Derive reviewed the data. Benjamin Brustolin and Sebastien Gibot wrote the first draft of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

7. Funding

This work was supported by a grant from the French ministry of Higher Education and Research, and by an unrestricted grant from Inotrem SA.

8. Acknowledgments

The authors thank Kevin Carrasco, Lucie Jolly, Amir Boufenzer for their expertise, and Julie Voison Christophe, Nelly Colne, Marc-Damien Lourenco-Rodrigues, and Pauline Renard for their technical assistance.

9. Reference list

1. Liu R, Nikolajczyk BS. Tissue Immune Cells Fuel Obesity-Associated Inflammation in Adipose Tissue and Beyond. *Frontiers in Immunology* (2019) 10: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01587>
2. Piché M-E, Tchernof A, Després J-P. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research* 126:1477–1500. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316101
3. Akbari M, Lankarani KB, Tabrizi R, Ghayour-Mobarhan M, Peymani P, Ferns G, Ghaderi A, Asemi Z. The Effects of Curcumin on Weight Loss Among Patients With Metabolic Syndrome and Related Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Frontiers in Pharmacology* (2019) 10: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00649>
4. Osborn O, Brownell SE, Sanchez-Alavez M, Salomon D, Gram H, Bartfai T. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity. *Cytokine* (2008) 44:141–148. doi: 10.1016/j.cyto.2008.07.004
5. Tak YJ, Lee SY. Long-Term Efficacy and Safety of Anti-Obesity Treatment: Where Do We Stand? *Curr Obes Rep* (2021) 10:14–30. doi: 10.1007/s13679-020-00422-w
6. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* (2000) 164:4991–4995. doi: 10.4049/jimmunol.164.10.4991
7. Carrasco K, Boufenzer A, Jolly L, Le Cordier H, Wang G, Heck AJ, Cerwenka A, Vinolo E, Nazabal A, Kriznik A, et al. TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils. *Cell Mol Immunol* (2019) 16:460–472. doi: 10.1038/s41423-018-0003-5
8. Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol* (2006) 7:1266–1273. doi: 10.1038/ni1411
9. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* (2001) 410:1103–1107. doi: 10.1038/35074114
10. Boufenzer A, Lemarié J, Simon T, Derive M, Bouazza Y, Tran N, Maskali F, Groubatch F, Bonnin P, Bastien C, et al. TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ Res* (2015) 116:1772–1782. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305628
11. Xu P, Zhang X, Liu Q, Xie Y, Shi X, Chen J, Li Y, Guo H, Sun R, Hong Y, et al. Microglial TREM-1 receptor mediates neuroinflammatory injury via interaction with SYK in

- experimental ischemic stroke. *Cell Death Dis* (2019) 10:555. doi: 10.1038/s41419-019-1777-9
12. Kökten T, Gibot S, Lepage P, D'Alessio S, Hablot J, Ndiaye N-C, Busby-Venner H, Monot C, Garnier B, Moulin D, et al. TREM-1 Inhibition Restores Impaired Autophagy Activity and Reduces Colitis in Mice. *J Crohns Colitis* (2018) 12:230–244. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx129
 13. Joffre J, Potteaux S, Zeboudj L, Loyer X, Boufenzler A, Laurans L, Esposito B, Vandestienne M, de Jager SCA, Héniqne C, et al. Genetic and Pharmacological Inhibition of TREM-1 Limits the Development of Experimental Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* (2016) 68:2776–2793. doi: 10.1016/j.jacc.2016.10.015
 14. Collins CE, La DT, Yang H-T, Massin F, Gibot S, Faure G, Stohl W. Elevated synovial expression of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in patients with septic arthritis or rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2009) 68:1768–1774. doi: 10.1136/ard.2008.089557
 15. Gao S, Yuan L, Wang Y, Hua C. Enhanced expression of TREM-1 in splenic cDCs in lupus prone mice and it was modulated by miRNA-150. *Mol Immunol* (2017) 81:127–134. doi: 10.1016/j.molimm.2016.12.006
 16. Ho C-C, Liao W-Y, Wang C-Y, Lu Y-H, Huang H-Y, Chen H-Y, Chan W-K, Chen H-W, Yang P-C. TREM-1 expression in tumor-associated macrophages and clinical outcome in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* (2008) 177:763–770. doi: 10.1164/rccm.200704-641OC
 17. Gibot S, Kolopp-Sarda M-N, Béné M-C, Bollaert P-E, Lozniewski A, Mory F, Levy B, Faure GC. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* (2004) 200:1419–1426. doi: 10.1084/jem.20040708
 18. Vázquez CMP, Costa JO, Bomfim LGS, Pires LV, da Silva DG, Fukutani KF, de Jesus AR, de Jesus Silva N, de Jesus Santana G, de Moura TR, et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein (Ox-LDL) and Triggering Receptor-Expressed Myeloid Cell (TREM-1) Levels Are Associated with Cardiometabolic Risk in Nonobese, Clinically Healthy, and Young Adults. *Oxid Med Cell Longev* (2019) 2019:7306867. doi: 10.1155/2019/7306867
 19. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2008) 295:E1323-1332. doi: 10.1152/ajpendo.90617.2008
 20. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* (2017) 168:960–976. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004
 21. Khalid M, Alkaabi J, Khan MAB, Adem A. Insulin Signal Transduction Perturbations in Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* (2021) 22:8590. doi: 10.3390/ijms22168590
 22. Schmaußer B, Endrich S, Beier D, Moran AP, Burek CJ, Rosenwald A, Rieckmann P, Müller-Hermelink H-K, Eck M. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1)

