

---

## Mémoire

**Auteur :** Saume, Aurore

**Promoteur(s) :** Legrand, Sylvie

**Faculté :** Faculté des Sciences

**Diplôme :** Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

**Année académique :** 2021-2022

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/16540>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

GIGA – Infection, Immunity & Inflammation  
Laboratoire d’immuno-métabolisme et nutrition

---

# **Etude du cross-talk entre les cellules T natural killer invariantes (inkt) et des macrophages cultivés dans un milieu enrichi en acides gras libres**

---

**Aurore SAUME**

Mémoire présenté en vue de l’obtention du grade de Master en Biochimie, Biologie  
Moléculaire et Cellulaire, à finalité approfondie

**Promoteur** : Sylvie LEGRAND

**Co-promoteur** : Chloé WILKIN

Année académique 2021-2022



## **Etude du cross-talk entre les cellules T natural killer invariantes (iNKT) et des macrophages cultivés dans un milieu enrichi en acides gras libres**

### **Résumé**

De nos jours, l'obésité est devenue un danger majeur pour la santé publique. Favorisant le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et certains cancers, l'obésité devient une des causes principales de décès prématuré. L'obésité est accompagnée de dyslipidémie, caractérisée par une augmentation des concentrations sanguines en acides gras libres. Cet environnement riche en lipides cause des perturbations immuno-métaboliques sur les cellules sanguines telles que les cellules Natural Killer (NK). Sachant que les cellules iNKT peuvent être activées par la présentation d'antigènes lipidiques endogènes présentés via le CD1d par des CPAs, il est tentant de spéculer que cet environnement pourrait être propice au chargement sur le CD1d des monocytes de lipides antigéniques nouvellement synthétisés ou endocytés. Dans ce mémoire, nous avons donc étudié un éventuel effet indirect des acides gras sur l'activation des cellules iNKT en réalisant des co-cultures de cellules iNKT avec des macrophages THP1-CD1d traités par différents acides gras libres. Nos résultats ont montré qu'il y a bien une activation des cellules iNKT quand elles sont mises en culture avec les macrophages pré-traités spécifiquement avec des acides gras saturés et non avec des acides gras mono-insaturés. De plus, cette capacité des macrophages d'activer les cellules iNKT après un traitement avec les acides gras saturés semble être dépendante de la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d.

**Aurore SAUME**

Année académique : 2021 – 2022

Promoteur : Sylvie LEGRAND

GIGA - Laboratoire d'immuno-métabolisme et nutrition



## *Remerciements*

*Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.*

*Tout d'abord, je remercie ma promotrice, Sylvie LEGRAND, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi que pour ses conseils avisés lors de nos entrevues.*

*Je remercie particulièrement mon encadrante, Chloé WILKIN, pour son partage d'expérience, sa gentillesse et son suivi tout au long de mon mémoire.*

*Je tiens également à remercier l'ensemble des chercheurs, doctorants, mémorants et techniciens du GIGA qui m'ont accueillie avec bienveillance et transmis leurs connaissances.*

*Mes derniers remerciements vont à ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements durant l'élaboration de ce travail.*



## Table des matières

1.	Introduction.....	1
1.1.	Les cellules iNKT.....	1
1.2.	Sous-populations de cellules iNKT.....	2
1.3.	Développement des cellules iNKT.....	3
1.4.	Distribution tissulaire.....	5
1.5.	Activation des cellules iNKT.....	5
1.6.	Rôles des iNKT.....	7
1.7.	Interactions des cellules iNKT avec des cellules immunitaires.....	8
1.8.	Les cellules iNKT et les pathologies.....	9
1.8.1.	iNKT et infection.....	9
1.8.2.	iNKT et cancer.....	10
1.9.	CD1d et la présentation d'antigènes lipidiques.....	11
1.10.	Le stress du RE.....	13
2.	Objectifs.....	15
3.	Matériels & Méthodes.....	17
3.1.	Solutions.....	17
3.2.	Obtention d'un stock de cellules iNKT humaines.....	20
3.2.1.	Isolation de PBMCs.....	20
3.2.2.	Isolation des cellules iNKT.....	20
3.2.3.	Induction de la prolifération des cellules iNKT.....	21
3.3.	Culture des cellules THP1 classiques et THP1-CD1d.....	23
3.3.1.	Différentiation des monocytes THP1 ou THP1-CD1d en macrophages à l'aide du PMA.....	23
3.3.2.	Traitements des macrophages THP1 ou THP1 CD1d.....	23
3.4.	Co-culture cellules iNKT-macrophages THP1 ou THP1-CD1d.....	24
3.4.1.	Décongélation et mises au repos des cellules iNKT.....	24
3.4.2.	Co-cultures.....	25
3.5.	ELISA.....	26
3.6.	Cytométrie en flux (FACS).....	27
3.6.1.	Compensations, titrations des anticorps et contrôles FMO.....	28
3.6.2.	Stratégie de gating des cellules iNKT humaines.....	29
3.6.3.	Caractérisation des cellules iNKT en prolifération.....	30
3.6.4.	Caractérisation des cellules iNKT à la suite de la co-culture.....	30
3.6.5.	Caractérisation des cellules THP1.....	31



3.7. Graphiques et analyses statistiques.....	31
4. Résultats.....	32
4.1. Mises au point du panel d'anticorps pour la caractérisation des cellules iNKT humaines .....	32
4.1.1. Titration.....	32
4.1.2. FMO.....	33
4.2. Obtention et caractérisation des stocks de cellules iNKT humaines.....	33
4.2.1. Nombre .....	34
4.2.2. Pureté .....	34
4.2.3 Phénotype et sous-classes .....	35
4.3. Effet des traitements des macrophages THP1-CD1d avec les acides gras libres sur l'activation des cellules iNKT après co-culture .....	36
4.3.1 Effet sur la sécrétion de cytokines .....	36
4.3.2. Effet sur le phénotype des cellules iNKT .....	38
4.3.3. Rôle du CD1d dans l'activation des cellules iNKT .....	39
4.3.4 Implication de la voie PERK-eIF2a de l'UPR.....	41
5. Discussion & Conclusions .....	43
Bibliographie.....	49

## Liste des abréviations

$\alpha$ -GalCer : alpha-Galactosylcéramide  
BSA : Bovine Serum Albumin  
CD : cluster of differentiation  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
DC : cellules dendritiques  
DMSO : Dimethylsulphoxide  
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay  
FACS : Fluorescent Activated Cell Sorter  
FBS : fetal bovin serum  
FT : facteur de transcription  
HEPES : N'-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid  
IFN- $\gamma$  : interféron gamma  
IL-2 : interleukine 2  
iNKT : invariant natural killer T  
IRE1 $\alpha$  : inositol-requiring enzyme 1  
ISRIB : integrated stress response inhibitor  
LT : lymphocyte T  
PERK : protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase  
PRRs : Pattern recognition receptors  
PBS : Phosphate buffered saline  
PBMC : peripheral blood mononuclear cell  
PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate  
RE : réticulum endoplasmique  
RT : room temperature  
milieu RPMI : milieu Roswell Park Memorial Institute  
qRT-PCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction  
SI : système immunitaire  
TCR : T cell receptor  
TMB : Tetramethylbenzidine

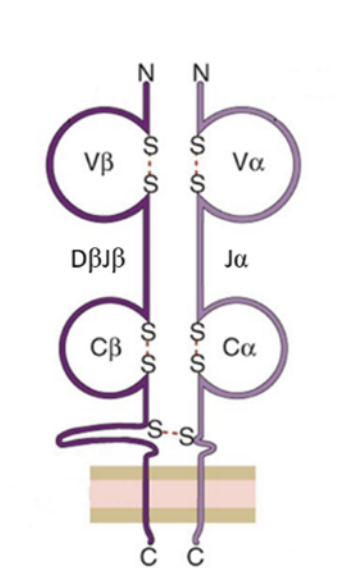


Figure 1 - Le récepteur T (TCR) - provenant de " Antigen recognition in adaptive immunity " [4]

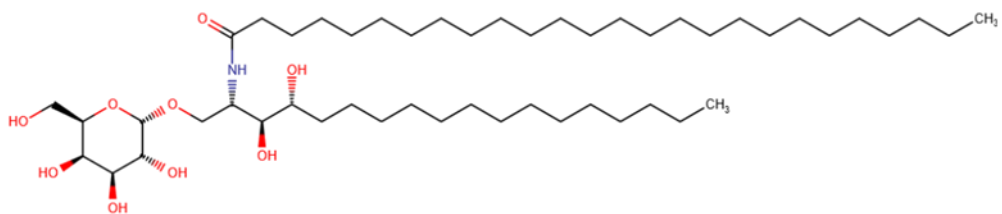


Figure 2 - alpha-galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer).

# 1. Introduction

## 1.1. Les cellules iNKT

Les cellules Natural Killer T (NKT) sont une population distincte de lymphocytes T (LT). Ces cellules immunitaires se trouvent à l'interface entre le système immunitaire (SI) inné et le SI adaptatif. En effet, elles expriment de façon constitutive des marqueurs de surface caractéristiques à la fois des cellules Natural Killer (NK), tels que la molécule d'adhésion CD56 et l'activateur NKR (natural killer receptor) CD161 (NK1.1 pour l'homologue souris) et des lymphocytes T, tels que le complexe de signalisation CD3 et le récepteur TCR (T cell receptor) [1]. Ce dernier, généré par recombinaison des segments V(D)J, est composé d'une chaîne légère ( $V\alpha$ - $J\alpha$ - $C\alpha$ ) et d'une chaîne lourde ( $V\beta$ - $D\beta$ - $J\beta$ - $C\beta$ ), chacune contenant un domaine constant et un domaine variable [2, 3] (Figure 1).

Sur base de leur répertoire TCR, deux types de cellules NKT ont été décrits :

- les cellules NKT type I ou cellules Natural Killer T invariantes (iNKT).
- les cellules NKT type II ou cellules Natural Killer T variantes.

Les cellules iNKT expriment une chaîne  $\alpha$  invariante,  $V\alpha 14J\alpha 18$  chez la souris et  $V\alpha 24J\alpha 18$  chez l'Homme, qui s'apparie à un répertoire restreint de chaînes  $\beta$ ,  $V\beta 2$ ,  $V\beta 7$  ou  $V\beta 8$  chez la souris et  $V\beta 11$  chez l'Homme. Cette population est fortement activée par la présentation d'un antigène lipidique, l'alpha-galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer) (Figure 2), un glycolipide présent dans la paroi cellulaire de la bactérie *Novosphingobium bacteria* qui colonise une éponge marine. Ce glycolipide est composé d'un galactose lié en  $\alpha$  à un céramide. Ce dernier est le résultat d'une combinaison d'une chaîne de sphingosine (18 carbones) lié à un acide gras (26 carbones). Contrairement aux cellules iNKT, les cellules NKT de type II ne reconnaissent pas l' $\alpha$ -GalCer et présentent un répertoire de TCR plus diversifié et moins bien défini. L'antigène le plus étudié pour les cellules NKT de type II est le sulfatide, un lipide présent en grande quantité dans le tissu nerveux [5, 6].

Les cellules NKT sont activées via leur TCR en reconnaissant des glycolipides ou des sulfatides présentés par le CD1d, une molécule non classique du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) I exprimée sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). La majorité des antigènes exogènes naturels reconnus par les cellules NKT ont été identifiés chez des microorganismes. Il a été montré que des  $\alpha$ -glycosphingolipides ( $\alpha$ -GSL) chez *Sphingomonas spp.* et des diacylglycérols (DAG) chez *Borrelia burgdorferi* ainsi que chez



*Streptococcus pneumoniae*, stimulent les cellules NKT de manière CD1d dépendante. Lors du développement des cellules NKT dans le thymus, le CD1d a besoin d'antigènes lipidiques du soi pour obtenir une conformation correcte suggérant que la reconnaissance d'auto-lipides est importante pour sélectionner les NKT. Plusieurs auto-lipides potentiels ont été proposés tels que l'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3), les  $\beta$ -GSL et divers phospholipides (phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylglycérol). Cependant, certains de ces antigènes, tels que l'iGb3, sont encore sujets à discussion dans le monde scientifique et ont besoin d'être étudiés de façon plus approfondie [5, 6, 7, 8, 9].

Dans ce travail, nous nous focaliserons sur les cellules NKT de type I ou cellules iNKT, la population de cellules NKT la plus étudiée et la mieux caractérisée chez la souris et chez l'Homme.

## 1.2. Sous-populations de cellules iNKT

Les cellules iNKT de souris peuvent être divisées en 3 sous classes fonctionnelles en fonction de leur expression de facteurs de transcription (FT) et de la nature des cytokines sécrétées :

- Les cellules iNKT1 : elles expriment le facteur de transcription T-bet et sécrètent toute une série de cytokines, dont l'IFN- $\gamma$  préférentiellement, en plus de l'IL-4 et l'IL-13. Cette sous-population semble avoir une plus grande fonction cytotoxique que les autres.
- Les cellules iNKT2 : elles sont caractérisées par une expression des facteurs de transcription GATA-3 et PLZF. Elles produisent davantage de cytokines anti-inflammatoires : IL-4, IL-10 et IL-13. Elles auraient des propriétés régulatrices. En effet, la production d'IL-4 semble augmenter le nombre de LT régulateurs (Treg) qui participent à la tolérance périphérique en contrôlant les réponses immunitaires [10].
- Les cellules iNKT17 : elles expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ T, et PLZF de façon intermédiaire, et ont tendance à produire plus des cytokines de types pro-inflammatoires : IL-17, IL-21 et IL-22 [3, 11, 12].

Sur le plan phénotypique, les cellules iNKT humaines peuvent être également divisées en 3 sous-populations :

- Double négative (DN) : CD4-/CD8-
- CD4+
- CD4-/CD8+



Des études *in vitro* ont montré que les cellules CD4<sup>-</sup> (DN et CD8<sup>+</sup>) ont tendance à avoir un profil préférentiel de sécrétion de cytokines de type Th1 (IFN- $\gamma$ ) et possèdent une fonction cytotoxique. Alors que les cellules CD4<sup>+</sup> semblent sécréter de préférence des cytokines de type Th2 (IL-4). Cependant, ces 3 sous-populations sont capables de produire à la fois des cytokines de type Th1 et Th2. Cela suggère que les cellules iNKT2 sont majoritairement CD4<sup>+</sup> et que les cellules iNKT1 sont principalement DN ou CD8<sup>+</sup> [10, 13].

### 1.3. Développement des cellules iNKT

Les cellules iNKT se développent au sein du thymus à partir du même progéniteur lymphoïde que les lymphocytes T, un thymocyte doublement positif (DP) CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Lors de cette étape, la cellule DP exprime la chaîne TCR $\alpha$  invariante générée par réarrangement aléatoire des éléments V et J dans le cortex thymique [14]. Ce réarrangement somatique consiste en la fusion du segment V $\alpha$ 24 du gène V (TRAV) avec le segment J $\alpha$ 18 du gène J (TRAJ) pour former la chaîne légère invariante V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 pour l'Homme [15]. Ensuite, cette chaîne TCR $\alpha$  s'apparie avec la chaîne TCR $\beta$  appropriée (V $\beta$ 11 chez l'Homme), afin de constituer un TCR  $\alpha\beta$  complet. Une fois le réarrangement effectué, les précurseurs DP sont sélectionnés positivement en interagissant avec des auto-antigènes lipidiques présentés par le CD1d exprimés sur d'autres thymocytes DP corticaux, et non sur des cellules épithéliales thymiques qui sont, elles, responsables de la sélection des lymphocytes T conventionnels. S'ensuit un signal fort du TCR qui induit plusieurs événements intracellulaires jouant un rôle critique dans la sélection positive des cellules iNKT telle que l'activation de la voie Ca<sup>2+</sup>/calcineurine et Ras/MAPK. Il a été montré que l'inhibition de ces voies de signalisation dans les thymocytes DP entraînait une diminution importante du nombre de cellules iNKT dans le thymus, attestant d'une certaine contribution de ces voies dans la sélection positive [16]. En plus de la stimulation du récepteur TCR, les cellules DP nécessitent une interaction homotypique SLAM-SLAM (signaling lymphocyte activation molecule). Cette signalisation est médiée par la protéine SAP (SLAM-associated protein) qui recrute la kinase Fyn qui active la cascade NF- $\kappa$ B afin de favoriser la survie et la maturation des cellules DP [17]. D'autres facteurs de transcription régulent la durée de vie des thymocytes DP tels que ROR $\gamma$ T (Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma), HEB (HeLa E-box binding protein) et Myb en régulant la molécule transmembranaire anti-apoptotique Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large). Une perte d'expression de ces trois facteurs entraîne une diminution de la survie des thymocytes et par conséquent une absence de cellules iNKT dans le thymus [16, 18, 19].



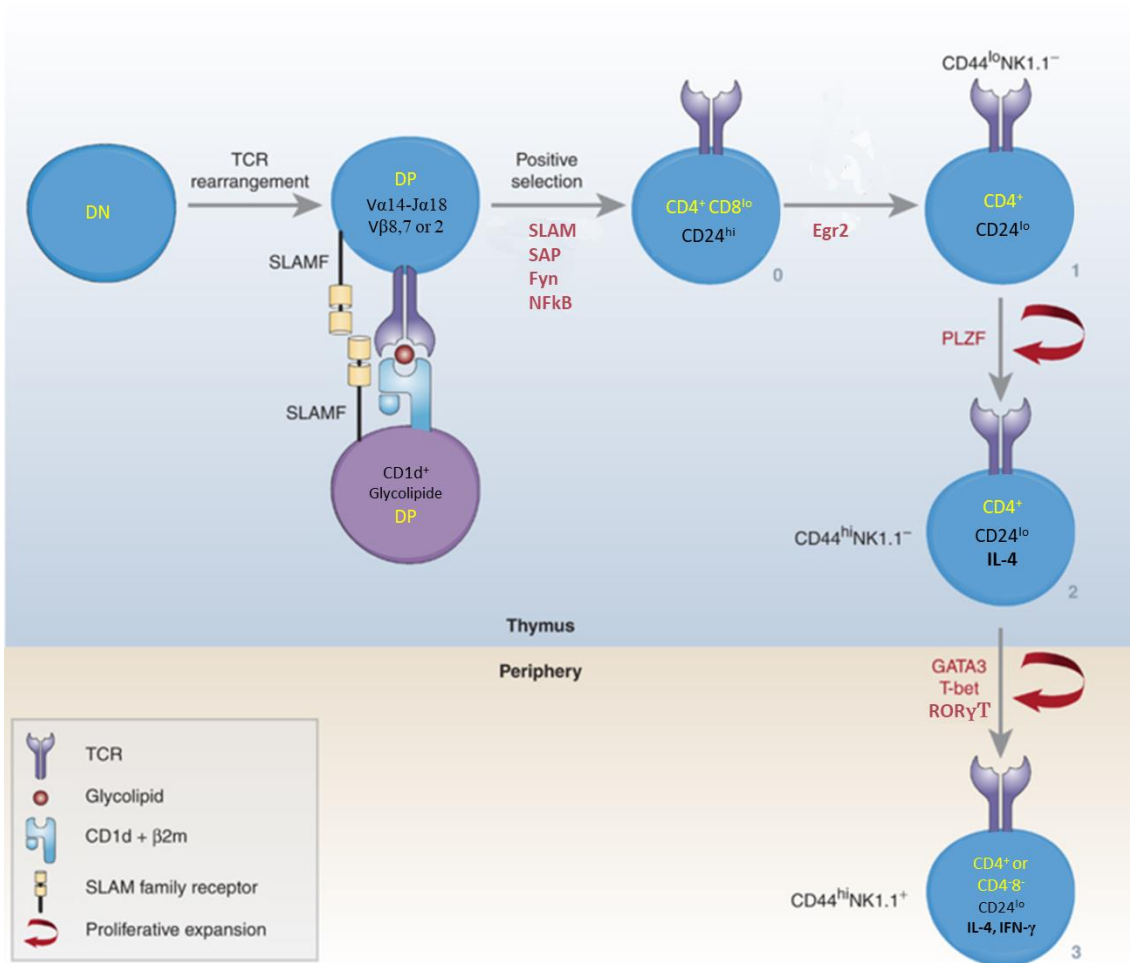


Figure 1 : Développement des cellules NKT invariantes - adaptée à partir de « It's up to you Egr2 » [18].

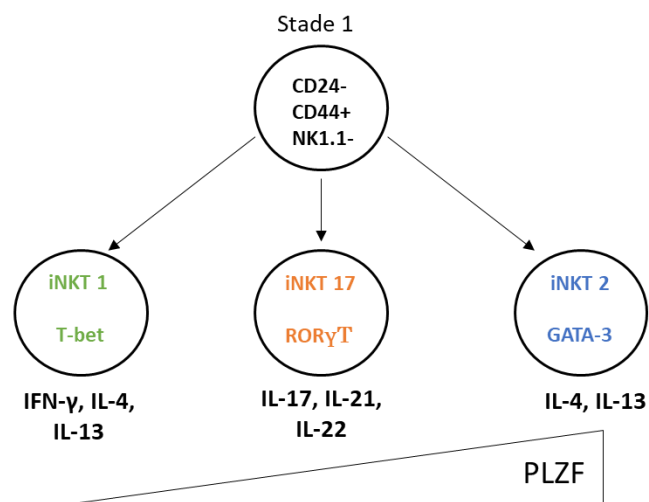


Figure 2 : Développement des sous-ensembles d'iNKT - adaptée de "Steady state production of IL-4 modulates immunity in different strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells" [27].

Par ailleurs, il a été montré que les cellules iNKT seraient également sélectionnées négativement afin d'éliminer les cellules possédant un TCR auto réactif de haute affinité. Par exemple, chez des souris transgéniques, la surexpression du CD1d entraîne une élimination des cellules iNKT en développement. Ce phénomène est également observé lorsqu'une chaîne  $\beta$  du TCR possède une forte auto-réactivité envers le CD1d [5, 8, 19, 20, 21]. Cependant, encore très peu développé dans la littérature, ce domaine a besoin d'être étudié de manière plus poussée.