- expression on gastric epithelium: implication for a role of TREM-1 in *Helicobacter pylori* infection. *Clinical and Experimental Immunology* (2008) 152:88–94. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03608.x
23. Jolly L, Carrasco K, Derive M, Lemarié J, Boufenzer A, Gibot S. Targeted endothelial gene deletion of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 protects mice during septic shock. *Cardiovascular Research* (2018) 114:907–918. doi: 10.1093/cvr/cvy018
 24. Jolly L, Carrasco K, Salcedo-Magguilli M, Garaud J-J, Lambden S, van der Poll T, Mebazaa A, Laterre P-F, Gibot S, Boufenzer A, et al. sTREM-1 is a specific biomarker of TREM-1 pathway activation. *Cell Mol Immunol* (2021) 18:2054–2056. doi: 10.1038/s41423-021-00733-5
 25. Subramanian S, Pallati PK, Sharma P, Agrawal DK, Nandipati KC. Significant association of TREM-1 with HMGB1, TLRs and RAGE in the pathogenesis of insulin resistance in obese diabetic populations. *Am J Transl Res* (2017) 9:3224–3244.
 26. Li H, Hong F, Pan S, Lei L, Yan F. Silencing Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells-1 Impaired the Inflammatory Response to Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages. *Inflammation* (2016) 39:199–208. doi: 10.1007/s10753-015-0239-5
 27. Wang YK, Wang J, Hua F, Shen YL, Han L, You JY, Wei W, Zhang CY, Liu XD, Zhang Q. TREM-1 Modulates Dendritic Cells Maturation and Dendritic Cell-Mediated T-Cell Activation Induced by ox-LDL. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2022) 2022:e3951686. doi: 10.1155/2022/3951686
 28. Parent M, Boudier A, Maincent P, Gibot S, Ait-Oufella H, Boufenzer A, Jolly L, Derive M, Kouach M, Goossens J-F, et al. LR12-peptide quantitation in whole blood by RP-HPLC and intrinsic fluorescence detection: Validation and pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* (2017) 31:e3877. doi: 10.1002/bmc.3877

Figure 1: Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) is expressed by human subcutaneous and omental pre-adipocyte and adipocytes.

(A) Confocal fluorescent images of human subcutaneous (top panels) and omental (bottom panels) pre-adipocytes and adipocytes. Cells were stained with anti-human TREM-1 (red), DAP-12 (green), and TO-PRO3 (blue) mAbs, Scale bars: 100 μ m. (B) Western blot of lysates of human subcutaneous and omental pre-adipocytes and adipocytes treated for 2, 4, 6, and 24 hours with LPS (100 ng/ml). Images are representatives from 3 different experiments each performed on three different donors.

Figure 2: Activation of TREM-1 increases LPS-induced inflammation in human subcutaneous and omental pre-adipocyte and adipocytes.

Automated multiplex ELISA quantification of IL-8, IL-6, and MCP-1 in cell supernatants from subcutaneous pre-adipocytes (A-C), adipocytes (D-F), and omental pre-adipocytes (G-I), adipocytes (J-L). Cells were incubated under resting conditions or stimulated with LPS (100 ng/ml) with or without TREM-1 agonist (MAB1278 at 5 μ g/ml) or control immunoglobulin G (IgG) for indicated times. Data are representative of 3 independent experiments each performed on three different donors. The significance between the IgG and MAB1278 conditions was determined using the Mann-Whitney test *p < 0.05, **p < 0.01. Data are presented as median and 95% confidence interval.

Figure 3: *Trem1* deletion limits weight gain in HFD mice.

(A) Body weights of Wild-Type (WT) or TREM-1 Knock-Out (KO) mice fed with control Low Fat Diet (LFD) or High Fat Diet (HFD) during 12 weeks. (B) Total body weight gain (g), (C) body weight gain (%), (D) total body weight gain (%), (E) food and calorie intake over 12 weeks, (F) mean of food and calorie intake over 12 weeks in WT and KO mice fed with LFD or HFD (n=10 mice per groups One-way ANOVA analysis). (G) subcutaneous, (H) perigonadal, (I) mesenteric adipose tissue, and (J) liver weight after 12 weeks of feeding of WT and KO LFD and HFD mice. (n=10 mice per group Student's *t*-test analysis). Data are presented as mean \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Figure 4: *Trem1* deletion decreases inflammation in obese mice.

Quantification of *Tnfa*, *Il6*, and *Ccl2* mRNA expression by RT-qPCR in (A-C) subcutaneous, (D-F) perigonadal, (G-I) mesenteric adipose tissue, and (J-L) liver from WT or TREM-1 KO mice fed with control LFD or HFD. Data are presented as mean \pm SEM, n=5-6 mice per group

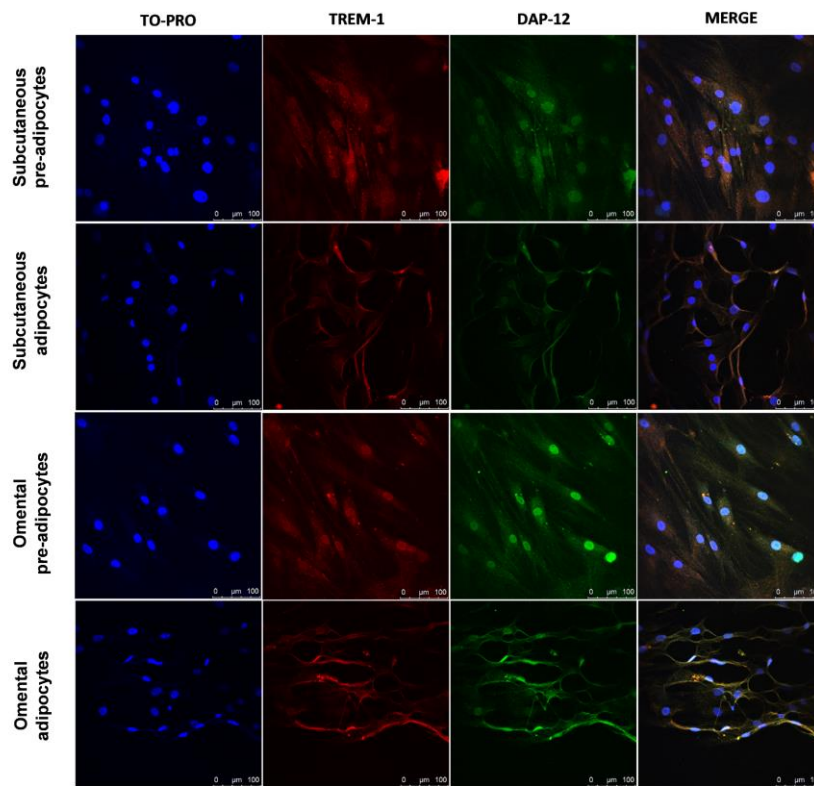
(Kruskal Wallis test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 5: *Trem1* deletion dampens HFD-induced insulin resistance liver.

(A) Blood glucose and (B) insulin were measured during an oral glucose tolerance test on WT or TREM-1 KO mice fed with control LFD or HFD after 10 weeks of diet. Mice were fasted for 6 hours before the test. (AUC: Area Under the Curve). Data were presented mean \pm SEM, $n=5$ mice per group. Brown-Forsythe and Welch ANOVA were used for Glucose and insulin measurement to compare WT HFD vs KO HFD (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (C) Western blot of liver lysates and their densitometric quantification. Data were presented as mean \pm SEM, $n=5$ mice per group (Mann-Whitney test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 1