Ensuite, les cellules iNKT poursuivent leur processus de maturation dans le thymus. Chez la souris, quatre stades sont utilisés pour décrire le développement des cellules iNKT. Au stade 0, les cellules immatures sont caractérisées par les marqueurs  $CD24^+ CD44^-$  et  $NK1.1^-$ . Les signaux induits par le TCR et SLAM induisent l'expression du FT Egr2 (Early growth response protein 2). Celui-ci, se lie à la région promotrice ZBTB16 (Zinc Finger And BTB Domain Containing 16) qui régule l'expression du FT PLZF (Promyelocytic leukaemia zinc finger protein), un régulateur essentiel dans la différenciation des cellules iNKT et l'acquisition de leur phénotype activé [19]. En effet, chez la souris, l'absence d'expression de PLZF altère le développement des cellules iNKT, empêchant leur maturation et induit une forte diminution du nombre de cellules iNKT [22, 23]. Ensuite, les cellules entrent dans le stade 1 ( $CD24^- CD44^- NK1.1^-$ ) où elles prolifèrent fortement et sont capables de produire de l'IL-4. Une régulation à la hausse de CD44 les fait entrer dans le stade 2 ( $CD24^- CD44^+ NK1.1^-$ ) où elles acquièrent l'expression de l'IFN- $\gamma$ . Enfin, les cellules iNKT deviennent matures au stade 3 avec l'expression du marqueur  $NK1.1$  ( $CD24^- CD44^+ NK1.1^+$ ) (Figure 3) [10, 24, 25].

La majorité des cellules iNKT quittent le thymus au stade 2 où elles sont toujours immatures par l'absence d'expression du marqueur  $NK1.1$  et réalisent leur maturation en périphérie en progressant vers le stade 3. Une minorité acquiert leur phénotype mature  $NK1.1^+$  dans le thymus.

En ce qui concerne les sous-classes iNKT1, iNKT2 et iNKT17, elles se développeraient à partir du précurseur commun du stade 2 ( $CD24^- CD44^+ NK1.1^-$ ) et se différencieraient, en exprimant des cytokines et des facteurs de transcription spécifiques à chaque sous-ensemble lors des différentes étapes de développement (Figure 4). Le FT PLZF, une fois exprimé, se lie à plusieurs gènes qui codent pour des FTs contrôlant la production de cytokines par les cellules iNKT. Il y a les FTs GATA3 et T-bet requis pour l'expression de l'IFN- $\gamma$ , IL-4 et IL-13 ; et les FTs Maf et ROR $\gamma$ T essentiels pour l'expression de l'IL-17. Ainsi, en fonction de la quantité

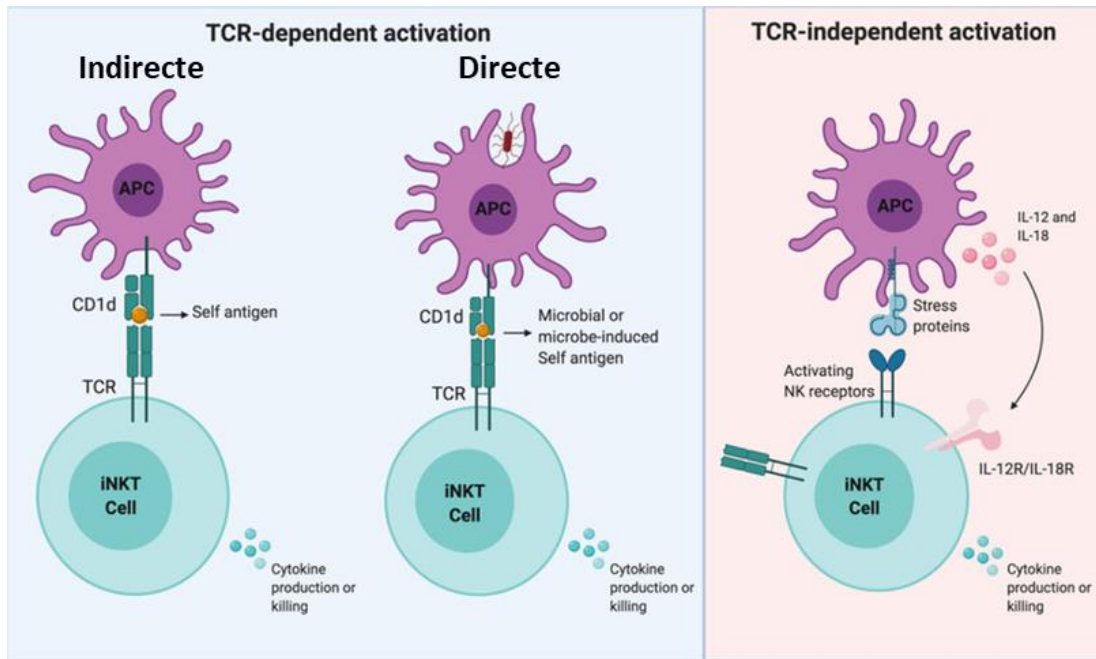


Figure 3 : Mécanismes d'activations des cellules iNKT - provenant de "License to Kill: When iNKT Cells Are Granted the Use of Lethal Cytotoxicity" [2].

de PLZF exprimée et du FT exprimé, le précurseur se différencie préférentiellement vers un sous-ensemble de cellule iNKT [18, 19]. En outre, ces sous-classes peuvent être distinguées en fonction de marqueurs de surface qu'elles expriment. En plus du récepteur de l'IL-12, les cellules NKT1 expriment NK1.1, contrairement aux cellules NKT2 et NKT17 qui ne l'expriment pas. Les cellules NKT2 expriment fortement le récepteur de la cytokine IL-17 (IL-17RB), tout comme les cellules NKT17 avec celui de l'IL-23 [26].

Chez l'Homme, les cellules iNKT immatures ressemblent à celles présentes chez la souris, ce qui suggère que ces cellules semblent suivre un processus de maturation comparable [19].

#### 1.4. Distribution tissulaire

A la sortie du thymus, les cellules iNKT migrent en périphérie pour être distribuées dans différents tissus. Chez la souris, elles se trouvent en quantité importante dans le foie (environ 30% des LT) et la rate (environ 2% des LT). Elles sont également présentes dans le thymus, la moelle osseuse, l'intestin, les ganglions lymphatiques ou encore le tissu adipeux, mais en quantité beaucoup plus faible (<1% des LT). Chez l'Homme, la fréquence des cellules iNKT dans les tissus est environ 10 fois plus faible que chez la souris. Elles représentent généralement 0,1% à 1% des cellules T dans le sang périphérique et la majorité des organes (moelle osseuse, poumons, foie, rein, rate, etc.) à l'exception de l'omentum, où elles représentent ~10% des LT. Selon l'individu, la quantité de cellules iNKT peut varier considérablement, allant jusqu'à l'indécelable à 2% [3, 5, 6, 24].

#### 1.5. Activation des cellules iNKT

Les cellules iNKT peuvent être activées par des mécanismes dépendants ou indépendants de leur TCR (Figure 5). Dans le cas d'une activation impliquant la reconnaissance d'antigène lipidique par leur TCR, celle-ci peut être directe ou indirecte.

L'activation directe est basée sur la reconnaissance d'antigènes lipidiques exogènes, issus, par exemple, de bactéries ou d'allergènes, présentés en surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) via une molécule CD1d. Les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B ou encore les adipocytes sont des CPAs capables de présenter un antigène lipidique via le CD1d. En présence d'un antigène de forte affinité, cette activation est principalement médiée par le TCR, capable d'activer les cellules iNKT, avec un besoin nul ou limité de co-stimulation par des cytokines produites par les CPAs. En revanche, pour des antigènes de moyenne affinité, une co-stimulation par les cytokines est nécessaire pour activer



robustement les cellules iNKT. Celles-ci, étant activées produisent diverses cytokines pro- et/ou anti-inflammatoires (IL-4, IFN- $\gamma$  et IL-2) [8, 24, 28].

L'activation indirecte a lieu en l'absence d'antigène lipidique exogène. En effet, de nombreux pathogènes ne contiennent pas de ligands qui engagent le TCR, comme les virus. Pourtant, ils peuvent aussi activer les cellules iNKT. Les pathogènes vont stimuler les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) des CPAs via leurs motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, Pathogen-associated molecular pattern). Cette activation engendre des changements dans la biosynthèse des lipides de la CPA et induit une accumulation d'antigènes lipidiques endogènes (phospholipides, sphingolipides). Ces derniers sont présentés en surface liés à la molécule CD1d permettant de former le complexe CD1d-lipide qui sera reconnu par les cellules iNKT via leur TCR. Cependant, la force de l'interaction TCR-lipide-CD1d n'est pas suffisante pour l'activation des cellules iNKT, en raison de la faible affinité de l'antigène endogène et nécessite une stimulation supplémentaire par des cytokines produites par les CPAs (IL-12, IL-18). Cette production de cytokines rentre en synergie avec la reconnaissance des antigènes endogènes par le TCR et permet d'activer les cellules iNKT qui vont sécréter, en réponse principalement, des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ ) [6, 8, 28].

Ce type d'activation peut également se produire en l'absence d'agent pathogène envahissant. En effet, dans certaines maladies métaboliques tels que l'obésité, le diabète de type 2 et la stéatose hépatique, une activation des cellules iNKT est observée. Lors de ces états pathologiques caractérisés par une inflammation stérile de bas grade, les tissus sont altérés et les cellules subissent un stress. Ce stress, détecté par les CPAs, induit l'activation de la voie de signalisation associée au stress. En réponse, ces cellules présenteraient des lipides endogènes via leur CD1d pour activer les cellules iNKT [29]. Il a été montré, *in vivo*, que des cellules myéloïdes stressées augmentaient la présentation de lipides endogènes entraînant une amélioration de l'activation des cellules iNKT [30].

Enfin, il a été démontré que les cellules iNKT peuvent être activées indépendamment du TCR, notamment en réponse à la stimulation par des cytokines, telles que l'IL-12 et l'IL-18. Chez la souris où l'expression du CD1d a été bloquée, l'infection au cytomégalovirus induit une activation des cellules iNKT prouvant que l'expression du CD1d n'est pas requise dans certaines pathologies. Les cellules iNKT activées produisent en réponse des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ ). En outre, en lien avec ce modèle d'activation, la stimulation du récepteur NK, NKG2D, peut activer les cellules iNKT en l'absence de la reconnaissance



d'antigène lipidique complexé au CD1d par le TCR. Ainsi, plusieurs ligands sont reconnus par le récepteur activateur NKG2D qui permet de déclencher une réponse effectrice cytolytique et/ou régulatrice (sécrétion de cytokines) des cellules iNKT. Ces ligands sont des protéines dites « ligands de stress » produits lors d'infections virales, lors de la tumorigenèse ou par des stimuli comme le stress oxydatif et les dommages à l'ADN. Chez l'Homme, on trouve les molécules de réponse au stress, MICA et MICB (MHC class I chain-related protein A and B) [31-36].

## 1.6. Rôles des iNKT

Les cellules iNKT possèdent une multitude de propriétés fonctionnelles et influencent le comportement de nombreuses autres cellules immunitaires.

Après activation, les cellules iNKT répondent très rapidement aux signaux TCR et/ou aux cytokines avec une production immédiate et abondante de cytokines et de chimiokines. A ce jour, il a été démontré que les cellules iNKT produisent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4, ainsi que de l'IL-2, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10, de l'IL-13, de l'IL-17, de l'IL-21 et du TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, éotaxine et RANTES [8].

La production de cette grande variété de cytokines permet d'activer et de réguler l'activité de plusieurs autres types de cellules immunitaires telles que les cellules NK, les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages. Par exemple, une étude a montré que les cellules iNKT activées modifient la fonction Treg de manière quantitative et qualitative des cellules T régulatrices via la sécrétion d'IL-2. En favorisant la différenciation des LT Tregs et en régulant leur activité suppressive, les cellules iNKT semblent jouer un rôle dans le maintien de la tolérance immunitaire [8, 37].

De plus, il a été montré que les cellules iNKT sont capables de tuer des cellules grâce à leurs fonctions cytotoxiques par l'expression de granzyme B, perforine et du ligand Fas (FasL).



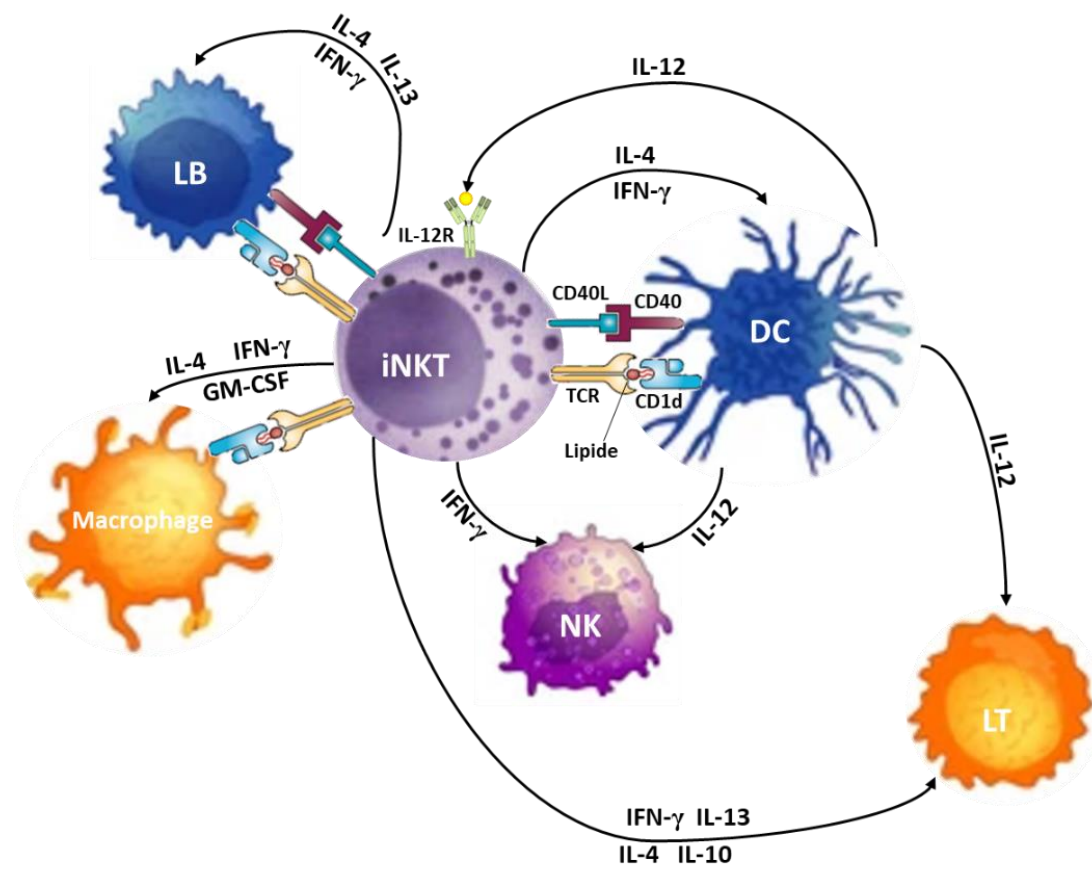


Figure 4 : Interactions entre les cellules iNKT et les cellules immunitaires - adaptée de " Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions" [24].

## 1.7. Interactions des cellules iNKT avec des cellules immunitaires

### *iNKT vs cellules dendritiques*

Lors d'une infection, les cellules dendritiques (DC) sont activées à partir des signaux émis par les récepteurs de type PRR (Pattern recognition receptor). Ces cellules internalisent le pathogène et présentent l'antigène lipidique via le CD1d. L'interaction CD1d-lipide-TCR conduit les cellules iNKT à augmenter l'expression de CD40L. La liaison de ce dernier à son récepteur CD40 (présent sur les DC) induit la production d'IL-12 par les DC et incite l'augmentation de l'expression du récepteur IL-12R par les cellules iNKT. Celles-ci activées par l'IL-12 vont produire des cytokines dont de l'INF- $\gamma$  et l'IL-4, qui à leur tour vont stimuler les DC à sécréter de l'IL-12 (Figure 6) [24, 38].

### *iNKT vs Lymphocyte T*

Les cellules iNKT favorisent l'activation et la différenciation des cellules T soit directement via des cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ ), soit indirectement par l'intermédiaire des DC (IL-12). Cela induit une amélioration des réponses aux antigènes protéiques par les LT CD4+ et CD8+ [5].

### *iNKT vs cellules NK*

L'IFN- $\gamma$  sécrétée par les cellules iNKT activées et l'IL-12 sécrétée par les DC activées, activent les cellules NK.

### *iNKT vs Lymphocyte B*

Si l'antigène lipidique, dès lors à la base de l'activation de la cellule iNKT, est également reconnu par la cellule B, il sera internalisé et présenté par le CD1d de celle-ci. Ce processus permet une production rapide d'immunoglobulines (IgM et IgG) par les lymphocytes B (LB) pendant l'infection. De surcroît, les cellules iNKT peuvent contribuer à la différenciation des cellules B en plasmocytes sous l'effet de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$ . [39]

### *iNKT vs Monocytes/Macrophages*

Les macrophages, étant des CPAs, peuvent activer les cellules iNKT via la présentation d'antigènes lipidiques chargés sur le CD1d. Par réciprocity, les cellules iNKT activées modulent l'activation et la polarisation phénotypique des macrophages modifiant leurs propriétés fonctionnelles. En outre, la production accrue d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT induit la phagocytose et la clairance bactérienne par les macrophages. Par l'action du GM-CSF, elles



peuvent également modifier la fonction des monocytes sanguins en les faisant évoluer vers un phénotype proche des cellules dendritiques. Enfin, la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 (sécréteurs de médiateurs anti-inflammatoires) par les cellules iNKT via l'IL-4 participe à la régulation du niveau d'inflammation dans le tissu adipeux [5, 38, 37].

## 1.8. Les cellules iNKT et les pathologies

Les cellules iNKT sont impliquées dans un certain nombre de maladies telles que certaines infections bactériennes, virales et protozoaires ou encore des maladies auto-immunes et certains cancers où elles peuvent jouer un rôle protecteur ou néfaste. Elles participent aussi au maintien de l'homéostasie de certains tissus, comme le tissu adipeux [40].

### 1.8.1. iNKT et infection

Dans certaines infections bactériennes, les cellules iNKT jouent un rôle protecteur durant l'infection. Par exemple, lors d'une infection par *Chlamydia pneumoniae*, il a été démontré que les cellules iNKT participent au développement d'une immunité protectrice contre une infection respiratoire chez l'hôte, en modulant fonctionnellement les DC [41]. En effet, lors de la stimulation du TCR par des antigènes microbiens, les cellules iNKT activées sécrètent des cytokines, IFN- $\gamma$ , IL-17A et IL-13, afin de recruter et d'activer diverses cellules immunitaires dont les DC. Activées, ces cellules sécrètent de l'IL-12 de manière plus importante, ayant pour effet l'expansion des cellules T CD8+ et CD4+ productrices d'IFN- $\gamma$ , permettant de diminuer la charge bactérienne dans les poumons. Quant à *Pseudomonas aeruginosa*, les cellules iNKT permettent une guérison rapide de la pneumonie. En effet, une fois activées par les DC, les cellules iNKT augmentent leur production d'IFN- $\gamma$  et de TNF $\alpha$  et induisent une augmentation de la phagocytose des macrophages, favorisant la clairance bactérienne [37].

Les cellules iNKT possèdent également un rôle dans l'immunité antivirale. Dans un modèle murin infecté par le virus de la grippe humaine (grippe A), il a été montré que les cellules iNKT stimulent les réponses immunitaires innées et réduisent la charge virale pulmonaire. Par la sécrétion des cytokines IL-4 et IL-12, les cellules iNKT induisent le recrutement des neutrophiles et des monocytes/macrophages jouant un rôle dans la clairance virale. En outre, il a été montré qu'en l'absence de cellules iNKT, l'infection grippale provoque la prolifération de cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes (MDSCs), composées de macrophages et de DC immatures, qui empêchent l'expansion des LT. Cela a pour conséquence l'inhibition des réponses immunitaires spécifiques à la grippe et une mortalité accrue chez les souris.



Cependant, un transfert de cellules iNKT chez ces souris permet d'abolir l'effet suppresseur des MDSCs de manière dépendante de CD1d et CD40. Ce qui donne lieu à un rétablissement de la réponse immunitaire et à une augmentation du taux de survie [37, 42, 43, 44].

Cependant, les cellules iNKT jouent parfois aussi un rôle pathogène en favorisant la maladie dans certaines situations par l'aggravation de l'inflammation suite à une sécrétion massive et rapide de cytokines [8, 41, 45]. Dans l'infection par *Candida albicans*, les cellules iNKT contribuent à l'exacerbation de l'infection. Les souris de type  $J\alpha 18^{-/-}$  (dépourvues de cellules iNKT) infectées possèdent un meilleur taux de survie par rapport aux souris de type sauvage infectées par *C. albicans*. De plus, chez les souris  $J\alpha 18^{-/-}$ , un transfert de cellules iNKT et leur activation par des antigènes glycolipidiques aggravent l'infection en provoquant une diminution importante du nombre de neutrophiles et une augmentation de la charge fongique dans les organes [41].

### 1.8.2. iNKT et cancer

En ce qui concerne les cancers, les cellules iNKT ont une activité antitumorale puissante grâce à leur activité cytotoxique. Une étude a montré, après administration du cancérigène chimique MCA (methylcholanthrene), que les souris dépourvues de cellules iNKT développent des tumeurs plus rapidement et plus abondamment, par rapport aux souris de types sauvages attestant d'un rôle de ces cellules dans la surveillance antitumorale [46]. Une fois activées, elles peuvent tuer directement les cellules tumorales exprimant CD1d par un relargage important de granules contenant du granzyme B et de la perforine, par la voie apoptotique Fas-FasL ou encore en exprimant la cytokine TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) qui induit l'apoptose des cellules cancéreuses [39]. Cette activité cytotoxique a été démontrée dans divers cancers tels que le mélanome, le gliome, le cancer du sein et dans les leucémies [2, 47]. À la suite de leur activation, les cellules iNKT peuvent également exercer une activité antitumorale de manière indirecte en modulant la fonction d'autres cellules immunitaires par la production de cytokines. La production d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT stimulées, active les cellules NK ainsi que les cellules dendritiques via l'interaction CD40/CD40L. Par réciprocité, les DC renforcent l'activation et le pouvoir cytotoxique des cellules iNKT par la sécrétion d'IL-12. Cette cytokine entraîne également l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ainsi que des cellules NK, des cellules ayant pour action de lyser les cellules tumorales. Chez les souris déficientes en cellules iNKT et traitées par MCA, l'injection d'IL-12 empêche le développement de tumeurs témoignant d'une activité protectrice essentielle de cette cytokine contre les cancers [48, 49-51].