A



B

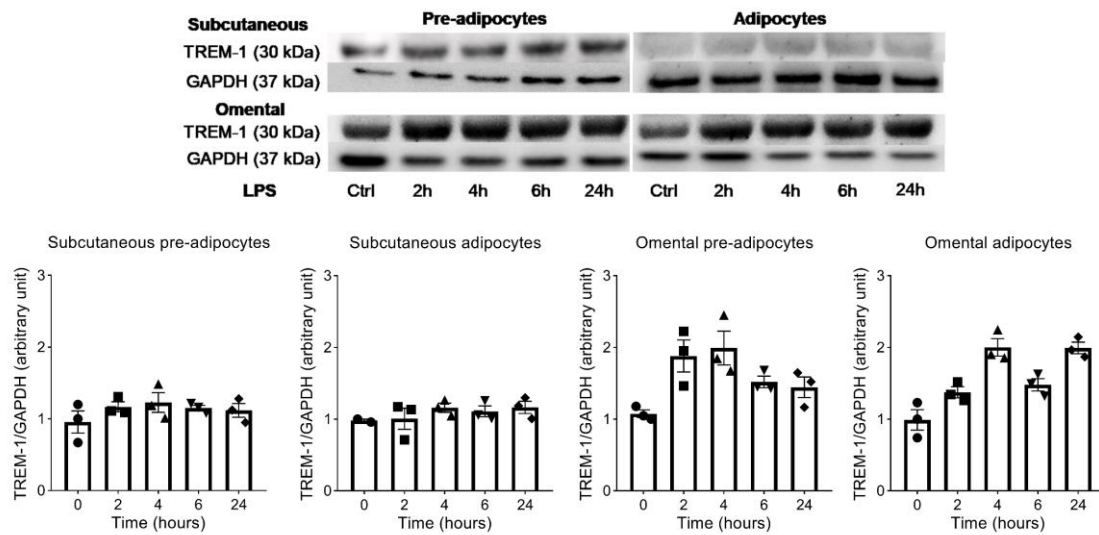


Figure 2

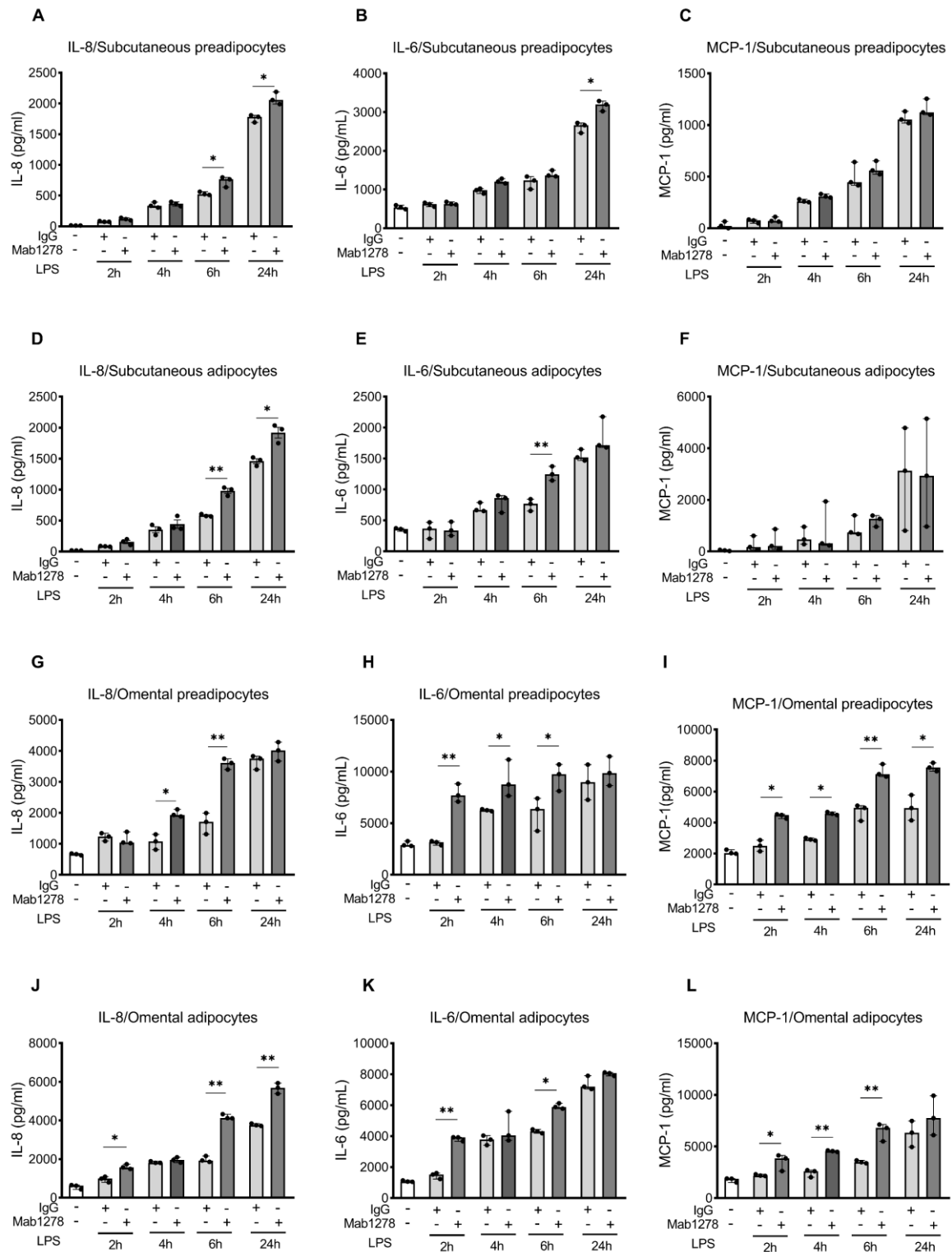


Figure 3

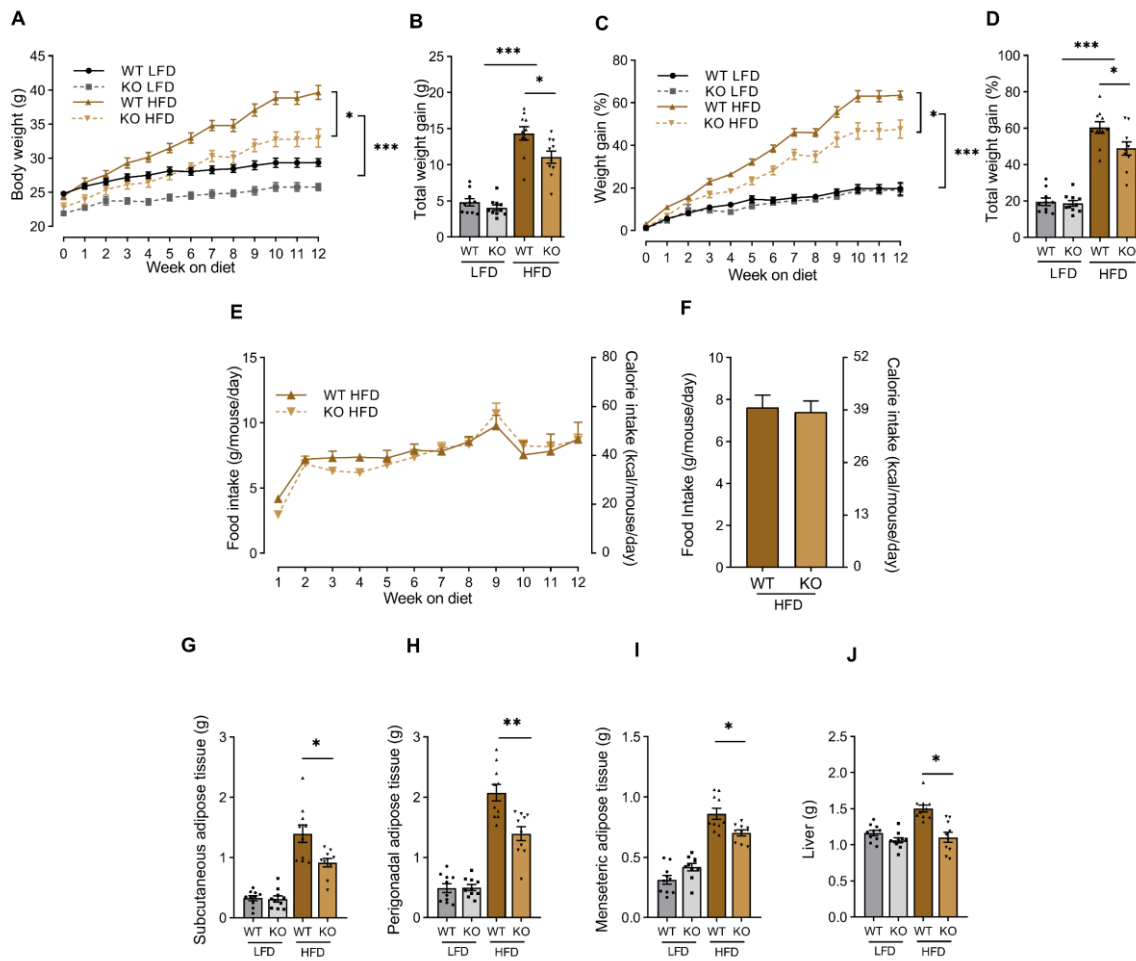
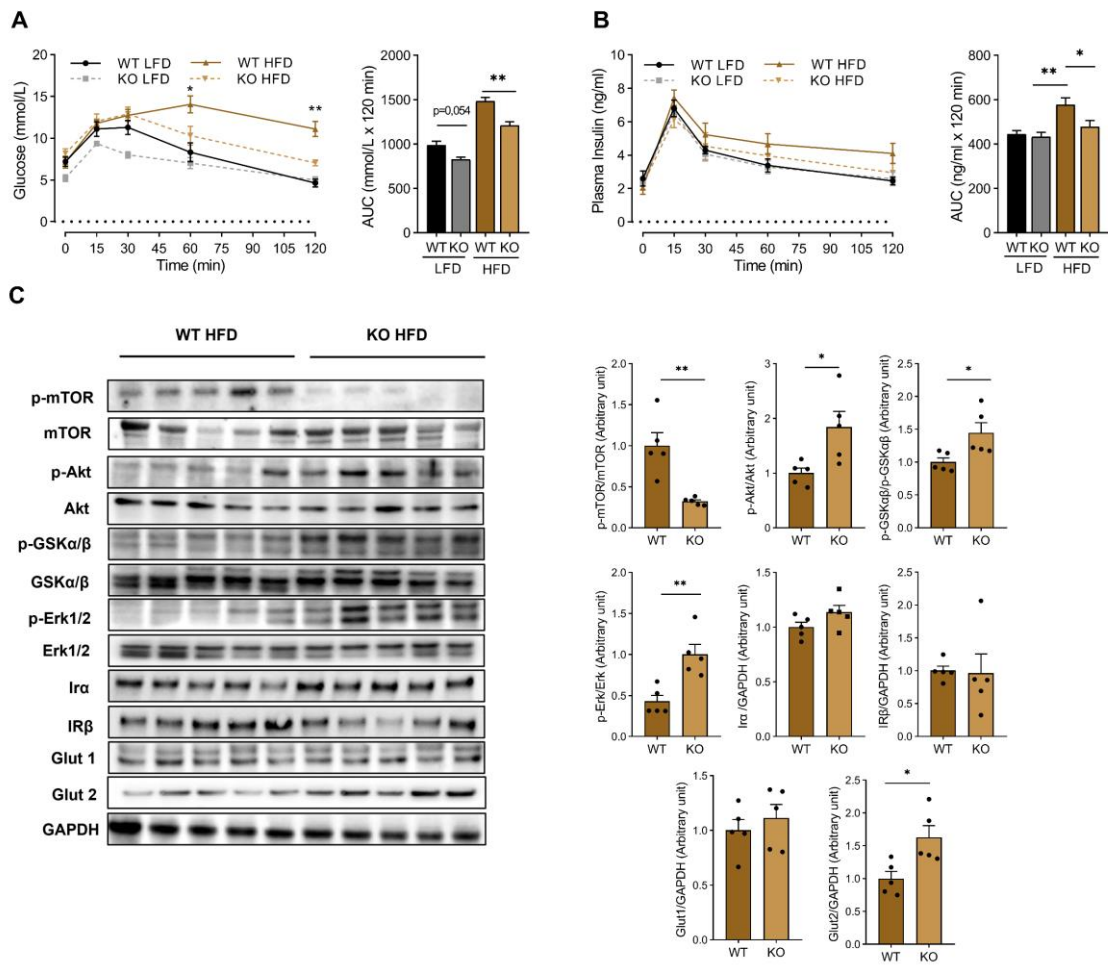