Les tumeurs se développent dans un micro-environnement tumoral (TME). Celui-ci est constitué de vaisseaux sanguins, de fibroblastes, de matrice extracellulaire et de cellules immunitaires impliqués dans la progression tumorale. On y trouve, entre autres, des macrophages associés aux tumeurs (TAM) de type 1 (M1, pro-inflammatoire) et de type 2 (M2, protumoraux). Ceux-ci sécrètent des chimiokines, CCL2 et CCL20 (chemokine ligand 2 et 20), pour attirer les cellules iNKT vers le site tumoral. Par l'engagement de CD1d, CD40 et Fas-FasL, les cellules iNKT modulent la population TAM au sein du TME en tuant les M2 et en favorisant la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 permettant de retarder la progression tumorale. Dans plusieurs modèles de cancer, l'absence ou un faible nombre de cellules iNKT intratumorales entraîne une augmentation de macrophages M2 pro-angiogéniques favorisant le développement de la tumeur. Néanmoins, le transfert de cellules iNKT ou l'activation de ces cellules par  $\alpha$ -GalCer induit une diminution des macrophages M2 et une augmentation du nombre de macrophages M1 menant à un meilleur pronostic [37, 46, 50, 51].

### 1.9. CD1d et la présentation d'antigènes lipidiques

La molécule CD1d est une glycoprotéine transmembranaire non polymorphique faisant partie de la famille CD1. Le locus CD1, présent sur le chromosome 1 chez l'Homme, code pour 5 protéines différentes, CD1a, b, c, d et e. Toutes ont pour rôle de présenter des antigènes (glyco-)lipidiques (phospholipides, glycosphingolipides), d'origine exogène ou endogène, aux LT. Les molécules CD1, structurellement homologues au CMH de classe I, sont constituées d'une chaîne lourde (~45kDa) de trois domaines  $\alpha$  associés de manière non covalente à une chaîne légère la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2-m), un polypeptide situé sur le chromosome 15 humain. De nombreux types cellulaires expriment la molécule de CD1d tels que les DCs, les macrophages, LB, les hépatocytes, les thymocytes corticaux, *etc.* [5, 52-54].

La biosynthèse de la molécule CD1d a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) des CPAs (Figure 7). La chaîne polypeptidique lourde (chaîne  $\alpha$ ) nouvellement synthétisée, mais partiellement repliée, se retrouve au niveau de la membrane du RE. L'association de plusieurs protéines chaperonnes à cette chaîne, lui permet d'acquérir sa structure tridimensionnelle et la liaison à la  $\beta$ 2-m. Les protéines impliquées dans ce processus sont la calnexine, la calréticuline et la ERp57 (Endoplasmic Reticulum protein).



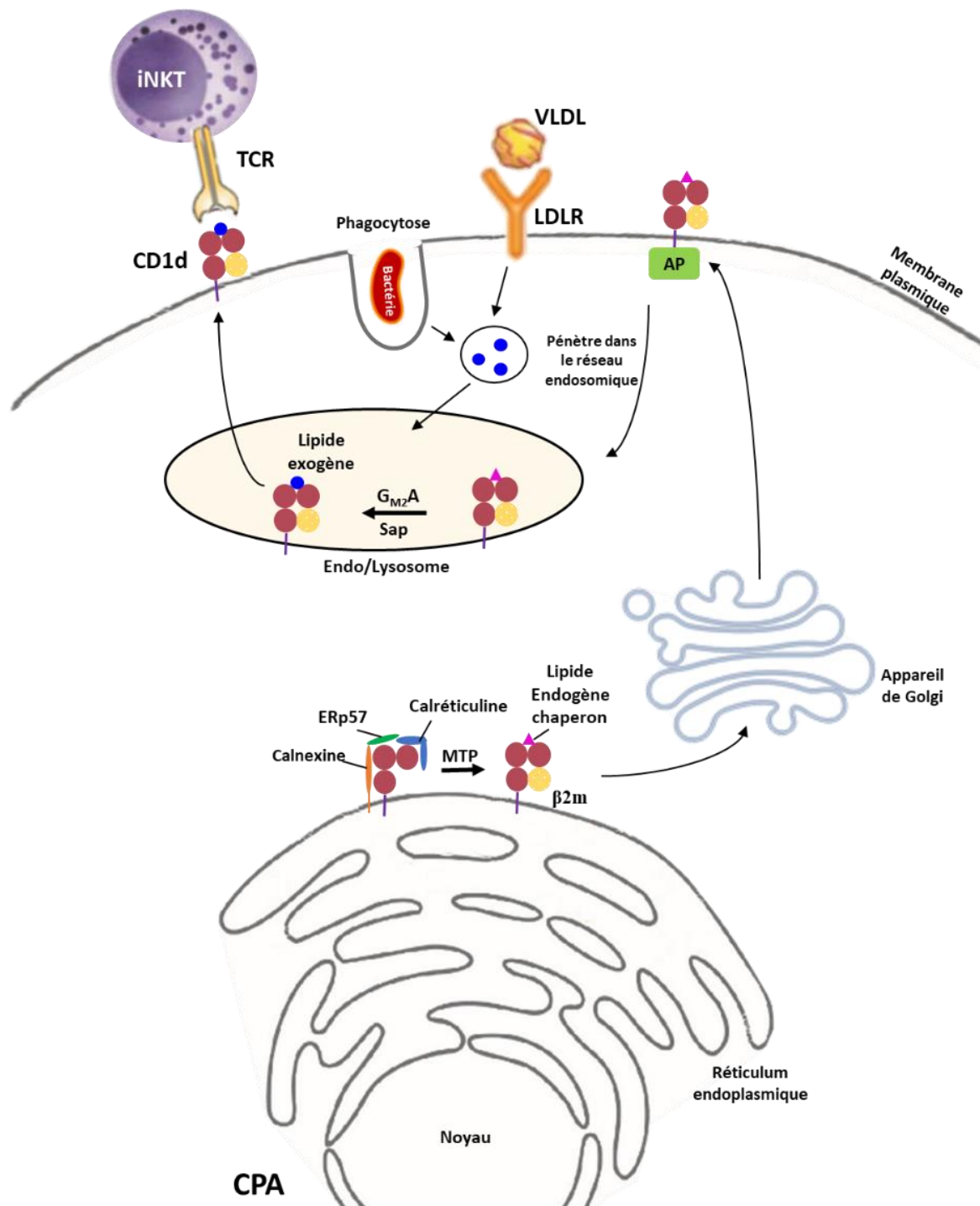


Figure 5 : Synthèse et chargement de la molécule CD1d - adaptée de " CD1d-restricted glycolipid antigens: presentation principles, recognition logic and functional consequences" [57, 59].

Après la biosynthèse, des lipides du soi endogènes (phosphatidylinositol, par exemple) remplissent le site de liaison de la molécule de CD1d. Ils semblent remplir une fonction de chaperonne en stabilisant la molécule CD1d et en facilitant son exportation hors du RE jusqu'à la rencontre avec un autre lipide autologue ou étranger. Cette liaison est facilitée par une protéine appelée MTP (Microsomal triglyceride transfer protein) [53, 55].

La molécule CD1d atteint la surface cellulaire via l'appareil de Golgi en empruntant la voie de sécrétion et subit ensuite plusieurs cycles d'internalisation et de recyclage entre la surface cellulaire et les compartiments endosomaux (Figure 7). Cette réinternalisation/endocytose est permise grâce à la présence d'un motif tyrosine codé sur la queue intracytoplasmique de la molécule CD1d qui se lie à des protéines adaptines (AP). Celles-ci possèdent aussi un rôle de transfert de la molécule de CD1d vers les endosomes tardifs et les lysosomes où elles s'accumulent. Une fois dans le compartiment endosomal/lysosomal, les trafics intracellulaires du CD1d croisent ceux des lipides et des échanges de lipides antigéniques au site de liaison du CD1d peuvent avoir lieu. Ce processus d'échange est régulé par des protéines endosomales, appelées protéines de transfert de lipides (LTP). Elles ont divers rôles comprenant la captation, le traitement, le transport et le chargement des lipides exogènes et endogènes. À ce jour, les saposines (Sap), la NPC1 (Niemann-Pick disease type C1) et GM2A (GM2 ganglioside activator) ont été identifiées comme étant des LTP. Tout ce mécanisme aboutit à la présentation du complexe CD1d-antigène à la surface de la CPA [56, 57, 58].

Les lipides exogènes peuvent être endocytés de différentes façons [57] :

- Par phagocytose
- Via les lectines de type C : ce sont des récepteurs qui interagissent avec la partie glucidique (mannose ou galactose) des glycolipides.
- Par les récepteurs Scavengers qui lient des lipoprotéines.
- Via la particule VLDL (very low density lipoprotein) et son récepteur LDLR : les lipides circulent dans le sang en se liant à des lipoprotéines (VLDL). Celles-ci sont composées d'apolipoprotéines telles que ApoE qui est reconnue par le récepteur LDLR. Cela induit l'endocytose, via un mécanisme impliquant la clathrine, du complexe lipide-VLDL-apoE dans le compartiment endosomal.
- Des lipides endogènes reconnus comme antigènes peuvent aussi être synthétisés dans le RE des CPAs dans certaines conditions de stress et directement chargés sur la molécule de CD1d et transportés vers la membrane via l'appareil de Golgi [30, 55].

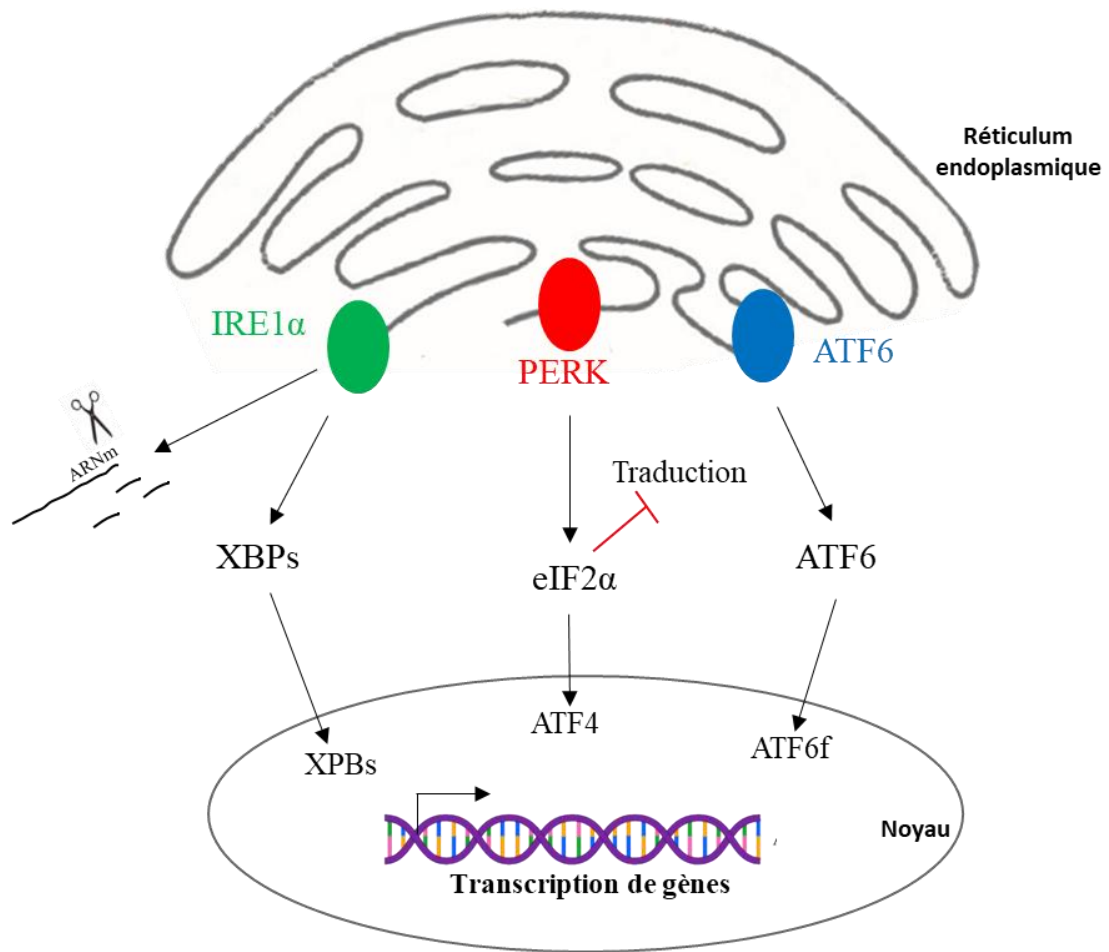


Figure 6 : Les trois voies de réponse au stress du RE - adaptée de "UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response" [62].

## 1.10. Le stress du RE

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite occupant un volume important dans les cellules eucaryotes. Il possède un rôle primordial dans la synthèse, le repliement et la maturation d'une grande partie des protéines membranaires et cytosoliques ainsi que dans la synthèse de lipides et le métabolisme du calcium [60]. Lorsque la cellule est soumise à certains stress tels que l'hypoxie, une carence en glucose ou encore une inflammation chronique, cela perturbe les fonctions majeures du RE [61]. Cette perturbation induit une accumulation de protéines mal repliées et incomplètes dans le RE. Cette situation est appelée stress du RE. Afin de restaurer l'homéostasie, le RE possède plusieurs systèmes de contrôle de qualité pour s'assurer du bon assemblage des protéines avant leur sortie du RE. Un de ces systèmes est l'UPR (unfolded protein response). Il est constitué de trois voies intracellulaires impliquant chacune un senseur situé au niveau de la membrane du RE capable de percevoir et de s'activer en réponse à l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE : l'endoribonucléase IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1), la kinase PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase) et le facteur ATF6 (activating transcription factor 6). Ces trois effecteurs de l'UPR ont la capacité d'activer différentes voies qui vont agir sur l'engorgement du RE par différents mécanismes (dégradation d'ARN, inhibition de la traduction, transcription de gènes impliqués dans le « folding » des protéines). L'UPR induit également l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, l'autophagie et le métabolisme cellulaire [60, 61].

L'activation de la voie IRE1 $\alpha$  induit la formation d'un ARNm épissé qui code pour le facteur de transcription (FT) XBP1s. Celui-ci contrôle l'expression de gènes impliqués dans la lipogénèse et dans l'expression de protéines chaperonnes. Cette voie augmente également la dégradation de certains ARNm via un processus appelé RIDD (regulated IRE1-dependent decay). En ce qui concerne la voie PERK, celle-ci inhibe le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ) en le phosphorylant. Cela a pour effet de diminuer la traduction des protéines. De plus, l'expression du FT ATF4 est augmentée. Celui-ci contrôle la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose et l'autophagie. Enfin, la protéine transmembranaire ATF6 est transloquée jusqu'à l'appareil de Golgi où elle sera clivée afin de former le FT ATF6f. Ce FT contrôle des gènes jouant un rôle dans le repliement des protéines pour favoriser la survie des cellules. Si le stress du RE persiste et que le retour à l'homéostasie est impossible, la mort cellulaire est induite [62, 63].



Dans la littérature, deux composés, la thapsigargine et tunicamycine, sont utilisés afin de modéliser le stress du RE in vitro [64]. La tunicamycine inhibe la glycosylation des protéines dans le RE conduisant à l'accumulation de protéines « unfolded ». La thapsigargine inhibe l'ATPase du RE responsable de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA, sarcoplasmic and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), ce qui induit une diminution des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE et une perte d'activité des chaperonnes dépendantes du calcium résultant également en une accumulation de protéines « unfolded ».

Différents inhibiteurs ciblant spécifiquement l'une ou l'autre voie de l'UPR permettent d'étudier l'implication de chacune d'entre elles. Dans ce travail, nous avons utilisé l'inhibiteur ISRIB (integrated stress response inhibitor) qui renverse l'effet inhibant de la phosphorylation de eIF2 et restore la traduction [65].



## 2. Objectifs

De nos jours, avec la révolution industrielle et un mode vie de plus en plus sédentaire, l'obésité est devenue un danger majeur pour la santé publique, les cas ayant triplé par le monde depuis 1975 [66]. Étant un facteur de risque pour diverses maladies chroniques telles que le diabète de type 2 (T2D), les maladies cardiovasculaires et certains cancers, l'obésité devient une des causes principales de décès prématuré [67].

Une perte d'immunosurveillance a été proposée comme facteur contribuant au risque accru de certains cancers chez le patient obèse. Des expériences en cours au sein du laboratoire démontrent un impact de l'obésité sur les cellules iNKT périphériques (Wilkin C et al., manuscrit en préparation). Non seulement, leur pourcentage tend à diminuer chez le patient obèse en comparaison aux individus contrôles mais elles montrent des signes d'activation (CD25 et CD69) et d'apoptose (CD95), mais aussi un switch vers un phénotype Th2 (augmentation du % des cellules CD4+ ayant un profil anti-inflammatoire et diminution du ratio IFN $\gamma$ /IL-4).

Quelles peuvent être les origines de cette modulation des cellules iNKT dans l'obésité ?

L'obésité est accompagnée de dyslipidémie, caractérisée par une modification des concentrations sanguines en cholestérol et triglycérides, et de dysglycémie. Les concentrations sanguines en acides gras libres sont également augmentées dans le sang particulièrement chez les patients avec insulino-résistance dans lesquels le taux de lipolyse des triglycérides stockés dans les adipocytes est augmenté [68]. Cet environnement riche en lipides cause des perturbations immuno-métaboliques sur les cellules sanguines, comme déjà décrit pour les cellules Natural Killer (NK) [69]. Sachant que les cellules iNKT peuvent être activées par la présentation d'antigènes lipidiques endogènes présentés via le CD1d par des CPAs, il est tentant de spéculer que cet environnement pourrait être propice au chargement sur le CD1d des monocytes de lipides antigéniques nouvellement synthétisés ou endocytés.

Cette hypothèse est renforcée par de récentes études qui ont montré qu'un stress du RE induit dans des CPAs d'origine myéloïde les rend capables d'activer des cellules iNKT par la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d [70-71]. De manière intéressante, des études antérieures réalisées au sein du laboratoire ont démontré que la culture de monocytes/macrophages dans un milieu enrichi en acides gras saturés (stéarate C18 :0 et





palmitate C16 :0), mais pas dans un milieu riche en acide gras insaturé (oléate, C18 :1), induit un stress du RE caractérisé par l'activation des voies PERK et IRE1 [72].

C'est sur base de l'ensemble de ces données que s'est inscrite l'hypothèse de mon mémoire : les acides gras saturés du sang pourraient jouer un rôle indirect sur la modulation des cellules iNKT dans l'obésité. En effet, notre hypothèse est que ces acides gras saturés induiraient un stress du RE dans les CPAs (monocytes, DCs) qui leur permettrait d'activer les cellules iNKT via la présentation d'antigènes lipidiques endogènes complexés au CD1d.

Pour étayer cette hypothèse, nous avons utilisé les cellules monocytaires THP1 classiques ou THP1-CD1d sur-exprimant le CD1d comme CPAs. Celles-ci ont été différenciées en macrophages avec du PMA et traitées avec différents types d'acides gras libres, un inducteur classique du stress du RE ou le glycolipide  $\alpha$ GalCer et ensuite mises en co-culture avec des cellules iNKT. L'activation des cellules iNKT a été évaluée par la mesure de cytokines dans les surnageants de la co-culture et la quantification de différents marqueurs membranaires des cellules iNKT.



## 3. Matériels & Méthodes

### 3.1. Solutions

#### $\alpha$ -GalCer :

Une solution stock de concentration de 1000 ng/mL est préparée, en ajoutant 1 mL de DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) à 1 mg d' $\alpha$ -GalCer conditionné sous forme de poudre (Avanti® Polar Lipids). La solution est chauffée à 80°C et subit une sonication pendant 10 minutes. Des aliquots de 10  $\mu$ L sont réalisés et conservés à -20°C. Pour préparer la solution de travail de 100 ng/mL, la solution stock (10  $\mu$ L) est d'abord agitée pendant 1 min, puis chauffée à 80°C pendant 2 min et à nouveau agitée pendant 1 min avant d'être diluée dans 5 mL de milieu RPMI-1640 supplémenté en L-glutamine (Biowest). Cette solution sera de nouveau agitée pendant 1 min, chauffée à 80°C pendant 2 min puis agitée 1 min. Elle peut être conservée à 4°C pendant maximum 2 semaines.

#### Milieu de culture des cellules iNKT :

Le milieu de culture est composé de milieu RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine dans lequel on ajoute 10 % de FBS (fetal bovin serum, Sigma-Aldrich), de l'HEPES 25 mM (Lonza™ BioWhittaker™), de la Pénicilline-streptomycine 100 units/mL (Biowest), du pyruvate de sodium 1 mM (Lonza™ BioWhittaker™), du 2-mercaptoéthanol 50  $\mu$ M (Gibco™), des acides aminés non essentiels 0,1 mM (Gibco™), des acides aminés essentiels 0,2 mM (Gibco™) et de l'amphotéricine B-fungizone 2,5  $\mu$ g/mL (Gibco™, ThermoFisher Scientific). Ce milieu est conservé jusqu'à un mois à 4°C.

#### Milieu de culture des cellules THP1 :

Le milieu de culture est composé de milieu RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine dans lequel est ajouté 10 % de FBS et de la Pénicilline-streptomycine 100 units/mL. Ce milieu est conservé jusqu'à deux mois à 4°C.

#### Solutions d'acides gras libres :

Chez l'humain, les acides gras libres (FFAs, free fatty acids), insolubles dans le sang, se lient à des protéines plasmatiques pour former un complexe soluble afin d'être transportés. Une de ces protéines est l'albumine. Ce concept est utilisé pour solubiliser les acides gras libres en utilisant de la BSA 5 % (0,05 g/mL, Sigma-Aldrich). La BSA est préparée dans du milieu



RPMI-1640 (5 g/100 mL). Cette solution est chauffée à 37°C pendant 1 heure et son pH est corrigé avec du NaOH pour atteindre 7 et maximiser la solubilisation de la BSA. En ce qui concerne les acides gras libres (C18:0 acide stéarique, C18:1 acide oléique et C16:0 acide palmitique, Sigma-Aldrich), ceux-ci, sont d'abord dissous dans une solution de NaOH 0,1 M pour obtenir une solution de concentration 0,1 M. Ces solutions sont chauffées environ 1 heure à la température de fusion de chaque lipide (75°C pour C18:0, 37°C pour C18:1 et 65°C pour C16:0) afin de les dissoudre totalement. Elles sont ensuite diluées 40x dans la solution RPMI/BSA 5 % pour obtenir des solutions de concentration 2,5 mM. Elles sont chauffées à 55°C pendant 10 min afin que les lipides se lient à l'albumine. Ensuite ces solutions sont filtrées (filtre 0,2 µm) et des *aliquots* sont stockés à -20°C. Avant utilisation, ces solutions 2,5 mM doivent être préchauffées à 65°C pendant 10 min pour les solubiliser.

#### Solution EDTA 0,5 M :

L'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique, Sigma-Aldrich) (9,3 g) est re-suspendu dans de l'eau désionisée (50 mL). Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH (Merck KGaA) et la solution est filtrée avec un filtre de 0,2 µm (Carl Roth). Cette solution est conservée à 4°C pour 1 mois.

#### Milentyi buffer :

Du FBS (250 µL) et de l'EDTA 0,5 M (250 µL) sont ajoutés à 50 mL de PBS. Le pH est ajusté à 7,2 avec du NaOH et la solution est filtrée avec un filtre de 0,2 µm. Cette solution est préparée et conservée à 4°C pendant 1 mois.

#### Solution de congélation :

Cette solution contient 80 % de FBS et 20 % de DMSO. Cette solution une fois préparée est mise à 4°C et doit être utilisée froide.

#### Coating Buffer (1x) :

Pour 100 mL, 10 mL de coating buffer (10x) et 90 mL d'eau désionisée sont mélangés.

#### Solution Wash Buffer :

0,5 mL de Tween 20 (Fisher BioReagents™) est ajouté à 1 L de PBS (phosphate-buffered saline, Biowest). Cette solution est conservée à 4°C pendant maximum 1 mois.

#### ELISA Diluent :

Pour 100 mL, 20 mL d'ELISA Diluent (5x) est ajouté à 80 mL d'eau désionisée.



Solution Stop H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M :

Pour 100 mL, 94,7 mL d'eau désionisée et 5,3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck KGaA) sont mélangés.  
Cette solution est conservée à 4°C pendant 1 mois.

FACS buffer (pH 7,4) :

Pour 50 mL, 48,5 mL de PBS et 1,5 mL de FBS sont mélangés.



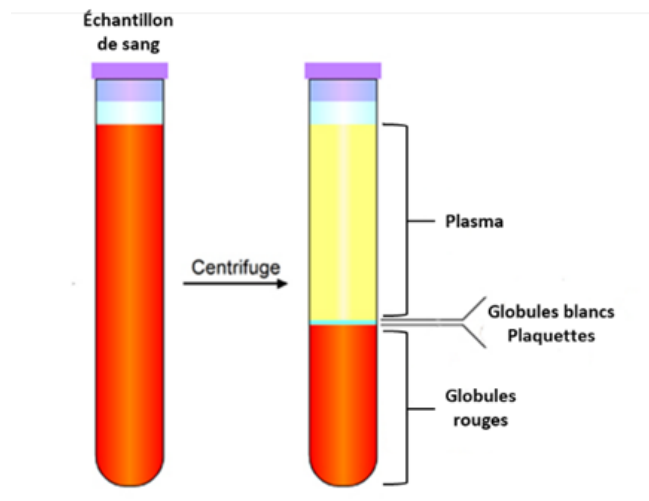


Figure 9 – Centrifugation des tubes EDTA – adapté de “Physiology illustration : Whole blood is composed of plasma and formed elements. – PhysiologyWeb” [73].

## 3.2. Obtention d'un stock de cellules iNKT humaines

Les cellules iNKT sont des cellules humaines primaires. Elles sont isolées à partir de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) puis leur prolifération est stimulée in vitro.

### 3.2.1. Isolation de PBMCs

L'isolation des PBMCs est effectuée à partir d'un buffy coat (Croix-rouge) ou d'un prélèvement de sang (60 mL) sur un volontaire sain dans des tubes contenant un anticoagulant (EDTA). Le sang est centrifugé à 1200 rpm (500 g) pendant 20 min à 4°C. Cette étape permet de séparer le plasma, apparaissant en haut du tube, et les cellules sanguines formant le culot (Figure 9). Le plasma est éliminé et le culot est re-suspendu dans du PBS jusqu'à obtenir un volume de 50 mL. L'isolation des PBMCs est réalisée à l'aide d'un gradient de densité Lymphoprep™ (Stemcell™) permettant de séparer les cellules mononucléaires, ayant une densité moindre, des globules rouges et granulocytes, ayant une densité cellulaire plus importante. 15 mL de lymphoprep sont déposés dans des tubes SepMate™ (Stemcell™). Ces tubes possèdent un insert permettant d'éviter que le sang et le Lymphoprep™ ne se mélangent, ce qui facilite ainsi la récolte des cellules mononucléées. Ensuite, environ 17 mL de sang dilué est ajouté soigneusement sur le lymphoprep™. Les tubes SepMate sont centrifugés à 2500 rpm (1200g) pendant 10 min à température ambiante (RT). Quatre couches sont obtenues : au fond du tube se trouvent les globules rouges et granulocytes, puis le Lymphoprep™, les PBMCs d'intérêt et enfin le plasma. Ce dernier est éliminé afin d'avoir accès aux PBMCs et ainsi de pouvoir les récupérer. Les PBMCs sont transférés dans un autre tube. Ils sont ensuite lavés 2 fois avec du PBS (500 g pendant 5 min à RT). Le surnageant est éliminé et les PBMCs sont re-suspendus dans 10 mL de PBS. Un comptage est effectué à l'aide du compteur de cellules automatique TC20™ (Bio-Rad, Tamise, Belgique).

### 3.2.2. Isolation des cellules iNKT

Les cellules iNKT humaines ont été isolées par sélection positive basée sur l'expression de la chaîne TCR V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 invariante (*Kit Anti-iNKT MicroBeads*, MiltenyiBiotec, réf 130-094-842).  $1 \times 10^8$  de PBMCs sont re-suspendus dans 400  $\mu$ L de Miltenyi buffer (voir § 3.1). Ensuite, afin d'isoler les cellules iNKT du reste des PBMCs, des microbilles anti-iNKT (Miltenyi Biotec) sont ajoutées (100  $\mu$ L/ $1 \times 10^8$  cellules). Ces microbilles interagissent directement avec



la chaîne  $\alpha$  invariante du TCR (V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18) des iNKT humain. Le tout est brièvement agité afin de bien mélanger les cellules et les microbilles et est incubé pendant 15 min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées en ajoutant 1 mL de Miltenyi buffer par  $1 \times 10^8$  cellules. Le surnageant est éliminé après centrifugation à 500 g pendant 10 min à RT. Les cellules sont re-suspendues dans 500  $\mu$ L de Miltenyi buffer par  $1 \times 10^8$  cellules. Pour purifier les cellules iNKT, un puissant aimant MACS<sup>®</sup> Separators (Miltenyi Biotec) et une colonne MACS<sup>®</sup> format L (Miltenyi Biotec) sont utilisés. La colonne est composée d'une matrice de sphères super paramagnétiques, capables de s'aimanter sous l'effet d'un champ magnétique extérieur. Cela a lieu lorsque la colonne est placée dans le puissant aimant MACS<sup>®</sup> Separators, amplifiant le champ magnétique et permettant de purifier efficacement les cellules iNKT couplées aux microbilles. Une fois la colonne placée dans le champ magnétique, elle est d'abord rincée avec 500  $\mu$ L de Miltenyi buffer pour ensuite ajouter la suspension cellulaire. Après l'écoulement total de la suspension cellulaire, les cellules retenues dans la colonne sont lavées trois fois avec 500  $\mu$ L de Miltenyi buffer. Après avoir enlevé la colonne de l'aimant, les cellules sont collectées en ajoutant 1 mL de Miltenyi buffer et en poussant fermement sur le piston dans la colonne. Les cellules iNKT purifiées sont lavées avec 1 mL de PBS puis centrifugées (500 g pendant 10 min à RT). Après un comptage, le surnageant est éliminé et les cellules sont re-suspendues dans du milieu iNKT supplémenté avec de l'IL-2 250 IU/mL et de l' $\alpha$ -GalCer (100 ng/mL) à une densité de  $1 \times 10^4/100 \mu$ L afin de procéder à l'induction de la prolifération détaillée ci-dessous.

### 3.2.3. Induction de la prolifération des cellules iNKT

#### 3.2.3.1. Génération de *feeders cells*

Les *feeder cells* sont des PBMCs qui ont été irradiées. Pour cela, un buffy coat est irradié dans un Gammacell (Iftitah, Malaisie) à une dose de 40 Gy (Gray). Ensuite, les *feeder cells* sont isolées en suivant le protocole détaillé au point 2.1. Après le comptage, des *aliquots* de  $5 \times 10^6$  de *feeder cells* sont générés pour ensuite les congeler en suivant le protocole décrit au point 2.3.3.

Une co-culture allogénique est réalisée. En effet, il est conseillé de mélanger deux buffy de deux donneurs différents à proportion égale pour maximiser la prolifération des cellules iNKT.



### 3.2.3.2. Prolifération

Afin d'obtenir un plus grand nombre de cellules iNKT, leur prolifération est induite avec l'aide d' $\alpha$ -GalCer et d'IL-2. Des cellules « feeder » sont utilisées comme CPA pour fournir l'antigène lipidique  $\alpha$ -GalCer aux cellules iNKT afin d'induire leur prolifération. Cette co-culture possède un ratio de 1 pour 5, c'est-à-dire qu'il y a 5 fois plus de feeder cell que de cellules iNKT.

Les *feeder* cells et les cellules iNKT sont lavées au PBS, centrifugées et re-suspendues dans du milieu iNKT (voir § 3.1) supplémenté avec de l'IL-2 250 IU/mL et de l' $\alpha$ -GalCer (100 ng/mL) ayant pour rôle de maintenir la survie des cellules iNKT et de les activer, respectivement. Les cellules iNKT sont re-suspendues à une densité de  $1 \times 10^4/100 \mu\text{L}$  de milieu iNKT et les *feeder* cells à une densité de  $5 \times 10^4/100 \mu\text{L}$  de milieu. La prolifération est réalisée dans une plaque 96 puits CELLSTAR® à fond rond et consiste à mélanger 100  $\mu\text{L}$  de cellules iNKT et 100  $\mu\text{L}$  de *feeder* cells dans chaque puits (proportion *feeder* cells-iNKT 5 pour 1). La culture est ensuite incubée à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 24h et 48h, 100  $\mu\text{L}$  de milieu est enlevé dans chaque puits et 100  $\mu\text{L}$  de milieu frais contenant uniquement de l'IL-2 (250 IU/mL) est ajouté. Ce changement de milieu est ensuite réalisé tous les 2-3 jours. Les cellules iNKT doivent proliférer deux semaines au minimum avant d'être utilisées. En effet, les *feeder* cells possèdent des dommages à l'ADN après leur irradiation gamma, les empêchant de proliférer et permettant leur disparition après 2 semaines de co-culture. Chaque semaine, la pureté est vérifiée par cytométrie de flux. Au bout de 3-4 semaines et si une pureté de 90 % - 100 % de cellules iNKT est atteinte dans chaque puits, les cellules sont congelées comme expliqué au point ci-dessous afin de les conserver.

### 3.2.3.3. Congélation

Les cellules sont placées dans un falcon et centrifugées à 1200 rpm (500 g) pendant 5 min à RT. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est re-suspendu dans 2 mL PBS. Un comptage au bleu de trypan 0,4 % (Amresco, Solon, Ohio) est effectué à l'aide du compteur de cellules automatique TC20™. Les cellules sont centrifugées puis re-suspendues dans du FBS 100 % (Sigma-Aldrich) à raison de  $1 \times 10^6/900 \mu\text{L}$ . 900 $\mu\text{L}$  de ces cellules sont ensuite placées dans des cryotubes (Greiner Bio-One, Vilvoorde, Belgique) auxquels 900 $\mu\text{L}$  de solution de congélation sont ajoutés goutte par goutte. Ensuite, les cryotubes sont rapidement déposés dans une boîte « Mister Freezer » (Mr. Frosty™, Nalgene, ThermoFisher Scientific™) placée dans

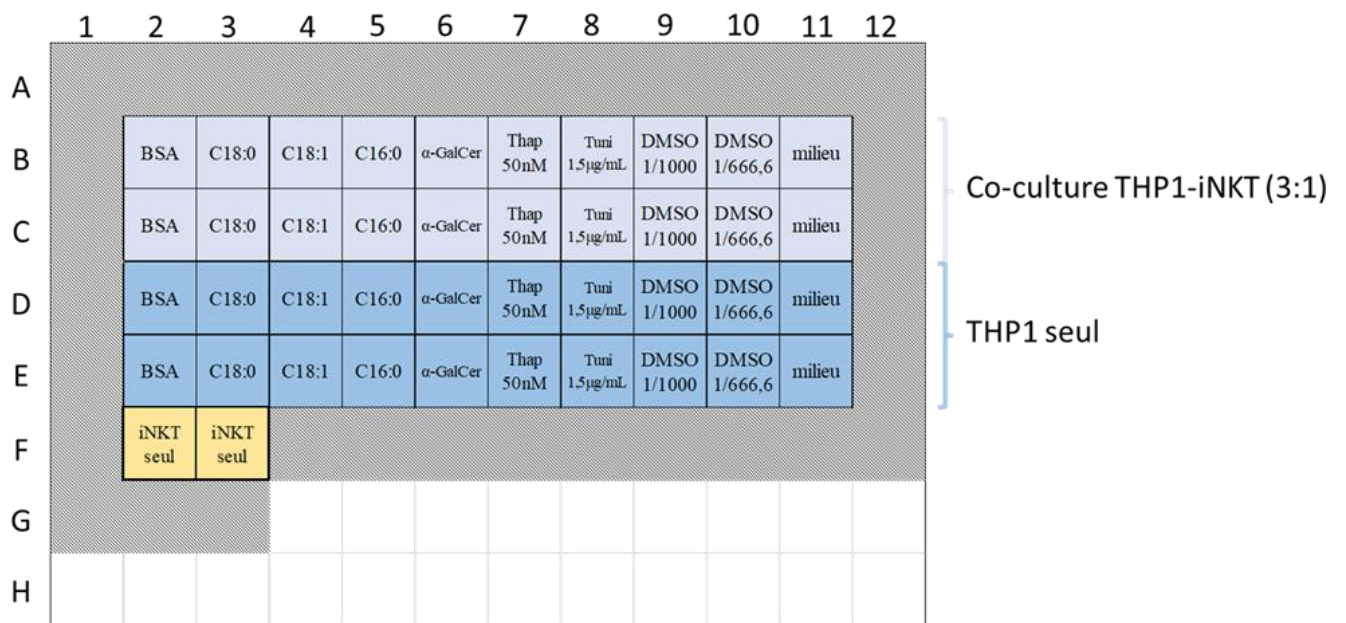


Figure 10 - Représentation schématique de la plaque 96 puits des co-cultures THP1-iNKT.

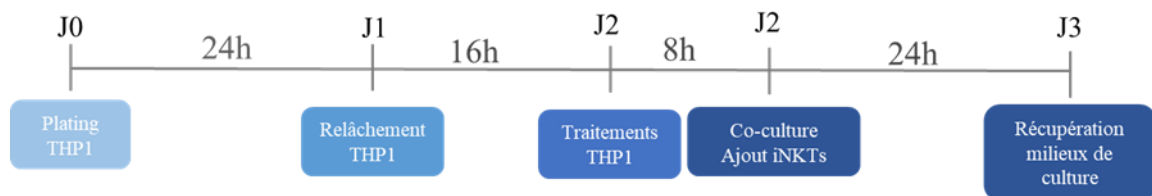


Figure 11 – Répartition dans le temps des différentes étapes lors des traitements.

un congélateur à -80°C. Cette boîte permet de diminuer la température des cellules à une vitesse d'un degré par minute. Après 24 heures, les cryotubes sont entreposés dans une boîte de stockage à -80°C ou dans l'azote liquide pour un stockage à long terme.

### 3.3. Culture des cellules THP1 classiques et THP1-CD1d

Les cellules THP1 (ATCC) sont des cellules monocytaires issues d'un patient avec une leucémie monocyttaire (THP-1). Les cellules THP1-CD1d surexpriment la glycoprotéine de surface CD1d présentatrice d'antigènes lipidiques et ont été décrites précédemment dans la littérature [74]. Ces cellules sont cultivées dans du RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine dans lequel est ajouté 10 % de FBS et de la Pénicilline-streptomycine 100 units/mL et maintenues à une densité de 0.5 à 1x10<sup>6</sup> cellules/ml.

#### 3.3.1. Différentiation des monocytes THP1 ou THP1-CD1d en macrophages à l'aide du PMA

Un comptage au bleu de trypan est effectué à l'aide du compteur de cellules automatique. 1,5.10<sup>5</sup> cellules THP1/200 µL de milieu de culture THP1 supplémenté avec du PMA 0,1 mg/mL (phorbol myristate acetate, Sigma-Aldrich) sont ajoutées par puits d'une plaque 96 puits à fond plat CELLSTAR<sup>®</sup> pour atteindre la confluence. Après 24h, le milieu THP1-PMA est retiré. Les puits sont ensuite lavés au PBS (200 µL/puits) et du milieu frais sans PMA est ajouté pendant 24h avant les traitements.

#### 3.3.2. Traitements des macrophages THP1 ou THP1 CD1d

Les traitements consistent à enlever le milieu de culture des puits et ajouter du milieu frais contenant les différents composés (200 µL/puits) dans les puits correspondants. Neuf conditions ont été expérimentées : 3 acides gras, dont 2 saturés (C18 :0 et C16 :0) et un mono-insaturé (C18 :1) et leur véhicule BSA (voir § 3.1), les 2 inducteurs classiques du stress du RE, la thapsigargine (Sigma-Aldrich) et la tunicamycine (Sigma-Aldrich) et leur véhicule DMSO et finalement le glycolipide  $\alpha$ -GalCer. Une condition contrôle milieu seul (RPMI) est également réalisée (Figures 10 et 11) :

- Les solutions stock (2,5 mM) d'acides gras libres C18:0, C18:1 et C16:0 et de BSA (voir § 3.1) sont diluées dans du milieu de culture frais pour obtenir une concentration finale de 200 µM. Pour cela, les solutions stocks sont chauffées à 65°C pendant 10 min pour solubiliser les lipides avant leur ajout dans le milieu.



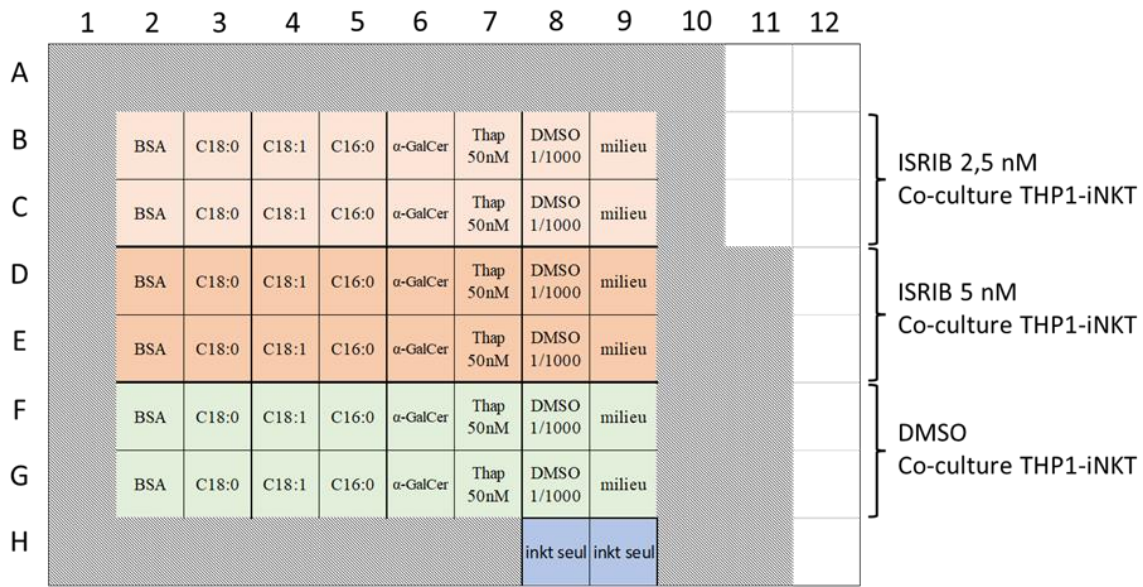


Figure 12 - Représentation schématique de la plaque 96 puits lors du traitement inhibiteur ISRIB des cellules

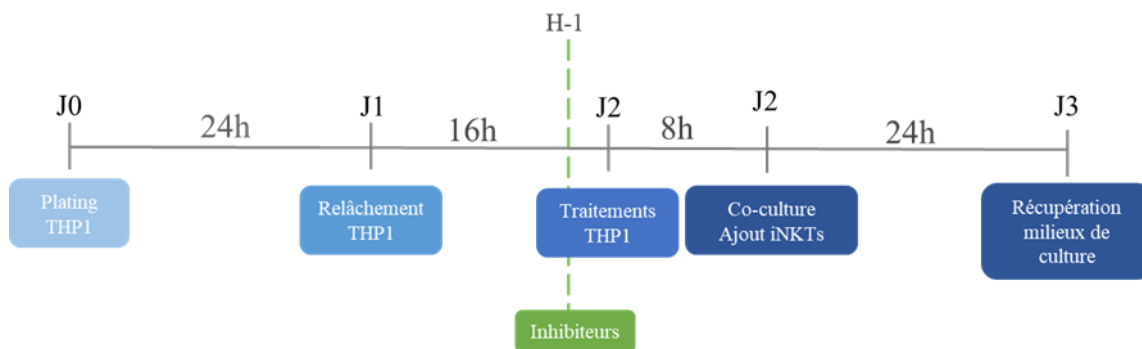


Figure 13 – Répartition dans le temps des différentes étapes lors du traitement inhibiteur.

- La thapsigargine (Thap) et la tunicamycine (Tuni), sont stockés à des concentrations de 50  $\mu$ M et 1 mg/mL dans du DMSO, respectivement. Ces solutions stocks sont diluées dans du milieu THP1 pour obtenir des concentrations finales de 50 nM pour la thapsigargine et de 1,5  $\mu$ g/mL pour la tunicamycine. Leur contrôle négatif est le DMSO dilué dans du milieu THP1 pour atteindre la même concentration finale que dans les conditions Thap et Tuni.
- L' $\alpha$ -GalCer, jouant le rôle de contrôle positif de l'activation des cellules iNKT, est utilisé à une concentration de 100 ng/mL dans du milieu THP1.
- La condition milieu consiste à l'ajout de milieu THP1.