Figure 5



Supplementary Figure 1: Quantification of *Adgre1*, *Itagx* and *Mrc1* mRNA expression determined by real-time qPCR in (A-D) subcutaneous, (E-H) perigonadal, and (I-L) mesenteric adipose tissue from wild-Type (WT) or TREM-1 Knock-Out (KO) fed with control Low Fat Diet (LFD) or High Fat Diet (HFD). *Itagx/Mrc1* ratio calculated from qPCR ratio. Data are presented as mean \pm SEM, n=5 mice per group (Kruskal Wallis test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Supplementary Figure 2: Echocardiography was performed at 12 weeks on Wild-Type (WT) or *Trem-1* Knock-Out (KO) fed with control Low Fat Diet (LFD) or High Fat Diet (HFD). (A) Heart rate, (B) anterior wall thickness, (C) posterior wall thickness, (D) left ventricular fractional shortening, and (E) Left ventricular mass. Data are presented as mean \pm SEM n=6-10 mice per group (One-way ANOVA analysis *p < 0.05).

Supplementary material

Real-Time PCR

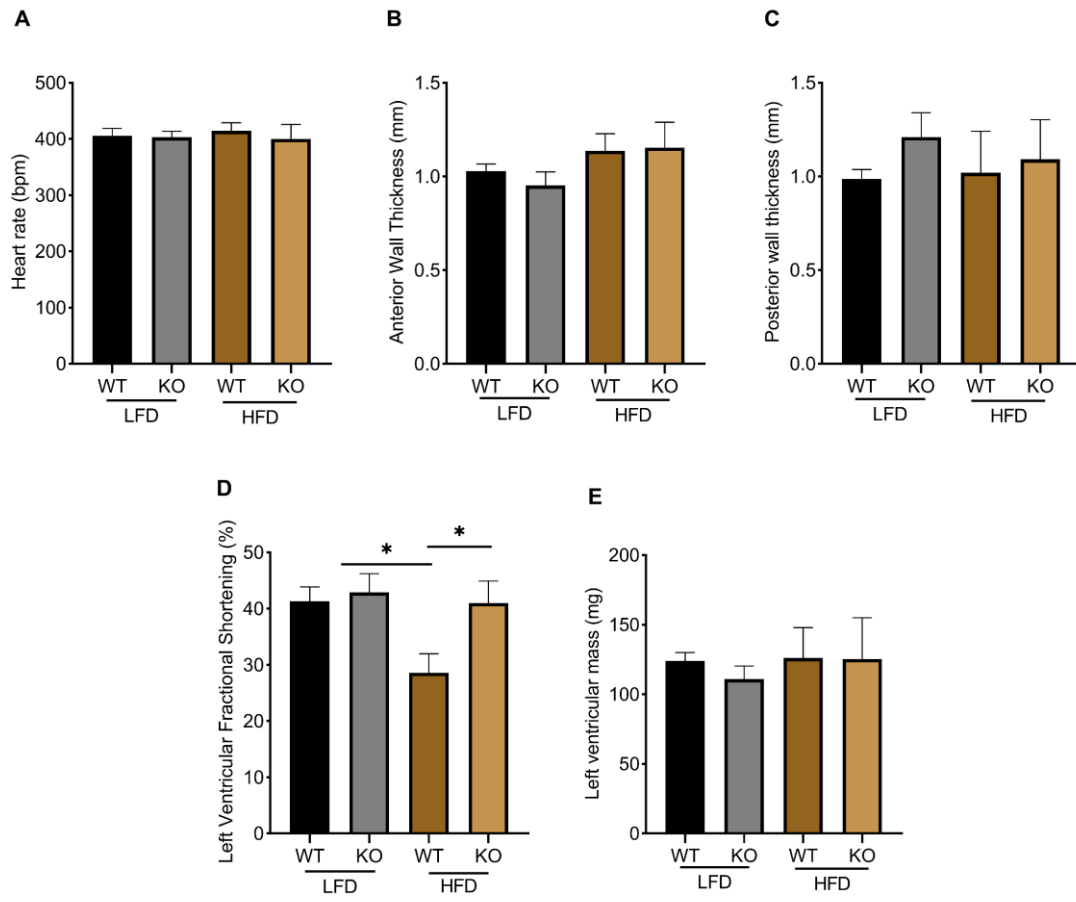
Frozen liver, subcutaneous, mesenteric, and perigonadal white adipose tissue were cut into small pieces, kept frozen, and ground in a homogenizer (FastPrep-24, MP biomedical SARL, France) using ceramic balls 1.4 mm in diameter in the presence of Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) to extract total RNA. RNA purification was performed using RNAeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Netherlands) according to the manufacturer's instructions and quantified with MicroDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) to determine RNA purity and concentration. Samples were diluted to the same concentration before being reverse transcribed using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA) and quantified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) using Qiagen probes (Quantitect Primers) for murine *Adgre-1*, *Itagx*, and *Mrc-1*. Murine *Gapdh*, β -*actin*, *Rna18S* probes served as housekeeping genes.