Pour démontrer que les acides gras libres induisent un stress du RE chez les CPAs qui les amèneraient à améliorer l'activation des cellules iNKT, un inhibiteur du stress du RE est utilisé, ISRIB (integrated stress response inhibitor), inhibant la voie PERK-EIF2a.

Pour cela, l'inhibiteur est d'abord ajouté (200  $\mu$ L/puits) sur les THP1+PMA. Deux concentrations ont été testées : 2,5 nM et 5 nM à partir d'une solution stock de 5 mM. Après 1h d'incubation, les différents traitements sont ajoutés (100  $\mu$ L/puits) comme décrits ci-dessus avec 100  $\mu$ L/puits d'inhibiteur ISRIB ou de DMSO pour les deux concentrations testées (2,5 nM et 5 nM). Un contrôle négatif est réalisé en ajoutant du DMSO à la place de l'inhibiteur (Figure 12 et 13).

### 3.4. Co-culture cellules iNKT-macrophages THP1 ou THP1-CD1d

Afin d'étayer l'hypothèse que les CPAs activeraient les cellules iNKT lorsqu'elles sont dans un environnement riche en acides gras libres, une co-culture entre les macrophages THP1-CD1d traités avec des acides gras libres et les cellules iNKT est effectuée avant d'évaluer l'état d'activation de ces dernières.

#### 3.4.1. Décongélation et mises au repos des cellules iNKT

Pour démontrer que les cellules iNKT sont activées uniquement par l'intermédiaire de notre traitement, il est important que les cellules iNKT soient d'abord mises au repos.

Les cryotubes de cellules iNKT sont décongelés au bain-marie 37°C. Après environ 1 min, les cellules sont transvasées dans un falcon préalablement rempli d'environ 10 mL de PBS préchauffé à 37°C. Après environ 1 min, les cellules sont transvasées dans un falcon



préalablement rempli d'environ 10 mL de PBS préchauffé à 37°C. Les cellules iNKT sont lavées deux fois avec du PBS afin d'éliminer traces de DMSO, toxiques pour les cellules. Elles sont ensuite re-suspendues dans du milieu iNKT supplémenté d'IL-2 250 IU/mL (recombinant Human IL-2, PeproTech®) à une densité de  $2 \times 10^5$  cellules /200 µL de milieu afin de procéder à leur mise au repos. Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits CELLSTAR® à fond rond (Greiner Bio-One) en respectant la quantité de 200 µL par puits. Elles sont ensuite incubées à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>.

L'obtention de cellules iNKT au repos (*rested cells*) dure 10 jours et consiste à diminuer graduellement la concentration d'IL-2 dans le milieu de culture. Après 3 jours dans un milieu iNKT avec de l'IL-2 250 IU/mL, les cellules iNKT sont re-suspendues dans du milieu iNKT IL-2 100 IU/mL. Pour cela, 150 µL de l'ancien milieu est enlevé du puits et est remplacé par 150 µL à nouveau milieu avec une concentration moindre en IL-2. Ensuite, cette étape est réalisée tous les deux ou trois jours en passant par 50 IU/mL, 20 IU/mL et enfin 10 IU/mL d'IL-2. Après deux jours supplémentaires, les cellules iNKT sont considérées comme au repos.

### 3.4.2. Co-cultures

Après un traitement de 8h, les macrophages THP1 ou THP1-CD1d sont lavés puis co-cultivés avec les cellules iNKT. Pour cela, les cellules iNKT au repos, présentes dans les puits d'une plaque 96 puits, sont remises en suspension et transférées dans un falcon afin de récupérer un maximum de cellules iNKT. Les puits sont lavés avec du PBS et celui-ci est ensuite transvasé dans le falcon afin de récupérer un maximum de cellules iNKT. Après centrifugation à 1200 rpm (500 g) durant 5 min à RT, le surnageant est éliminé et les cellules iNKT sont re-suspendues dans 2 mL de PBS. Un comptage est effectué au bleu de trypan à l'aide du compteur de cellules automatique. Les cellules iNKT sont de nouveau centrifugées (1200 rpm (500 g) durant 5 min à RT) et re-suspendues dans du milieu iNKT contenant 10 IU/mL d'IL-2 en respectant la densité de  $0,5 \times 10^5$  iNKT/250 µL (ratio THP1/iNKT = 3/1). Ensuite, les cellules iNKT sont ajoutées (250 µL/puits) sur les macrophages THP1 préalablement lavés. Pour les conditions contrôles, c'est-à-dire macrophages THP1 seuls, uniquement du milieu IL-2 10 IU/mL est ajouté (250µL/puits) (Figure 10). Ces contrôles permettent de vérifier que les macrophages THP1 traités ou non ne produisent pas les cytokines (IFN-γ et IL-4) qui seront dosées pour estimer l'activation des cellules iNKT. Enfin, un contrôle où seules les cellules iNKT sont ajoutées (250µL/puits) permet de vérifier qu'elles sont bien au repos (Figure 10). Après 24h de co-culture, la plaque est centrifugée afin de faire adhérer les cellules iNKT dans le fond des puits

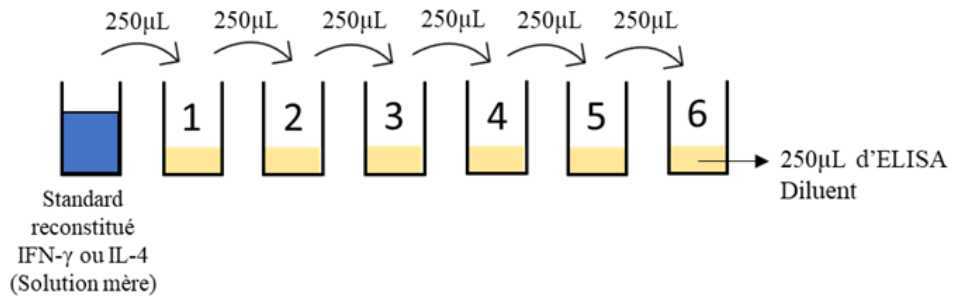


Figure 14 - Dilution en série du standard

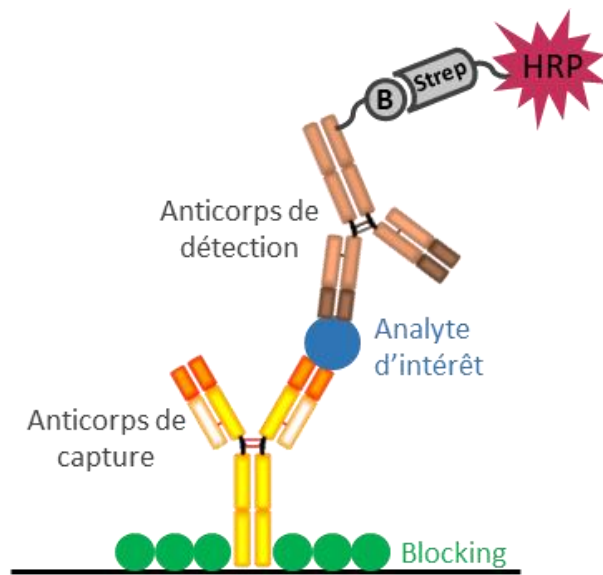


Figure 15 - ELISA sandwich

et les surnageants de culture sont collectés dans des eppendorfs et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant de réaliser les ELISA. Les cellules iNKT seront récupérées et analysées au cytomètre en flux.

### 3.5. ELISA

#### Reconstitution du standard

Premièrement, le standard (IFN- $\gamma$  500 pg/mL ou IL-4 200 pg/mL, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) est reconstitué dans un volume indiqué sur le flacon avec de l'*ELISA Diluent* pour l'IFN- $\gamma$  ou avec de l'eau distillée pour l'IL-4. Après avoir mélangé et attendu 15 min, une dilution en série du standard est réalisée afin d'obtenir la courbe de calibration. Pour cela, 250  $\mu\text{L}$  d'*ELISA Diluent* sont ajoutés dans des eppendorfs annotés de 1 à 6. Ensuite, 250  $\mu\text{L}$  de la solution mère sont ajoutés au 250  $\mu\text{L}$  d'*ELISA Diluent* de l'eppendorf n°1 pour obtenir une solution de concentration deux fois moindre. De cette solution, 250  $\mu\text{L}$  sont prélevés et ajoutés au 250  $\mu\text{L}$  d'*ELISA Diluent* du deuxième eppendorf et ainsi de suite jusqu'au sixième eppendorf, en faisant attention à bien mélanger entre chaque dilution. À chaque dilution, la concentration du standard est divisée par deux (Figure 14). Chaque solution est mise sur plaque en duplicata, ainsi qu'un blanc en ajoutant uniquement de l'*ELISA Diluent*.

Afin de doser les cytokines produites par les cellules iNKT en réponse à une stimulation, un test ELISA est effectué sur les différents milieux de culture récupérés à la fin de la coculture. Les kits ELISA (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) pour doser l'IFN- $\gamma$  (Catalog # 88-7316-88) et l'IL-4 (Catalog # 88-7046-88) ont été utilisés. Ces deux kits sont basés sur la méthode ELISA sandwich (Figure 15) qui consiste à utiliser deux anticorps reconnaissant des épitopes différents de l'antigène à doser. Les puits d'une plaque Corning<sup>TM</sup> Costar<sup>TM</sup> 9018 (96 puits) sont *coated* (100  $\mu\text{L}$ /puits) avec un anticorps de capture dilué dans du coating buffer. La plaque est recouverte de parafilm et incubée à  $4^{\circ}\text{C}$  toute la nuit. Le lendemain, les puits sont lavés trois fois avec 300  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer*. Ensuite, un blocage est réalisé en ajoutant 200  $\mu\text{L}$ /puits d'*ELISA Diluent*. L'étape de blocage permet d'empêcher les liaisons non spécifiques avec la plaque. Celle-ci est recouverte de parafilm et est incubée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Les échantillons sont décongelés sur glace.

Les puits sont lavés une fois avec le *Wash Buffer* avant d'ajouter 100  $\mu\text{L}$ /puits d'échantillons de milieux de culture ou de standard ou d'*ELISA Diluent* pour le blanc. Les différentes conditions, dilutions du standard et le blanc sont effectués en duplicata. La plaque recouverte



de parafilm est incubée pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Les puits sont ensuite lavés cinq fois avec le *Wash Buffer*. Puis, 100 µL d'anticorps de détection dilués dans l'*ELISA Diluent* sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est recouverte de parafilm et incubée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Les puits sont lavés cinq fois avec du *Wash Buffer*. Ensuite, 100µL d'enzymes Streptavidine-HRP diluées dans de l'*ELISA Diluent* sont ajoutés dans chaque puits. La plaque scellée à l'aide d'un parafilm est incubée 30 min sous agitation à température ambiante. Les puits sont lavés sept fois avec du *Wash Buffer* en s'assurant que chaque lavage dure 1 min. La solution de substrat TMB est ajoutée dans chaque puits (100 µL/puits). La plaque est ensuite recouverte de papier aluminium. Après 15 min d'incubation à température ambiante sous agitation, 100 µL de solution Stop sont ajoutés dans chaque puits pour arrêter la réaction. Enfin, la plaque est lue à l'aide du lecteur de plaque Infinite® M200 (TECAN) aux longueurs d'onde 450 nm et 570 nm. Cette technique étant basée sur une mesure enzymatique colorimétrique, le signal mesuré sera directement proportionnel à la quantité de cytokines présentes dans le milieu de culture.

La quantité d'antigène est calculée et analysée dans chaque échantillon. Tout d'abord, les absorbances mesurées à 570 nm sont soustraites des absorbances mesurées à 450 nm afin d'éliminer tout résidu bleu qui pourrait interférer avec l'absorbance à 450 nm. La moyenne des duplicatas est calculée. Ensuite, les valeurs d'absorbances du standard obtenues vont permettre de réaliser la droite d'étalon utile pour déterminer les concentrations de cytokines. Pour cela, un graphe représentant l'absorbance en fonction de la concentration en cytokine est tracé. La courbe d'étalon tracée permet d'obtenir la formule de la droite régression linéaire qui servira à calculer la concentration en cytokine pour chaque échantillon à partir de l'absorbance de l'échantillon.

### 3.6. Cytométrie en flux (FACS)

La cytométrie en flux est une technique permettant d'analyser rapidement et individuellement chaque cellule faisant partie d'une population hétérogène. Les paramètres mesurés sont la taille, la granulosité (structure intracellulaire), et l'intensité de fluorescence émise par certains marqueurs spécifiques en réponse à l'excitation d'un laser.

Cette technologie consiste à mettre en suspension dans un liquide les cellules à analyser pour ensuite, les injecter au sein du système fluide. Celui-ci a pour rôle de canaliser et séparer les cellules afin qu'elles passent une par une devant le laser grâce au principe de focalisation hydrodynamique, utilisant un liquide à haute pression venant comprimer et aligner





les cellules. Les cellules vont ainsi passer devant les lasers ce qui aura pour conséquence d'exciter le fluorochrome. Ce fluorochrome va émettre en réponse un signal sous forme de photons qui vont être filtrés, détectés et amplifiés grâce au système optique composé de miroirs dichroïques et de photomultiplicateurs, en plus des lasers. Ce système optique permet de recueillir différentes informations :

- Les paramètres morphologiques de la cellule sont déterminés en mesurant les phénomènes de diffusion de la lumière sur la cellule. Lorsque la lumière est diffusée dans l'axe du laser ( $180^\circ$ ), le signal renseigne sur la taille de la cellule (FSC : forward scatter). Lorsque la lumière est mesurée à un angle de  $90^\circ$ , le signal renseigne sur la granulosité de la cellule (SSC : Side scatter).
- Le niveau d'expression d'un marqueur spécifique en surface cellulaire. Pour cela, des anticorps liés à des fluorochromes sont utilisés. Une fois excité par le laser, le fluorochrome réémet de la lumière de longueur d'onde supérieure à celle d'excitation.
- La viabilité des cellules en utilisant un colorant fluorescent se liant aux amines primaires des protéines. Contrairement aux cellules vivantes, le colorant pénètre les cellules mortes, ces dernières auront donc une fluorescence plus élevée que les cellules vivantes.

Une fois que ces signaux, sous forme de photon, ont été détectés par le photomultiplicateur, ils sont amplifiés et convertis en signaux numériques par le système électronique.

Dans le cadre de ce mémoire, le cytomètre en flux CytoFLEX (Beckman Coulter) a été utilisé. Grâce à ses 3 lasers, il peut mesurer 13 paramètres de fluorescence simultanément.

### 3.6.1. Compensations, titrations des anticorps et contrôles FMO

Afin d'exploiter les résultats, différentes considérations doivent être prises en compte. Premièrement, il faut prendre en compte les chevauchements spectraux possibles lors de l'utilisation de plusieurs fluorochromes. Pour éviter les signaux faux positifs, ces chevauchements sont supprimés mathématiquement à l'aide d'un logiciel permettant de garder les signaux spécifiques uniquement. Cette méthode s'appelle la compensation. Pour cela, pour chaque fluorochrome utilisé, une goutte de billes de compensations (UltraComp eBeads, eBiosciences) est incubée avec 1  $\mu\text{L}$  de l'anticorps correspondant pendant 10 min à  $4^\circ\text{C}$  dans un le noir dans un tube FACS (Corning<sup>®</sup>). Ensuite, 300  $\mu\text{L}$  de FACS buffer est ajouté avant que la suspension de billes soit analysée au cytomètre en flux pour établir les compensations.

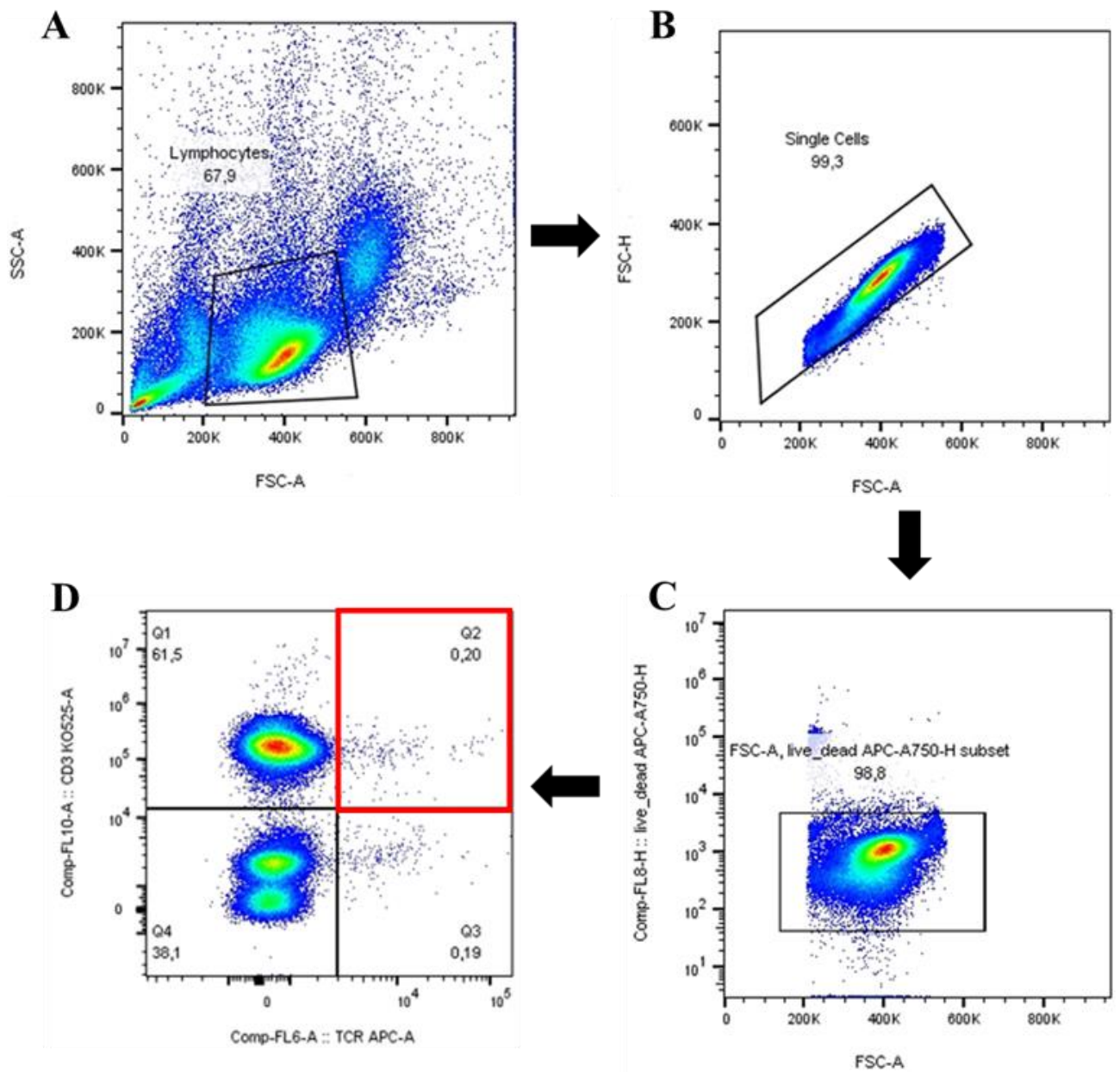


Figure 16 – Stratégie de « gating » employée pour isoler les cellules iNKT. (A) Sélection des lymphocytes. (B) Exclusion des doublets cellulaires. (C) Sélection des cellules vivantes. (D) Sélection des cellules positives pour les marqueurs CD3 et Va24Ja18 (TCR).

Une autre considération à prendre en compte est la concentration optimale de chaque anticorps à utiliser afin d'obtenir un signal le plus discriminant avec un bruit de fond minimale. Pour cela, chaque anticorps est titré.

Enfin, il est important de réaliser les contrôles FMO (fluorescence minus one). Lors de l'analyse des données, il est parfois difficile de discriminer précisément la population positive de la population négative à cause du niveau d'expression variable ou faible d'un marqueur. Ces contrôles vont donc permettre de séparer minutieusement les deux populations et ainsi d'effectuer une stratégie de « *gating* » de qualité. Ce contrôle consiste à marquer les cellules avec tous les fluorochromes sauf un. Lors de l'analyse du FMO considéré, seule la population qui n'exprime pas ce marqueur est observée (population négative). Cela permet de placer les « *gates* » de façon précise afin de séparer les deux populations et de prendre en compte toutes influences des autres fluorochromes sur celui non utilisé.

$1 \times 10^6$  de PBMCs sont placés dans des tubes FACS afin de procéder aux compensations, aux titrations des anticorps et aux contrôles FMO pour calibrer le cytomètre de flux.

La technique de cytométrie en flux a été utilisée pour réaliser la caractérisation des cellules iNKT et des cellules THP1.

### 3.6.2. Stratégie de *gating* des cellules iNKT humaines

A partir des contrôles FMO effectués, la stratégie de « *gating* » suivante a été réalisée. Les cellules sont d'abord discriminées sur base de leur taille et de leur granulosité en utilisant leurs propriétés de diffusion FSC et SSC. Les lymphocytes étant de petites tailles et possédant une faible granulosité, se distinguent des monocytes et des débris cellulaires (Figure 16A). Afin de s'assurer que les cellules sont comptées individuellement, les doublets cellulaires sont exclus. Ceux-ci auront une double surface (A : area) mais une hauteur (H : height) identique que les cellules individuelles (Figure 16B). Les cellules vivantes sont sélectionnées grâce au marqueur de viabilité Zombie NIR<sup>TM</sup>. En effet, celui-ci pénètre les cellules mortes dont les membranes sont compromises (Figure 16C). Enfin les cellules iNKT humaines sont identifiées en sélectionnant les marqueurs cellulaires qu'elles expriment, c'est-à-dire CD3 et V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 (TCR) (Figure 16D, encadré rouge).

<b>Anticorps</b>	<b>Fluorochromes</b>
<b>Cellules iNKT</b>	
CD3 (BioLegend)	BV510
V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 (BioLegend)	APC
CD25 (BioLegend)	PE/Cy7
CD69 (BioLegend)	FITC
CD95 (BioLegend)	PE
CD4 (BioLegend)	BV421
CD8 (BioLegend)	PerCp
Zombie NIR	APC/Cy7
<b>Cellules THP1</b>	
CD1d (BioLegend)	APC
Zombie Green	FITC

*Tableau 1 – Volumes ajoutés et concentrations des différents anticorps et fluorochromes respectifs.*

### 3.6.3. Caractérisation des cellules iNKT en prolifération

Pour caractériser les cellules iNKT, les cellules sont placées dans un tube FACS et lavées 2 fois avec du PBS (centrifugation 500 g, 5 min, 4°C). Elles sont ensuite re-suspendues dans 100 µL de marqueur de viabilité Zombie NIR™ (BioLegend) et incubées pendant 20 min à RT dans le noir. Les cellules sont lavées en ajoutant 2 mL de tampon FACS. Celui-ci a pour rôle d'inactiver le Zombie NIR restant et d'empêcher les liaisons aspécifiques des anticorps. Après centrifugation (500 g pendant 5 min à 4°C) et élimination du surnageant, les tubes sont agités. Les différents anticorps sont ensuite ajoutés aux concentrations établies par les expériences de titration (Tableau 1) et sont incubés pendant 20 min à 4°C dans le noir. Les cellules sont de nouveau lavées à l'aide de PBS comme décrit précédemment. Le surnageant est enfin éliminé et les cellules sont re-suspendues dans 300 µL de PBS avant d'être analysées sur le CytoFLEX®.

### 3.6.4. Caractérisation des cellules iNKT à la suite de la co-culture

Pour la caractérisation des cellules iNKT après co-culture avec les macrophages THP1 (voir § 3.4.2), les cellules iNKT sont collectées et placées dans des eppendorfs. Des cellules monocytaires THP1 mortes ( $0,5 \times 10^6$ ) sont ajoutées dans chaque eppendorf. Ces cellules THP1 ont préalablement été chauffées au bain-marie à 65°C pendant 10 min et mises immédiatement après sur glace afin d'induire leur mort cellulaire. Comme le nombre de cellules iNKT collectées après la co-culture est faible, des cellules THP1 mortes sont ajoutées pour augmenter le nombre d'évènements et perdre le moins possible de cellules iNKT. Les cellules (iNKT+THP1 mortes) sont ensuite lavées avec du PBS puis centrifugées (500 g pendant 5 min à 4°C). Le surnageant est éliminé par aspiration. Les cellules sont ensuite re-suspendues dans 75 µL de marqueur de viabilité Zombie NIR™ et incubées pendant 20 min à RT dans le noir. Les cellules sont lavées en ajoutant 2 mL de tampon FACS. Après centrifugation (500 g pendant 5 min à 4°C) et élimination du surnageant, les tubes sont agités. Les différents anticorps sont ensuite ajoutés (Tableau 1) et sont incubés pendant 20 min à 4°C dans le noir. Les cellules sont de nouveau lavées à l'aide de PBS comme décrit précédemment. Le surnageant est enfin éliminé et les cellules sont re-suspendues dans 100µL de PBS. Chaque échantillon est transféré dans un puits d'une plaque 96 puits CELLSTAR® à fond rond pour procéder à l'analyse de cytométrie en flux.



### 3.6.5. Caractérisation des cellules THP1

Concernant les cellules THP1, le protocole est identique à celui décrit au paragraphe 3.6.4 à l'exception du marqueur de viabilité utilisé qui est ici le Zombie GREEN™ (BioLegend). De plus, seul l'anticorps anti-CD1d est utilisé pour caractériser ces cellules (Tableau 1).  $0,5 \times 10^6$  de cellules THP1 classiques ou THP1-CD1d sont prélevées et placées dans un tube FACS.

### 3.7. Graphiques et analyses statistiques

Les données recueillies au cytomètre en flux CytoFLEX sont analysées en utilisant le logiciel FlowJo V.10.4 (BD Biosciences). L'analyse statistique de ces données a été effectuée à l'aide du programme GraphPad Prism (version 8.0.1 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, Californie, États-Unis). Un t-test a été utilisé pour comparer l'expression de la protéine CD1d entre les cellules THP1 classiques et les cellules THP1-CD1d. Un test « one-way » ANOVA a été utilisé pour comparer l'expression de l'IFN- $\gamma$  ou de l'IL-4 des cellules iNKT après la co-culture. L'analyse est considérée statistiquement significative si la *p-value* calculée vaut  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) ou  $p < 0,001$  (\*\*\*) .



Anticorps	Dilutions	Concentrations
CD3	1 µl, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL	2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL, 10 µg/mL
Vα24Jα18	1 µl, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL	
CD25	1 µl, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL	
CD69	1 µl, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL	
CD95	1 µl, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL	
CD4	1 µl, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL	1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL
CD8	1 µl, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL	

Tableau 2 – Dilutions et concentrations testées pour chaque anticorps du panel

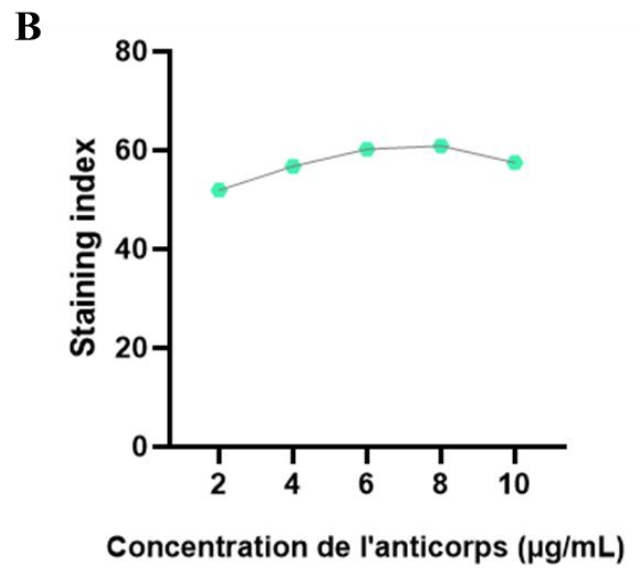
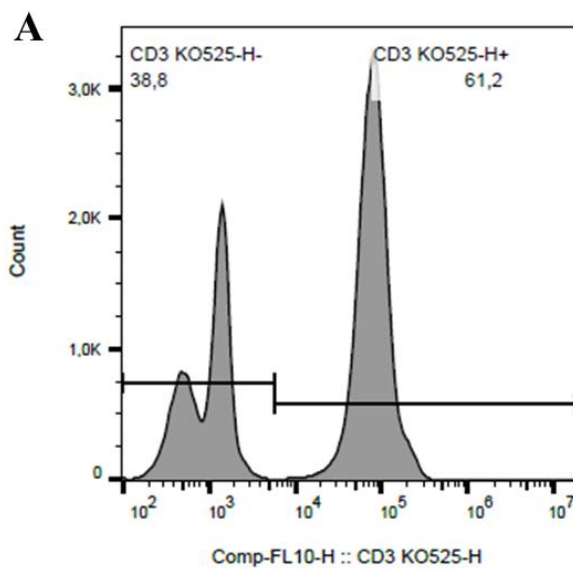


Figure 17 – Titration de l'anticorps CD3. (A) Histogramme illustrant la discrimination des populations cellulaires exprimant (à droite) ou non (à gauche) le marqueur CD3. (B) Graphique représentant le staining index calculé pour chaque concentration (µg/mL) d'anticorps.

Anticorps	Concentrations
CD3	6 µg/mL
Vα24Jα18	10 µg/mL
CD25	10 µg/mL
CD69	10 µg/mL
CD95	6 µg/mL
CD4	3 µg/mL
CD8	3 µg/mL

Tableau 3 – Concentrations sélectionnées pour chaque anticorps

## 4. Résultats

### 4.1. Mises au point du panel d'anticorps pour la caractérisation des cellules iNKT humaines

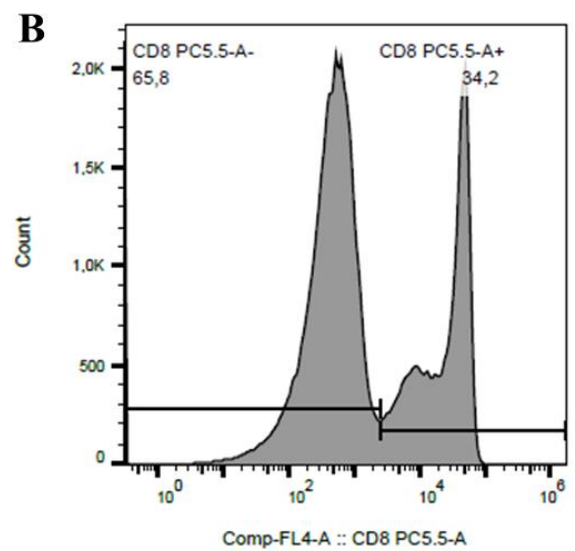
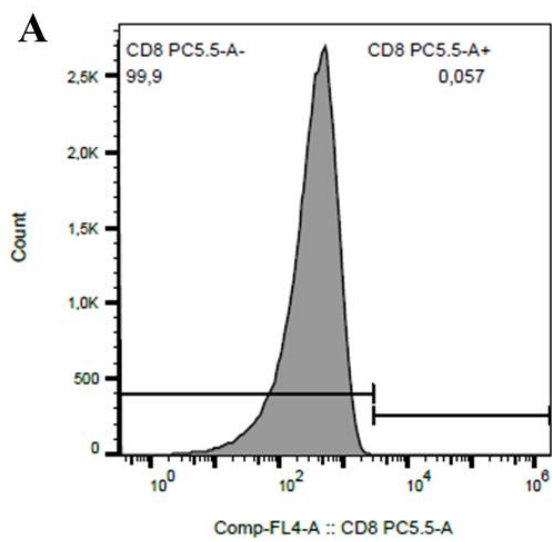
Au sein du laboratoire, un panel d'anticorps a déjà été mis au point et utilisé pour caractériser les cellules iNKT humaines circulantes chez les patients obèses à l'aide du cytomètre BD FACSVersé. Cependant, dans ce travail, nous avons utilisé le CytoFLEX. J'ai donc réalisé une nouvelle mise au point du panel d'anticorps pour la caractérisation des cellules iNKT. Au moment de l'élaboration d'un panel, il est important de réaliser certains ajustements avant d'analyser les données obtenues en cytométrie de flux. Une fois les compensations calculées mathématiquement et enregistrées par l'ordinateur, la titration des anticorps et les contrôles FMO sont effectués en utilisant des PBMCs isolés du sang de bénévoles.

#### 4.1.1. Titration

Pour déterminer la quantité optimale d'anticorps à utiliser, un titrage des anticorps est réalisé. Cela consiste à tester différentes dilutions d'anticorps sur une même quantité de cellules resuspendues dans un volume identique. Les anticorps utilisés pour caractériser les cellules iNKT humaines et les dilutions testées sont reprises dans le Tableau 2. Pour commencer, les cellules individuelles de types lymphocytaires (*gating* basés sur SSC/FCS) sont sélectionnées. Ensuite, un histogramme représentant le nombre d'évènement en fonction de la médiane de fluorescence du marqueur est réalisé pour discerner la population exprimant le marqueur membranaire (population positive) de la population ne l'exprimant pas (population négative). Un exemple est montré pour le marqueur CD3 (Figure 17A). Après l'analyse au cytomètre en flux, le « staining index » (SI) de chaque dilution d'anticorps est calculé. Ce dernier est le rapport de la différence entre la médiane de fluorescence de la population positive ( $MF_i^+$ ) et négative ( $MF_i^-$ ) divisée par 2 fois l'écart-type (SD, Standard Deviation) de la population négative :

$$\text{Staining index (SI)} = \frac{(MF_i^+ - MF_i^-)}{2 \times SD}$$

Ce SI est présenté sous forme de graphique en fonction de la concentration en anticorps ( $\mu\text{g/mL}$ ) afin de déterminer la concentration optimale à utiliser (Figure 17B). En effet, plus la valeur du



*Figure 18 – FMO de l'anticorps CD8. (A) Histogramme représentant la population cellulaire marqué avec tous les anticorps sauf l'anticorps anti-CD8. (B) Histogramme représentant la population cellulaire marqué avec tous les anticorps.*

SI est élevée, meilleure est la séparation entre les populations positives et négatives, avec un bruit de fond minime. Les concentrations choisies pour chaque anticorps sont indiquées dans le Tableau 3. Par exemple, pour l'anticorps CD3 (Figure 17A), un plateau se forme entre les concentrations 6 µg/mL et 8 µg/mL, indiquant qu'au-delà et qu'en deçà de ces deux concentrations, la discrimination des deux populations n'est plus optimale. La concentration de 6 µg/mL a été choisie pour cet anticorps.

#### 4.1.2. FMO

Les FMO sont des contrôles qui permettent de positionner correctement la « gate » afin de sélectionner de façon précise les populations cellulaires d'intérêt lors de l'analyse des données au cytomètre en flux.

Pour exemple, en figure 2, la FMO de l'anticorps CD8. L'ajout de tous les anticorps sauf celui reconnaissant le marqueur membranaire CD8 va permettre d'observer uniquement la population négative. En effet, la population cellulaire observée (Figure 18A) non marquée avec l'anticorps anti-CD8 va servir de guide pour placer une « gate » permettant de discriminer précisément la population négative (à gauche) de la population positive (à droite) dans l'échantillon marqué avec tous les anticorps (Figure 18B). Cette stratégie est réalisée pour chaque anticorps utilisé dans le panel.

#### 4.2. Obtention et caractérisation des stocks de cellules iNKT humaines

L'objectif de ce mémoire est de mettre en évidence un potentiel effet des acides gras saturés du sang sur les cellules iNKT, en agissant sur les monocytes. Étant au centre de nos expériences, il est nécessaire d'obtenir un grand nombre de cellules iNKT. Après l'isolation des cellules iNKT humaines par sélection positive à partir de PBMCs, la quantité de cellules obtenues est faible et insuffisante pour réaliser toutes les expérimentations (environ  $1 \times 10^6$  cellules iNKT pour 500 mL de sang). Pour cela, leur prolifération est stimulée in vitro, dans un plaquette 96 puits, à l'aide de *feeder cell* ayant pour rôle de présenter l' $\alpha$ -GalCer aux cellules iNKT (voir § 3.2.3.2 section M&M).

L'utilisation d'un stock de cellules iNKT venant d'un unique patient n'est pas suffisant pour que l'expérience soit représentative. En effet, il est nécessaire d'avoir plusieurs stocks, au minimum 3, provenant de différents individus pour que les résultats obtenus soient représentatifs de la population. Lors du commencement de mon stage, un stock de cellules iNKT était déjà

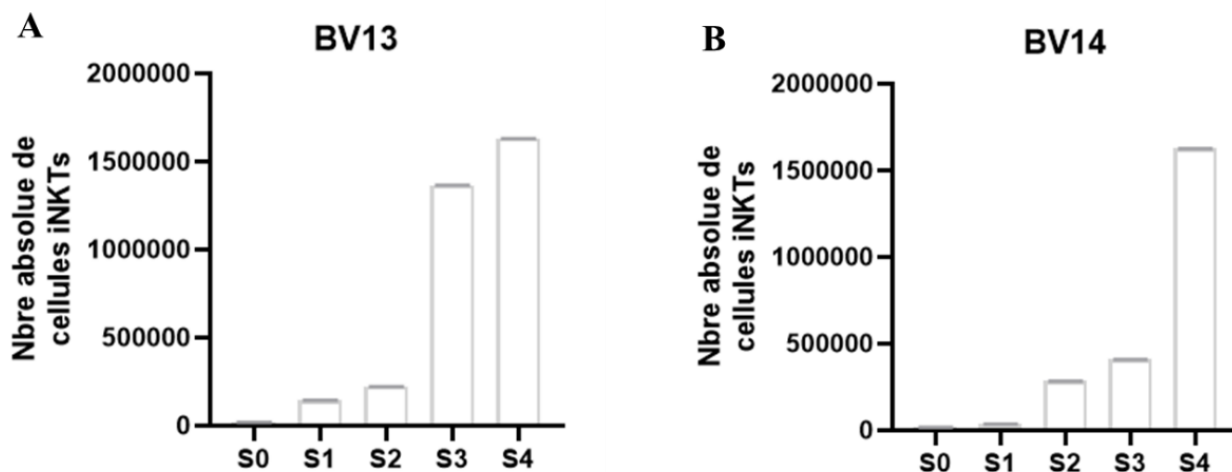


Figure 19 – Évolution du nombre absolue de cellules iNKT en prolifération en fonction du temps (4 semaines) (A) BV13 (B) BV14.

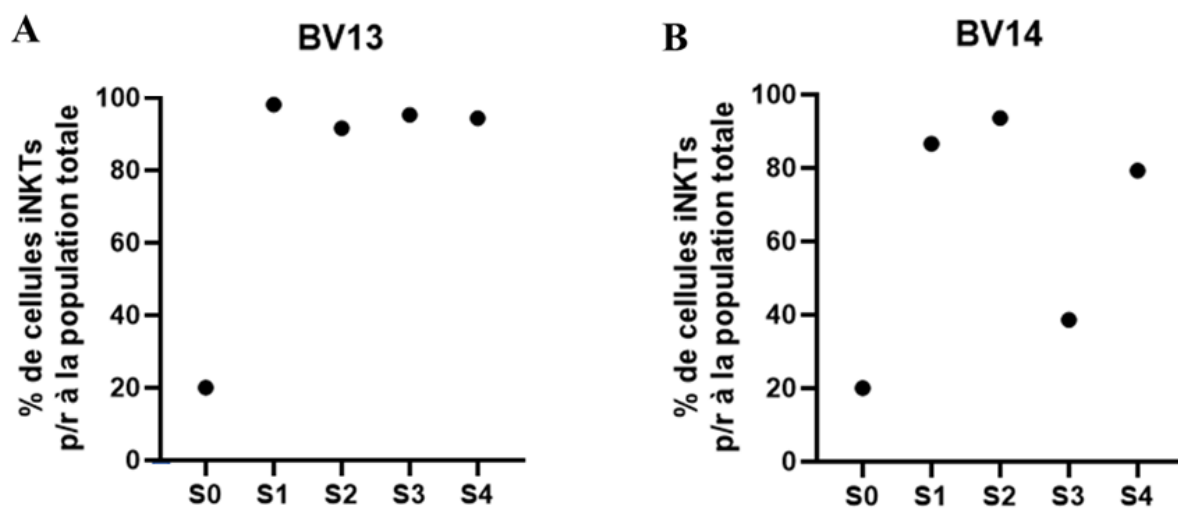


Figure 20 – Évolution du pourcentage en cellules iNKT par rapport à la population totale (A) BV13 (B) BV14 en prolifération pendant 4 semaines.

disponible, le BV10. Pour en obtenir au minimum trois, les iNKT de deux nouveaux stocks donneurs ont été isolé pour induire la prolifération, le BV13 et le BV14.

Durant la prolifération de 4 semaines, il est important de suivre l'évolution de la co-culture afin de vérifier la pureté ou encore déceler un quelconque problème pouvant compromettre la prolifération. Ainsi, chaque semaine un puit est resuspendu et analysé par cytométrie en flux. Nous avons donc suivi l'évolution du nombre des cellules iNKT et leur pureté chaque semaine. Nous avons également étudié leur répartition entre les différentes sous-populations (CD4+, CD8+ et DN), ainsi que leurs marqueurs cellulaires (CD25, CD69 et CD95) après 4 semaines de culture.

#### 4.2.1. Nombre

Afin de vérifier si les cellules prolifèrent bien, le nombre absolu de cellules iNKT a été suivis en fonction du temps. Au début de la prolifération, les cellules iNKT sont réparties dans une plaque 96 puits. Après la 2<sup>ème</sup> semaine, ces cellules ont été réparti en trois plaques de 96 puits. Les résultats montrent que BV13 a proliféré et de manière exponentielle entre la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine passant de 223 000 à 1 366 000 de cellules iNKT (Figure 19A). En ce qui concerne le BV14, il semble proliférer moins rapidement que BV13 au vu du nombre de cellules iNKT en S3 (408 000 de cellules iNKT) (figure 19B). Toutefois, il atteint un nombre absolue de cellules iNKT similaire à BV13 (c'est-à-dire environ 1 629 000) à la 4<sup>ème</sup> semaine.

#### 4.2.2. Pureté

Afin de vérifier s'il n'y a pas de contamination trop importante en cellules lymphocytaires non désirée, la fréquence des cellules iNKT dans nos puits est calculée en pourcentage de cellules iNKT. Le jour de mise en prolifération des cellules iNKT (S0), cinq fois plus de feeder cell que de cellules iNKT sont ajoutées dans chaque puit. Les cellules iNKT représentent donc 20% des cellules totales se trouvant dans le puit. Après 1 semaine, BV13 atteint une pureté satisfaisante ; les cellules iNKT représentent 98,1 % des cellules totales dans le puit en S3 (figure 20A). Pour BV14, le pourcentage de cellules iNKT augmente à 86,6 % en semaine 1 vers 93,6 % en semaine 2. Ensuite, son pourcentage de pureté diminue à 38,6 % en semaine 3 avant de remonter à 79,3 % en semaine 4. Cette forte variation entre les semaines 2 et 3 peut être expliqué par la présence des différences entre chaque puit. Lors du plating en semaine 0, il peut exister une petite variabilité entre les puits qui s'amplifie au fil des semaines expliquant cette grande différence observée entre les différentes semaines pour BV14

	BV13	BV14
<b>% de pureté de cellules iNKTs en fin de prolifération (S4)</b>	<b>94,4 %</b>	<b>79,3 %</b>

Tableau 4 - Pourcentage de pureté en cellules iNKT à la 4ème semaine de prolifération.

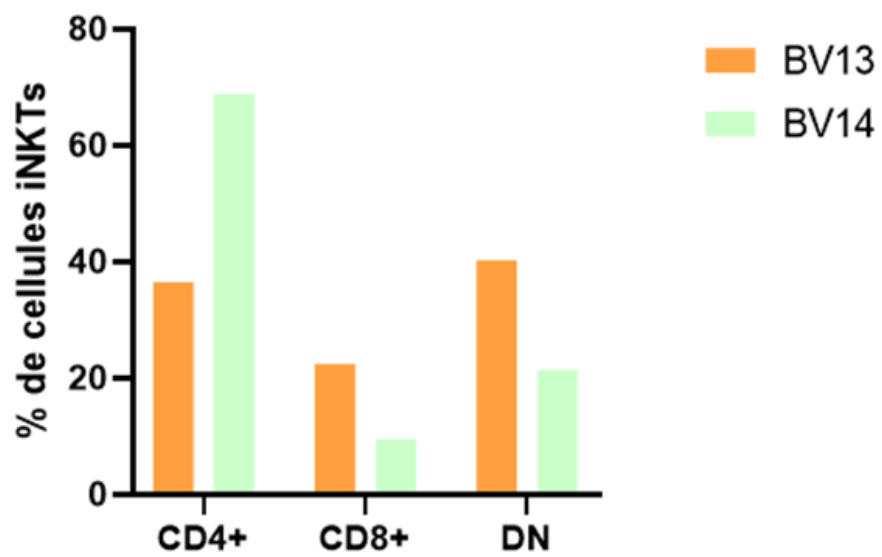


Figure 21 – Pourcentage de cellules iNKT pour chaque sous-classes en fin de prolifération (S4).