Echocardiography

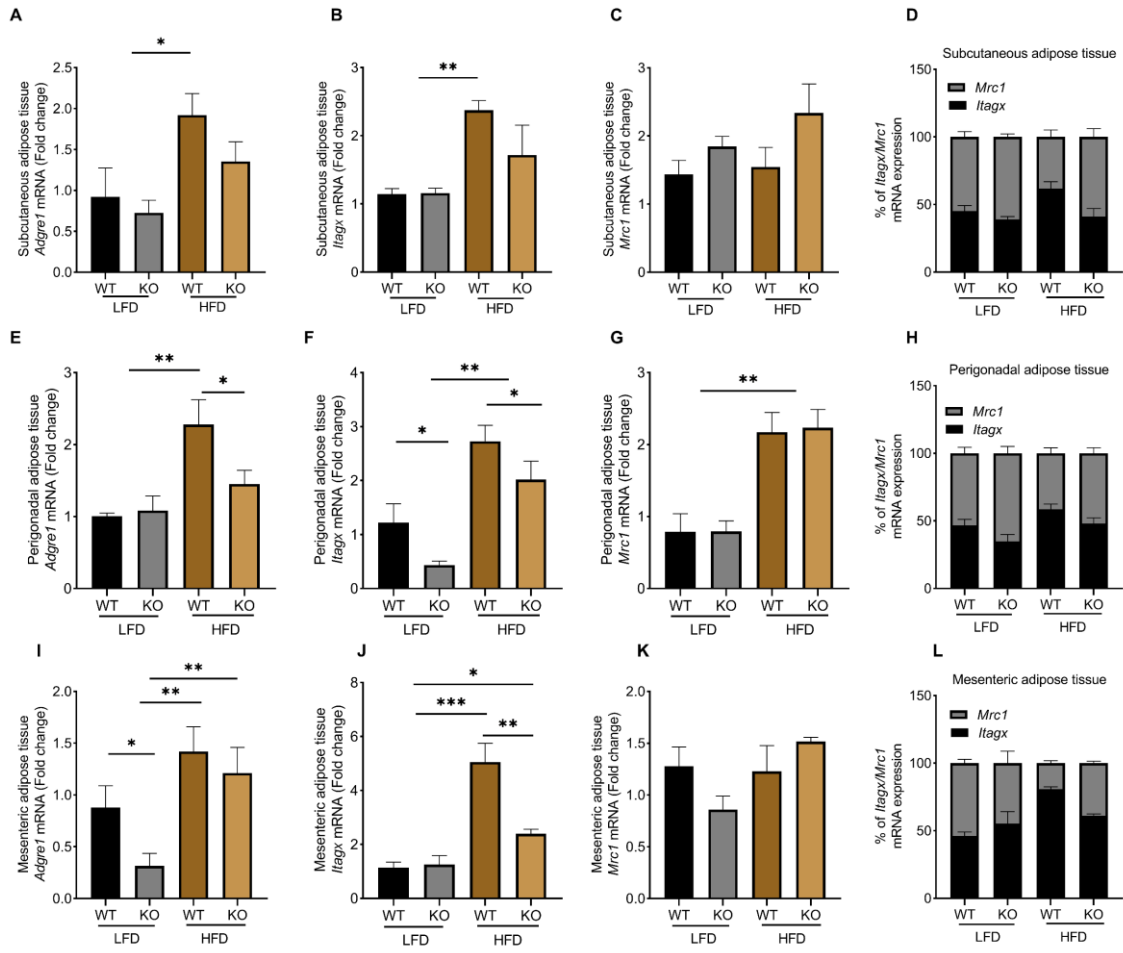
Transthoracic echocardiography was performed 12 weeks after the start of the diet using a VisualSonics 3100 system. Left Ventricular Ejection Fraction and other indices of systolic function were obtained from parasternal long axis B-mode scans. Anesthesia was induced by 5% isoflurane with 1.5 L/min of O₂ and confirmed by a lack of response to firm pressure on one of the hind paws. During echocardiography acquisition, isoflurane and O₂ were reduced to 2 % and 0.5 L/min respectively. The body-temperature was monitored during the procedure. Anterior Wall Thickness (AWT), Left Ventricular Systolic Dimension (LVSD), Left

Ventricular Diastolic Dimension (LVDD), and Posterior Wall Thickness (PWT) were measured, and Left Ventricular Fractional Shortening (LVFS) and Left Ventricular Mass (LVM) were calculated.

Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



III. Bilan de formation

1. Valorisation scientifique

Auditions libres

Crédits/Points : 2.9

- VS3.BIOSE HC - Journée de la Recherche Master Sciences du Vivant (JRM) / hors catalogue / 5 heures / 1 Crédit/Point
- VS 2.BIOSE Journée de Rentrée de l'école doctorale BioSE 2019-2020 / 21 novembre 2019 / catalogue 0.5 Crédit/Point
- VS3.BIOSE HC - Alpha Visa Congrès / Webinaire ComVet 2021 / 2 avril 2021 / hors catalogue / 3 heures / 0.3 Crédit/Point
- VS3.BIOSE HC - Webinar " What's in a Name? Understanding the basics and research Value of Mouse Nomenclature" / 4 mai 2021 / hors catalogue / 1 heure / 0.1 Crédit/Point
- VS3.BIOSE HC - Journée 'Cerveau et métabolisme' / 18 février 2020 / hors catalogue / 6 heures / 0.5 Crédit/Point
- VS3.BIOSE - Journée scientifique de l'école doctorale BioSE 2021 / 2 juin 2021 / catalogue 0.5 Crédit/Point