(figure 20B). Ainsi, le fait d'analyser un puit n'est pas toujours représentatif pour l'ensemble des autres puits.

Après 4 semaines de prolifération, les cellules iNKT sont considérées assez pure pour être utilisée lors que nos expériences lorsque leur pureté se trouve au-delà de 90 %. Le stock BV13 atteignant une pureté de 94,4 % pourra être utilisé, contrairement au BV14 n'ayant atteint seulement une pureté de 79,3 % (Tableau 4).

Les résultats de suivi de la pureté ont montré que les deux stocks de cellules iNKT (BV13 et BV14) ont bien proliféré, atteignant tous les deux un nombre absolue d'environ 1 629 000 de cellules iNKT à la 4<sup>ème</sup> semaine. Toutefois, le BV14, n'ayant pas atteint une pureté suffisante de plus de 90% (79,3 %), est exclu, car inutilisable. L'explication viendrait d'une contamination trop importante par d'autres cellules lors de l'isolation des cellules iNKT (BV14). Avant l'isolation, les feeder cell sont empêchées de proliférer par irradiation, mais reste métaboliquement actif afin de présenter le ligand et meurt après la 2<sup>ème</sup> semaine. À l'inverse, les cellules iNKT ne sont pas irradiées afin de permettre leur prolifération. L'isolation n'étant pas efficace à 100%, il y a donc toujours une certaine contamination par d'autres cellules lymphocytaires qui prolifèrent aussi. Ce qui explique la mauvaise pureté du stock BV14.

#### 4.2.3 Phénotype et sous-classes

En fin de prolifération (Figure 21), le phénotypage des cellules iNKT a été effectués afin de déterminer leur répartition dans chaque sous-classes : CD4+, CD8+ et DN. Pour BV14, les cellules iNKT semblent être majoritairement CD4+ (68 %), c'est-à-dire possédant un profil plutôt anti-inflammatoire. Pour BV13, la population semble être un mélange plus homogène des trois sous-population de cellules iNKT CD4+ (36 %), CD8+ (22%) et DN (40 %). Ces deux dernières sous-populations ont un profil préférentiellement pro-inflammatoire.

En fin de prolifération, l'expression de différents marqueurs cellulaires des cellules iNKT ont été analysé (Figure 22). Ces marqueurs sont CD25 (marqueurs d'activation tardif), CD69 (marqueur d'activation précoce) et CD95 (marqueur d'apoptose).

En fin de prolifération (Figure 22), le marqueur CD25 est peu exprimé, contrairement au marqueur d'activation précoce CD69, pour les 2 stocks BV13 et BV14. Signe d'une activation, les cellules iNKT prolifèrent. De plus, le marqueur d'apoptose CD95 semble également fortement exprimé.



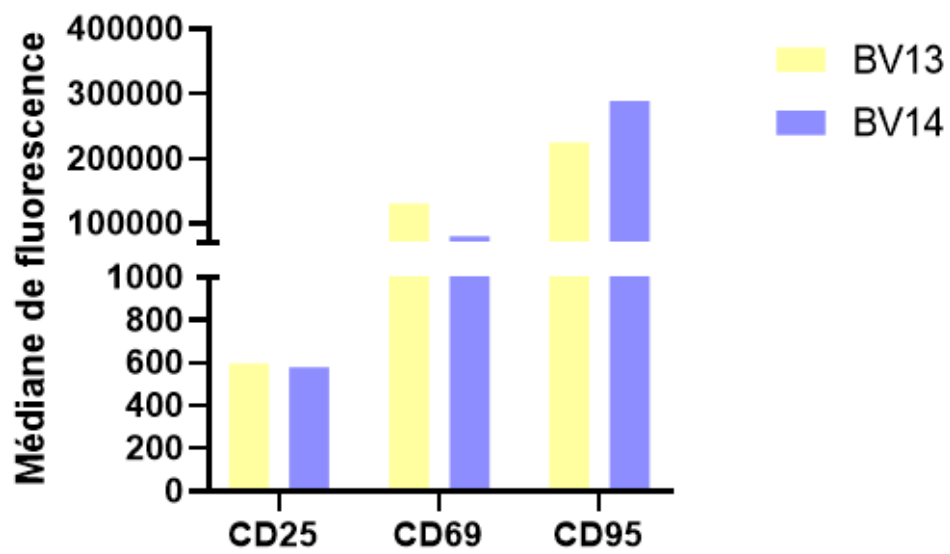


Figure 22 – Expression des différents marqueurs cellulaires CD25, CD69 et CD95 par les cellules iNKT (BV13 et BV14) en fin de prolifération (S4).

### 4.3. Effet des traitements des macrophages THP1-CD1d avec les acides gras libres sur l'activation des cellules iNKT après co-culture

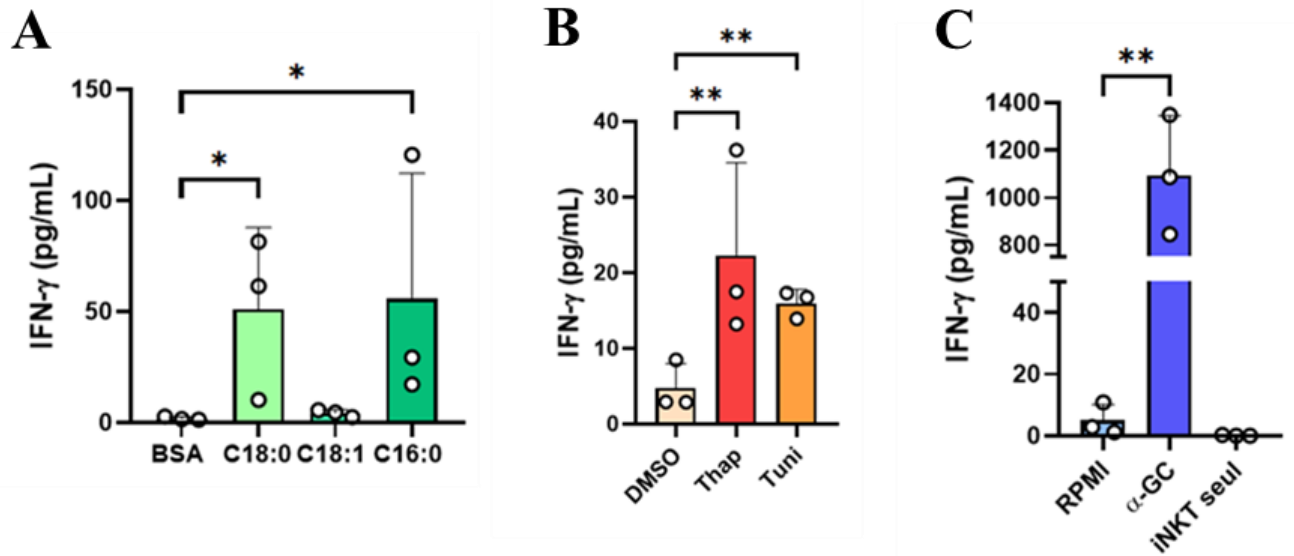
Afin d'étudier un éventuel effet indirect des acides gras libres sur l'activation des cellules iNKT, les cellules de la lignée monocyttaire THP1 surexprimant le CD1d [74], nommées THP1-CD1d par la suite, ont été différenciées en macrophages avec le PMA puis traitées avec 2 acides gras saturés (acide stéarique, C18:0 et acide palmitique, C16:0), un acide gras mono-insaturé (acide oléique, C18:1) et leur véhicule (BSA). Les concentrations en acides gras saturés (200  $\mu$ M) ont été choisies parce que, d'une part, elles peuvent être atteintes dans le sang de patients obèses [68] et que, d'autre part, sur base de travaux antérieurs du laboratoire, elles sont capables d'induire un stress du RE dans les macrophages THP1+PMA sans induire trop de mortalité [72]. Deux inducteurs classiques du stress du RE (thapsigargine et tunicamycine) ont été utilisés comme contrôles positifs puisqu'il a été récemment démontré que des CPAs d'origine myéloïde ayant subi un tel stress sont capables d'activer des cellules iNKT via la présentation d'antigènes lipidiques endogènes [70-71]. Enfin, le glycolipide  $\alpha$ -GalCer, connu pour activer fortement les cellules iNKT, a aussi été utilisé comme contrôle positif. Il permet de témoigner du bon déroulement de l'expérience.

Les macrophages THP1-CD1d traités ou non ont été lavés puis co-cultivés avec les cellules iNKT (ratio 3/1) et mises au repos comme décrit dans le paragraphe 3.4.2 de la section Matériel et Méthodes. Après 24h de co-culture, les surnageants et les cellules ont été récoltés pour les ELISA et expériences de cytométrie, respectivement.

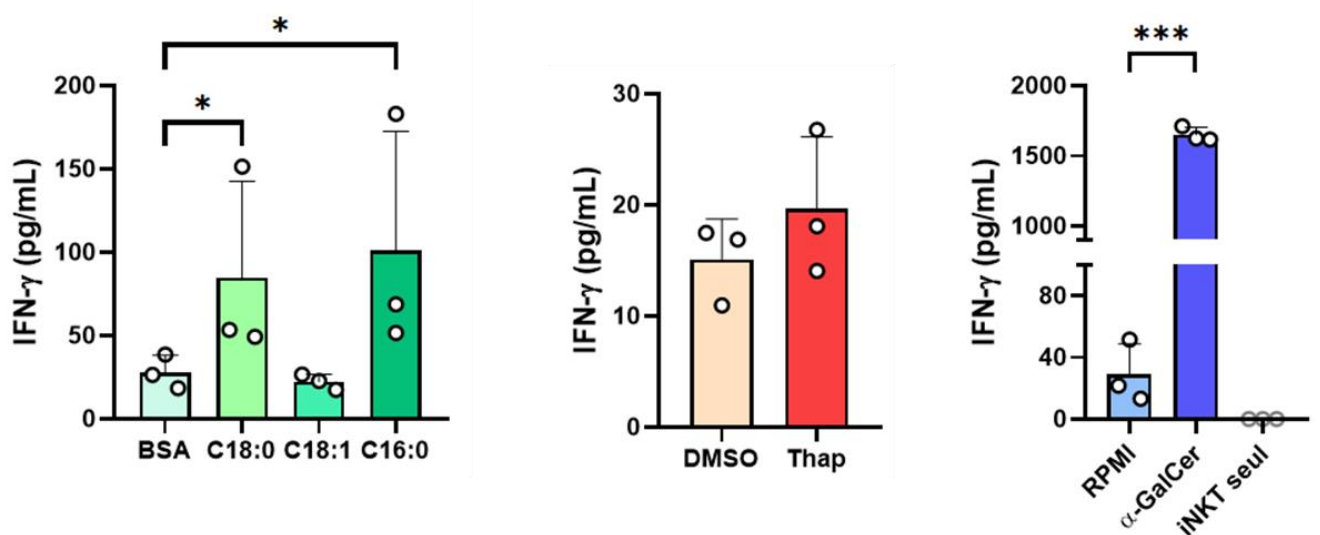
#### 4.3.1 Effet sur la sécrétion de cytokines

Lorsque les cellules iNKT s'activent, elles produisent de façon plus importante diverses cytokines dont les deux principales sont l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4.

Le protocole de co-culture décrit au paragraphe 3.4.2 de la section Matériel et Méthodes a demandé plusieurs mises au point. Premièrement, plusieurs temps de traitement des macrophages THP1-CD1d ont été expérimentés (4h, 8h, 16h et 24h). Ensuite différentes concentrations en thapsigargine (30, 50, 100, 200, 350 et 500 nM) et tunicamycine (0,5, 1 et 2  $\mu$ g/mL) ont été testés. Après dosage de l'IFN- $\gamma$  par ELISA dans les surnageants de culture, le temps de traitement de 8h et les concentrations de 50 nM et 1,5  $\mu$ g/mL pour la thapsigargine et la tunicamycine, respectivement, ont donné les meilleurs résultats avec les cellules iNKT du



**Figure 23 – Production d’IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT (BV10) après co-culture avec les macrophages THP1-CD1d traités (A) avec les acides gras libres (200 $\mu$ M), (B) avec les inducteurs du stress du RE (Thap 50 nM et Tuni 1,5  $\mu$ g/mL) et (C) avec l’antigène lipidique  $\alpha$ -GC (100 ng/mL). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  SD. Un paired t-test a été utilisé pour calculer les p-value \*\* $p < 0,01$  et \* $p < 0,1$ .**



**Figure 24 - Production d’IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT (BV13) après co-culture avec les macrophages THP1-CD1d traités (A) avec les acides gras libres (200  $\mu$ M), (B) avec la Thap 50 nM et (C) avec l’antigène lipidique  $\alpha$ -GC (100 ng/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  SD. Un paired t-test a été utilisé pour calculer les p-value \*\* $p < 0,01$  et \* $p < 0,1$ .**

stock BV10 obtenu avant mon arrivée au laboratoire. Ces conditions ont donc été choisies pour la suite du travail.

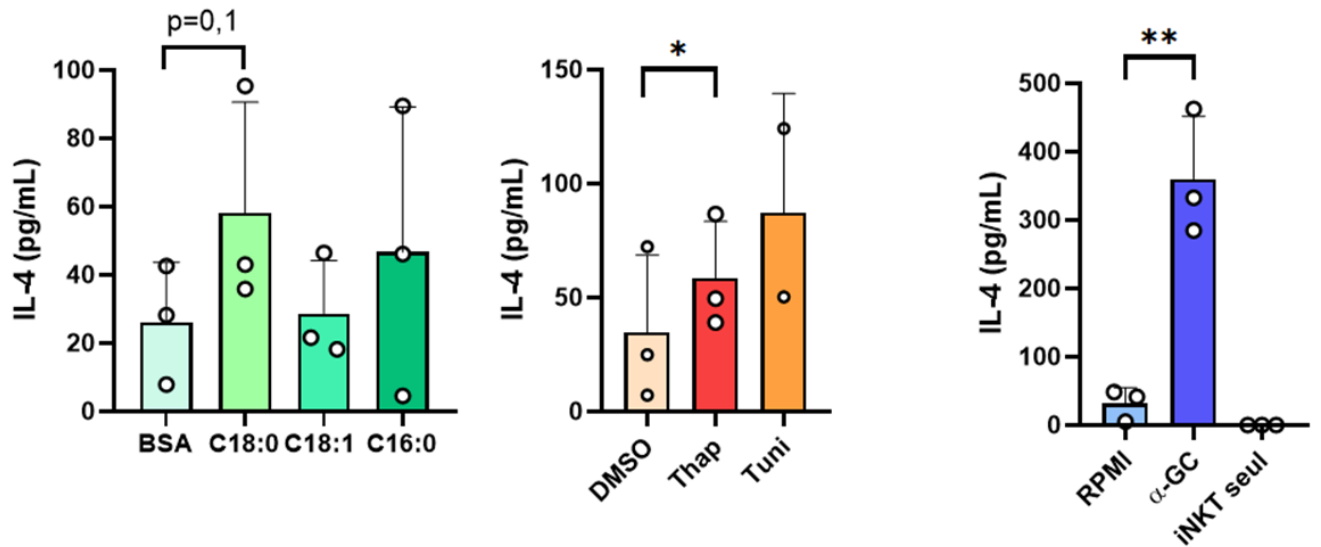
La sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 a été étudiée sur deux stocks de cellules iNKT provenant de deux patients différents, le stock BV10 et le stock BV13 généré au cours de mon mémoire. Pour chaque expérience montrée ci-dessous, des contrôles ont été réalisés :

- ✓ Les macrophages ayant subi les différents traitements n'ont pas été co-cultivés avec les cellules iNKT. Ce contrôle permet de vérifier que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 provient exclusivement de l'activation des cellules iNKT.
- ✓ Seuls les cellules iNKT sont ajoutés dans les puits. Ce contrôle permet de vérifier que les cellules iNKT sont bien au repos.

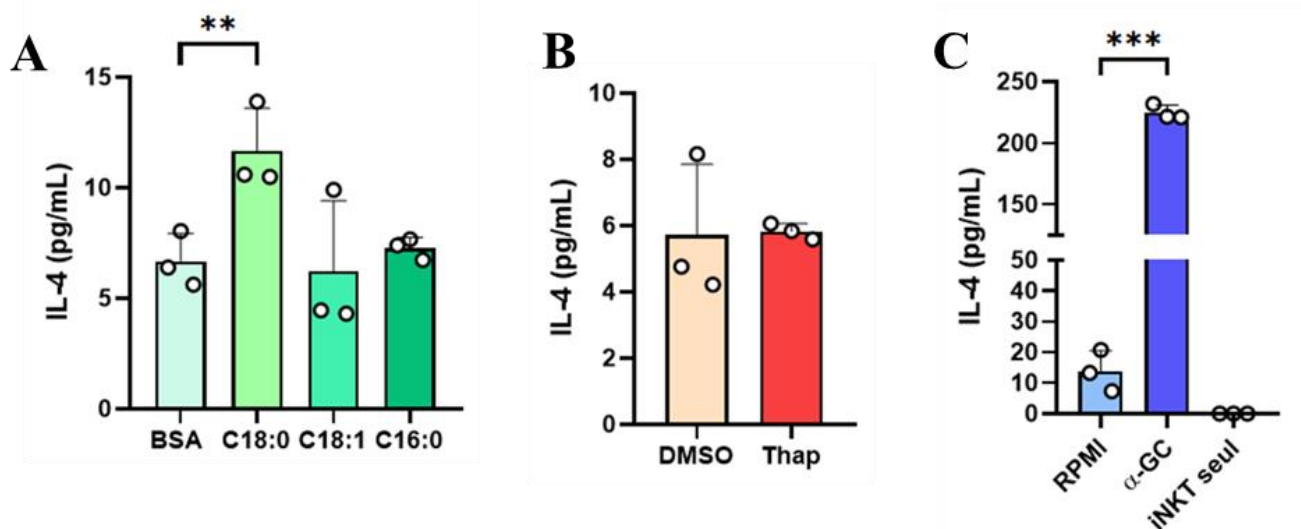
Aucune sécrétion d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-4 n'a été observée pour ces contrôles, confirmant que la production de cytokines observée provient exclusivement des cellules iNKT activées par les cellules THP1-CD1d.

#### 4.3.1.1. IFN- $\gamma$

Les résultats obtenus montrent une activation des cellules iNKT lorsque les cellules THP1-CD1d ont été traitées avec les acides gras libres saturés C18:0 et C16:0. En effet, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  augmente de façon significative pour les traitements C18:0 (*paired t-test*,  $p=0,0267$ ) et C16:0 (*paired t-test*,  $p=0,0156$ ) par rapport à la BSA (Figure 23A). Par contre, l'acide gras libre mono-insaturé, C18:1, semble n'avoir aucun effet sur les macrophages car aucune stimulation de l'activation des cellules iNKT n'est observée, comme démontré par une production d'IFN- $\gamma$  comparable à celle du contrôle BSA. Ensuite, l'induction du stress du RE chez les macrophages par les inducteurs classiques semble avoir un effet sur l'activation des cellules iNKT, comme démontré précédemment [70-71]. En effet, la production d'IFN- $\gamma$  est induite avec le traitement thapsigargine (*paired t-test*,  $p=0,0044$ ) et tunicamycine (*paired t-test*,  $p=0,058$ ) par rapport au contrôle DMSO (Figure 23B). La répétition de cette expérience sur un autre stock de cellules iNKT venant d'un autre patient (BV13) étaye ces premiers résultats. En effet, le traitement des macrophages par les acides gras saturés stimule de nouveau l'activation des cellules iNKT de façon significative par rapport à la BSA (*paired t-test*, C18:0  $p=0,0338$  et C16:0  $p=0,0246$ ), contrairement à l'acide gras insaturé C18:1 n'ayant pas d'effet (Figure 24A). Toutefois, ici, l'induction d'un stress du RE par la thapsigargine chez les macrophages n'augmente pas de façon significative la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT après co-culture (Figure 24B). Enfin, dans les deux cas, le glycolipide antigénique, l' $\alpha$ -GalCer,



**Figure 25 - Production d'IL-4 par les cellules iNKT (BV10) après co-culture avec les macrophages THP1-CD1d traités (A) avec les acides gras libres (200  $\mu$ M), (B) avec les inducteurs du stress du RE (Thap 50 nM et Tuni 1,5  $\mu$ g/ml) et (C) avec l'antigène lipidique  $\alpha$ -GC (100 ng/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  SD (sauf Tuni n=2). Un paired t-test a été utilisé pour calculer les p-value  $**p < 0,01$  et  $*p < 0,05$ .**



**Figure 26 - Production d'IL-4 par les cellules iNKT (BV13) après co-culture avec les macrophages THP1-CD1d traités (A) avec les acides gras libres (200  $\mu$ M), (B) avec les inducteurs du stress du RE (Thap 50 nM et Tuni 1,5  $\mu$ g/ml) et (C) avec l'antigène lipidique  $\alpha$ -GC (100 ng/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  SD (sauf Tuni n=2). Un paired t-test a été utilisé pour calculer les p-value  $***p < 0,001$  et  $**p < 0,01$ .**

active fortement et significativement les cellules iNKT comme démontré par la sécrétion d'une grande quantité d'IFN- $\gamma$  (*paired t-test*, BV10  $p=0,0093$  et BV13  $p=0,0088$ ). Le contrôle constitué uniquement des cellules iNKT ne montre pas de production d'IFN- $\gamma$ , attestant de leur mise au repos (Figure 23C et 24C).