Conférences

Crédits/Points : 3.6

- VS2.BIOSE HC - 2nde édition Journée de la Recherche Master Sciences du Vivant (JRM) / hors catalogue / 4 heures / 1 Crédit/Point
- VS2.BIOSE - Journée de l'école doctorale BioSE 2020 / 12 novembre 2020 / catalogue 0.6 Crédit/Point
- VS2 BIOSE HC Communication orale nationale : Utilisation d'animaux à des fins scientifiques / 8 avril 2022 / hors catalogue / 1 heure / 2 Crédits/Points

2. Accompagnement à la thèse

Ethique et intégrité scientifique

Crédits/Points : 1

- AT3. MDD 11 - Culture de l'intégrité scientifique / 20 novembre 2019 / catalogue / 8 heures / 1 Crédit/Point

Formations disciplinaires

Crédits/Points : 12

- AT1.BIOSE HC - Formation à l'utilisation du cytomètre Gallios / hors catalogue / 4 heures / 1 Crédit/Point
- AT1.BIOSE HC - DU « Expérimentation animale : Conception et réalisation de procédures sur rongeurs et lagomorphes » / hors catalogue / 66 heures / 3 Crédits/Points
- AT1.BIOSE HC - Formation NEO : prévention, risque incendie, risque biologique et risque chimique / hors catalogue / 1 heure / 0.5 Crédit/Point
- AT1.BIOSE HC - Formation Sur système Confocal TCSPC-SP5-X Leica / hors catalogue / 6 heures / 1 Crédit/Point
- AT1.BIOSE HC - UE M2 recherche "Ingénierie cellulaire en thérapeutique" / 2 décembre 2019 / hors catalogue / 33 heures / 2.5 Crédits/Points
- AT1.BIOSE HC - Analyse des données de cytométrie : utilisation du logiciel FlowJo 10 / 1 mars 2021 / hors catalogue / 14 heures / 1 Crédit/Point
- AT1.BIOSE HC - Expert Cytometry Advanced program / 3 mars 2020 / hors catalogue / 54 heures / 3 Crédits/Points

Formations transverses

Crédits/Points : 2.5

- AT2. MDD 22 - Formation à la culture de prévention Nancy / 14 février 2020 / catalogue / 6 heures / 0.5 Crédit/Point
- AT2. MDD 31 - Gestion de projet / 2 mars 2020 / catalogue / 18 heures / 2 Crédits/Points

3. Préparation à l'après thèse

Aide à l'insertion professionnelle

Crédits/Points : 1

- PA1.2 MDD 32 – Les métiers hors R&D (à distance) / 19 juin 2020 / catalogue / 10 heures / 1 Crédit/Point

Innovation, Entreprise

Crédits/Points : 6

- PA1.3 MDD 34 - Connaissance de soi / 7 janvier 2020 / catalogue / 16 heures / 1.5 Crédits/Points
- PA1.3 MDD 38 - Ecole d'été/E-summer school - Entrepreneuriat et innovation dans un environnement interculturel (en ligne) / 30 juin 2020 / catalogue / 38 heures / 4 Crédits/Points
- PA1.3 MDD 35 - Contrats industriels et brevets / 23 mars 2021 / catalogue 0.5 Crédit/Point

Responsabilités collectives

Crédits/Points : 2

- PA3 BIOSE HC Membre conseil pôle BMS / 29 mars 2019 / hors catalogue 2 Crédits/Points

RESUME

TREM-1 (Triggering Receptor of Expressed on Myeloid Cells-1) est un immuno-récepteur principalement exprimé par les cellules immunitaires innées. Il joue un rôle majeur dans l'amplification du processus inflammatoire médié par l'engagement des TLRs. Il est impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoire aiguë (choc septique) et chronique (MICI). L'état inflammatoire de bas grade présent dans l'obésité est responsable du développement et de la perpétuation des comorbidités associées à l'obésité (diabète de type 2, maladies cardiovasculaires...). En utilisant des cellules humaines primaires, nous avons montré ici que TREM-1 est exprimé et fonctionnel dans les (pré-)adipocytes sous-cutanés et omentaux. Dans un modèle murin d'obésité induite par un régime riche en graisses, nous avons constaté que la délétion de Trem-1 limitait l'inflammation, la prise de poids et la résistance à l'insuline. Nos résultats suggèrent que TREM-1 joue un rôle important dans le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline, et pourrait donc être une nouvelle cible thérapeutique dans ce contexte.

Mots clés : Obésité, TREM-1, adipocyte, inflammation, Resistance à l'insuline

ABSTRACT

TREM-1 (Triggering Receptor of Expressed on Myeloid Cells-1) is an immunoreceptor mainly expressed by innate immune cells. It plays a major role in the amplification of the inflammatory process mediated by the engagement of TLRs. It is implicated in many acute (septic shock) and chronic (IBD) inflammatory diseases. The low-grade inflammatory state present in obesity is responsible for the development and perpetuation of comorbidities associated with obesity (type 2 diabetes, cardiovascular diseases, etc.). Using primary human cells, we showed here that TREM-1 is expressed and functional in subcutaneous and omental (pre-)adipocytes. In a mouse model of high-fat diet-induced obesity, we found that Trem-1 suppression limited inflammation, weight gain, and insulin resistance. Our results reveal that TREM-1 plays an important role in the development of obesity and insulin resistance, and could therefore be a new therapeutic target in this context.

Key words : Obesity, TREM-1, adipocyte, inflammation, insulin resistance