#### 4.3.1.2. IL-4

De manière générale, l'impact de la co-culture des cellules iNKT avec les macrophages THP1-CD1d traités avec les acides gras et les inducteurs du stress du RE est beaucoup moins marqué sur la sécrétion d'IL-4 que sur celle de l'IFN- $\gamma$ . Une stimulation de la sécrétion de l'IL-4 est observée lorsque les macrophages sont traités avec le C18 :0 ( $p=0.1$  pour BV10,  $p=0.0039$  pour BV13) mais c'est beaucoup moins clair avec le C16 :0 (Figure 25A et 26A). Un effet de la thapsigargine est observé avec les cellules iNKT du BV10 (Figure 25B,  $p=0.04$ ) mais pas avec celles du BV13 (Figure 26B). Pourtant, les 2 stocks de cellules iNKT sécrètent l'IL-4 de manière significative et semblable en réponse à la présentation de l'aGalCer par les macrophages THP1-CD1d. Le contrôle constitué uniquement des cellules iNKT ne montre aucune production de cytokines d'IL-4, attestant de leur mise au repos (Figure 25C et 26C).

#### 4.3.2. Effet sur le phénotype des cellules iNKT

Cette partie a pour but de voir si les différents traitements des macrophages ont un impact sur la répartition des cellules iNKT au sein des différentes sous-population : CD4+, CD8+ et DN ; ainsi que sur l'expression des marqueurs d'activation (CD25 et CD69) et d'apoptose (CD95).

Les cellules iNKT étant au repos sont utilisés comme référence de l'effet observé à la suite de la co-culture. En figure 27, se trouve la répartition des sous-populations des cellules iNKT du BV10 après la mise au repos. Nous pouvons observer que les cellules iNKT sont majoritairement CD4+ (70 %), c'est-à-dire présentant un profil plutôt anti-inflammatoire. Une plus faible proportion des cellules iNKT sont DN (16 %) ou CD8+ (5 %). Ces dernières sous-populations ont un profil plutôt pro-inflammatoire.

L'analyse du pourcentage de sous-population de cellules iNKT après co-culture avec les cellules THP1 montre que la co-culture et les différents traitements semblent très peu influencer les sous-populations (Figure 28). Néanmoins, nous observons une diminution des cellules iNKT CD4+ lorsque ces cellules sont co-cultivés avec les cellules THP1 traitées à l'acide gras libre C16:0 en comparaison avec son contrôle BSA (*paired t-test*,  $p=0,036$ ). De plus, on peut

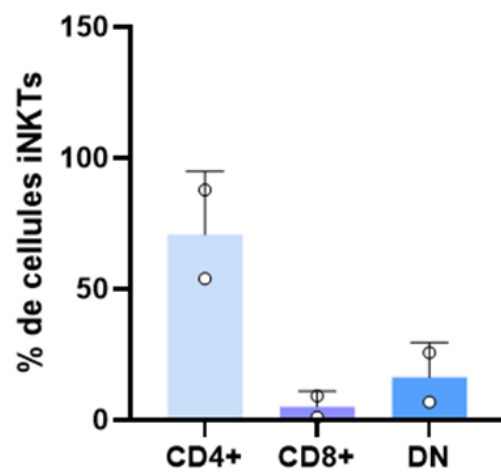


Figure 27 - Pourcentage de cellules iNKT après mise au repos pour chaque sous-classes de BV10.

remarquer que le traitement à l' $\alpha$ -GalCer de cellules THP1 induit une augmentation significative des cellules iNKT CD8+ (*paired t-test*,  $p=0,022$ ) en défaveur des cellules iNKT CD4+ (*paired t-test*,  $p=0,0015$ ) lorsqu'on compare cette condition avec son contrôle RPMI.

Afin d'évaluer un impact potentiel de la co-culture avec les cellules THP1 traitées par nos différentes conditions sur l'expression des différents marqueurs à la surface des cellules iNKT, la MFI (médiane de fluorescence) a été mesurée pour chaque marqueur après co-culture.

Nos résultats montrent que les macrophages traités avec les lipides C18:0 et C16:0 semblent induire une expression significative du marqueur CD25 (Figure 29A) par les cellules iNKT par rapport à ceux traités à la BSA (*paired t-test*, C18:0  $p=0,0225$  et C16:0  $p=0,0123$ ). Il en va de même pour le traitement avec la thapsigargine par rapport au DMSO (*paired t-test*,  $p=0,0468$ ) et le glycolipide  $\alpha$ -GalCer par rapport au RPMI (*paired t-test*,  $p=0,0182$ ). Par contre, l'acide gras libre insaturé C18:1 ne semble pas influencer l'expression du marqueur CD25.

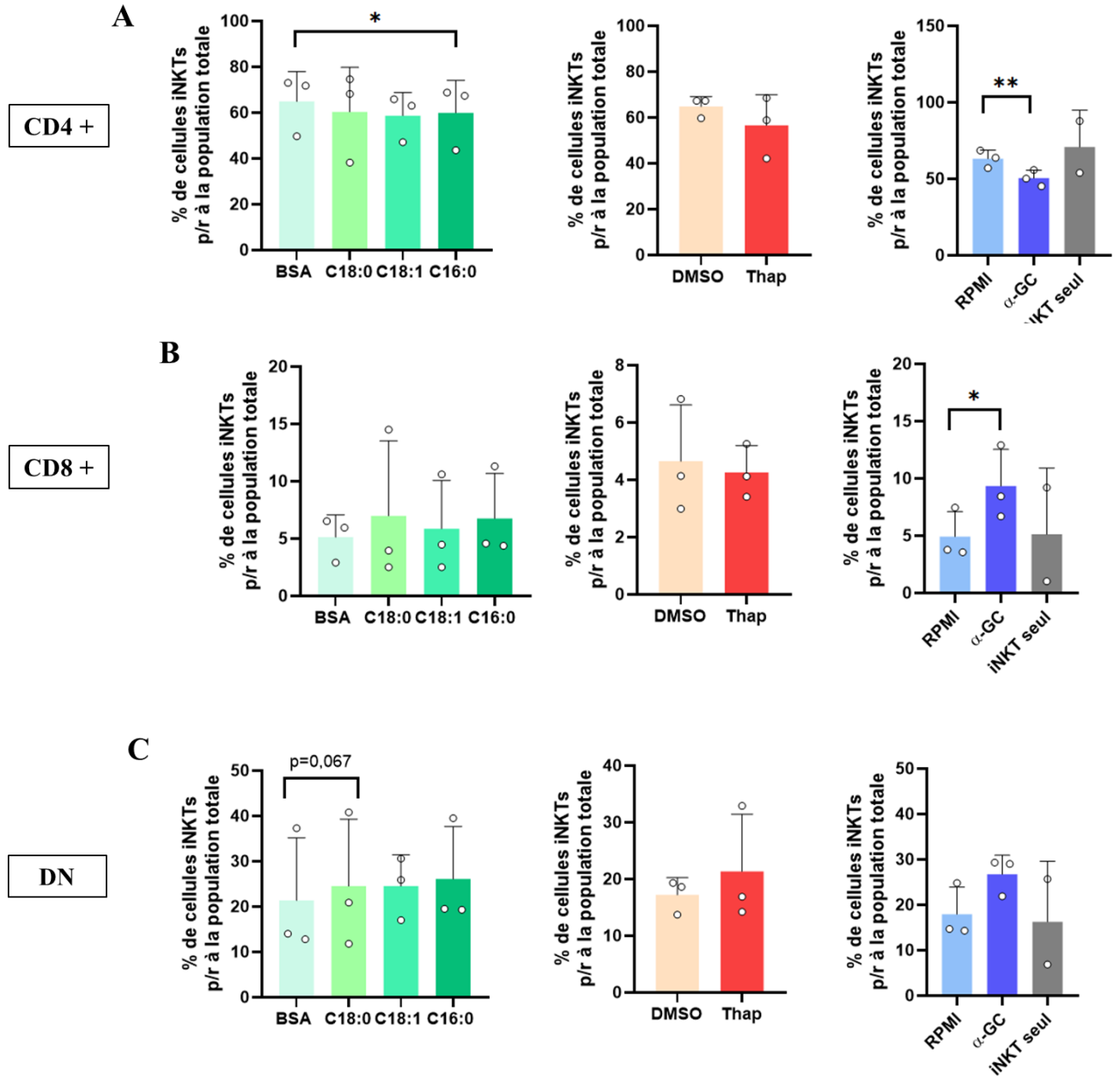
Concernant le marqueur d'activation précoce CD69 (Figure 29B), on observe que l'expression du marqueur a tendance à diminuer chez les cellules iNKT stimulées avec l'antigène  $\alpha$ -GalCer par rapport au RPMI (*paired t-test*,  $p=0,082$ ). Cependant, aucune différence d'expression du marqueur CD69 n'est observée entre les acides gras libres et leur contrôle BSA ainsi que pour la thapsigargine et son contrôle DMSO.

Enfin, au sujet du marqueur d'apoptose CD95 (Figure 29C), les macrophages traités avec les lipides C18:0 et C16:0 semblent induire une expression significative du marqueur CD95 par les cellules iNKT par rapport à ceux traités à la BSA (*paired t-test*, C18:0  $p=0,0004$  et C16:0  $p=0,0141$ ). Il en va de même pour le glycolipide  $\alpha$ -GalCer par rapport au RPMI (*paired t-test*,  $p=0,0244$ ). Par contre, ni l'acide gras libre insaturé C18:1 ni la thapsigargine ne semblent influencer l'expression du marqueur CD95 par rapport à leur contrôle respectif.

#### 4.3.3. Rôle du CD1d dans l'activation des cellules iNKT

L'activation des cellules iNKT peut se faire par la présentation d'un glycolipide exogène ou lorsqu'un antigène lipidique endogène est présenté. Dans les deux cas, la CPA active les cellules iNKT via l'interaction CD1d (présentant un lipide antigénique) et le TCR des cellules iNKT. Jouant un rôle certain dans l'activation des cellules iNKT, la molécule CD1d peut donc être à la base de l'activation des cellules iNKT observée dans ce travail, à la suite de la co-culture avec les macrophages THP1-CD1d traités avec les acides gras saturés. En effet, ces traitements pourraient induire la synthèse de nouveaux lipides par les CPAs qui





**Figure 28 - Pourcentage de cellules iNKT de chaque traitement pour chacune des sous-populations (A) CD4+ (B) CD8+ et (C) DN. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  SD (sauf iNKT seul n=2). Un paired t-test a été utilisé pour calculer les p-value  $**p < 0,01$  et  $*p < 0,05$ .**

seraient chargés sur le CD1d et présentés comme antigènes aux cellules iNKT. Cependant, cette activation pourrait aussi être indépendante du CD1d. Par exemple, les traitements des macrophages pourraient induire l'expression de ligands de stress ou de cytokines qui seraient reconnus par des récepteurs sur les cellules iNKT, comme le NKG2D ou des récepteurs à cytokines, respectivement, et provoqueraient leur activation.

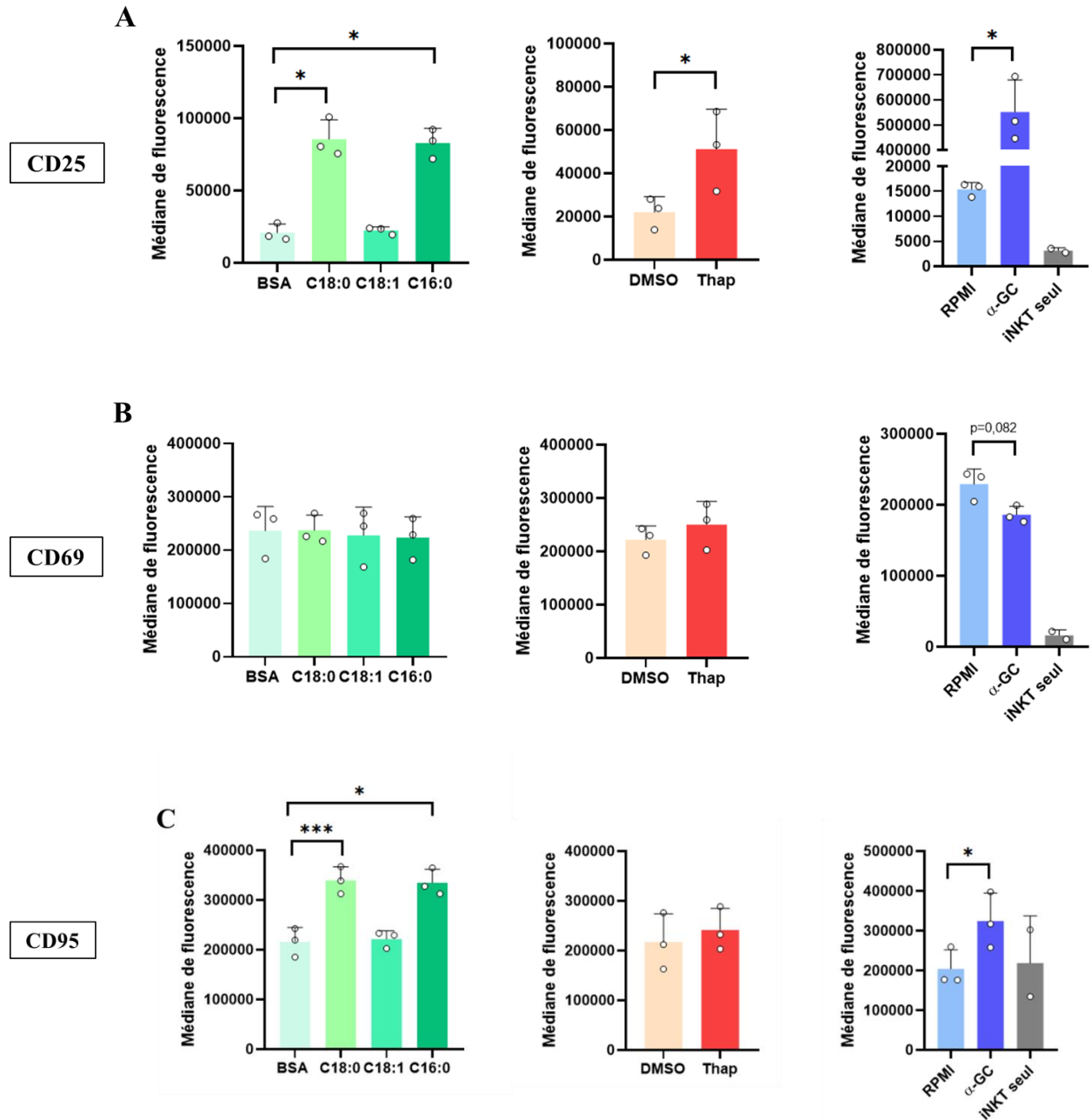
Pour tenter de répondre à ces suppositions, nous avons comparé la capacité des cellules THP1-CD1d d'activer les cellules iNKT avec celle de la lignée monocyttaire THP1 d'origine.

Comme attendu, l'expression de la molécule CD1d mesurée par cytométrie en flux sur les cellules THP1-CD1d est beaucoup plus forte que sur les cellules THP1 classiques (Figure 30). La MFI pour le CD1d pour les cellules THP1-CD1d est 150X plus importante que celle des cellules THP1 classiques.

Ensuite, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT après co-culture avec les macrophages THP1-CD1d traités comme précédemment a été comparée avec la production d'IFN- $\gamma$  par les mêmes cellules iNKT (BV10) mais co-cultivées avec les macrophages classiques THP1 ayant subi les mêmes traitements.

Les résultats montrent que les traitements des macrophages avec les acides gras libres ainsi qu'avec la thapsigargine ont tendance à être plus efficaces pour induire la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT lorsque ces macrophages sur-expriment le CD1d (Fig. 31A-B). Cependant, la comparaison des quantités d'IFN- $\gamma$  sécrétées par les cellules iNKT stimulées par les macrophages THP1 ou par les THP1-CD1d subissant le même traitement ne donne pas de différence significative probablement à cause des écarts-types importants. Augmenter le nombre d'expériences indépendantes permettra probablement d'améliorer les p-values. Néanmoins, ces résultats préliminaires permettent de suggérer que l'activation des cellules iNKT en réponse à leur co-culture avec les macrophages THP1 traités avec un inducteur classique du stress du RE ou par les acides gras saturés implique la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d.

Comme attendu, l'activation des cellules iNKT par l'ajout du glycolipide  $\alpha$ GalCer sur les macrophages est plus efficace lorsque ceux-ci sur-expriment le CD1d mais de nouveau la différence n'est pas significative (Figure 31C). Les contrôles où les macrophages THP1 ou THP1-CD1d traités ne sont pas co-cultivés avec les cellules iNKT ne montrent aucune sécrétion



*Figure 29 - Expression des différents marqueurs cellulaires (A) CD25, (B) CD69 et (C) CD95 par les cellules iNKT mises en co-culture avec les cellules THP1-CD1d traitées. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  SD (sauf iNKT seul n=2). Un paired t-test a été utilisé pour calculer les p-value \*\*\* $p < 0,001$  et \* $p < 0,05$ .*

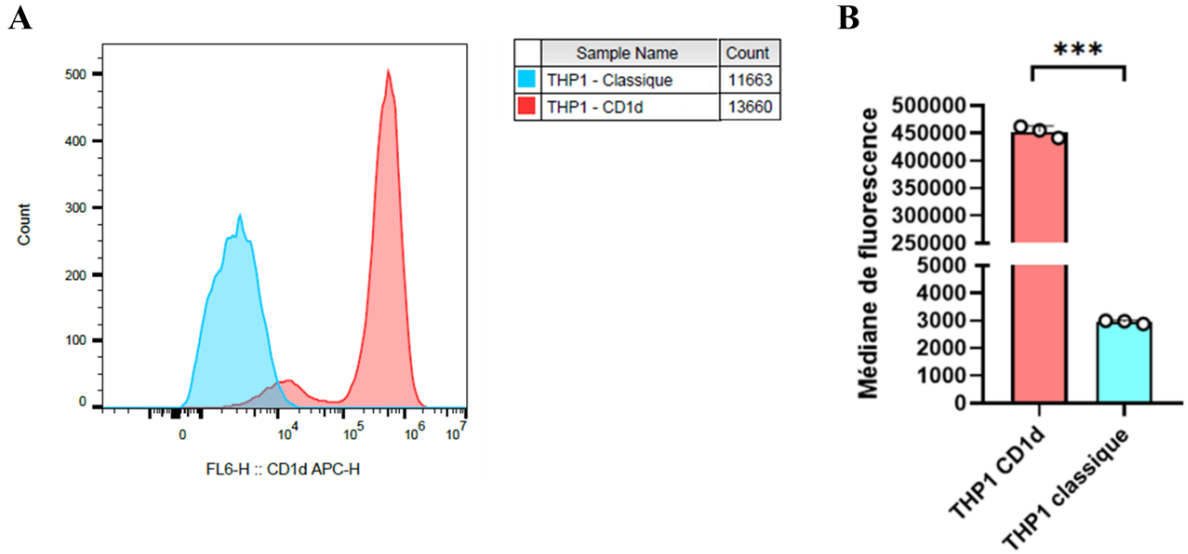
d'IFN- $\gamma$  confirmant que la production de cytokines observée provient exclusivement des cellules iNKT activées.

#### 4.3.4 Implication de la voie PERK-eIF2 $\alpha$ de l'UPR

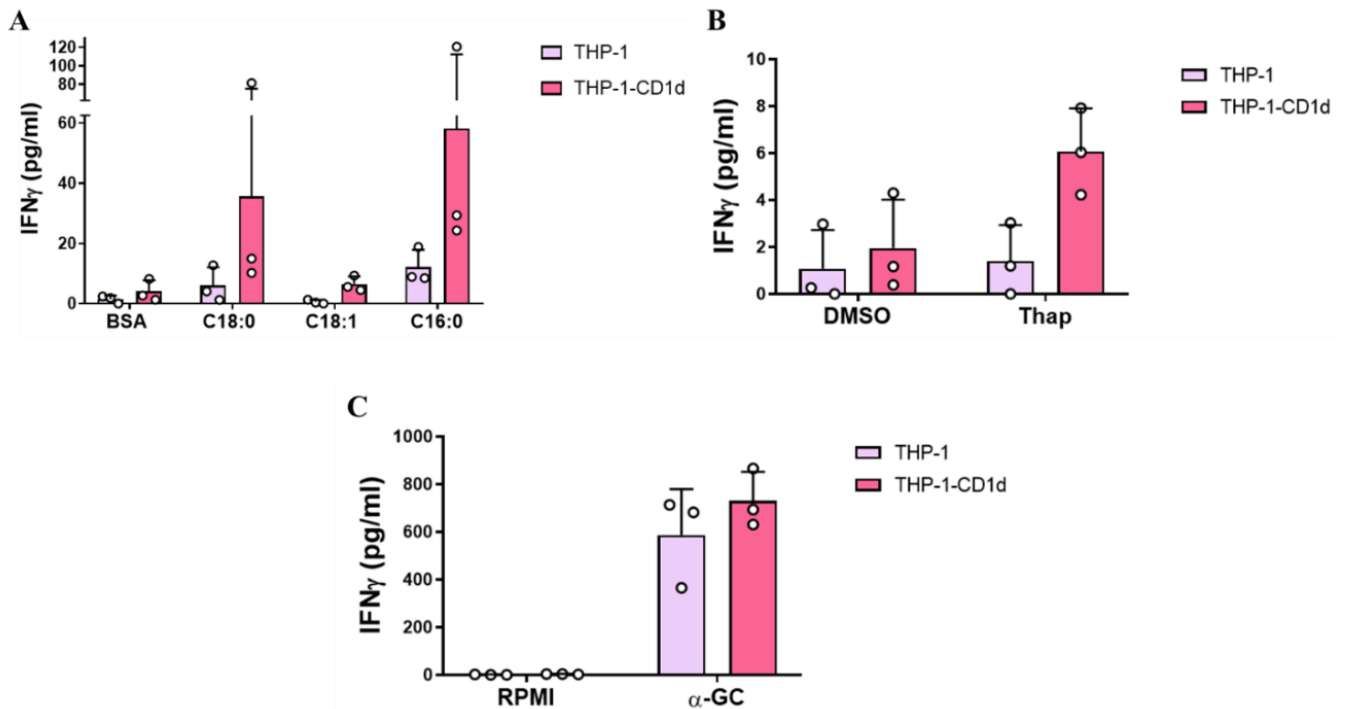
Deux études récentes ont démontré que les cellules myéloïdes en situation de stress du RE (Thapsigargin et tunicamycine) activent les cellules iNKT via la présentation d'antigènes lipidiques complexés au CD1d et que ce processus implique les effecteurs PERK et/ou IRE1 $\alpha$  de la réponse UPR [70-71]. Des études réalisées au sein du laboratoire ont confirmé l'existence d'un stress du RE chez des macrophages THP-1+PMA cultivés dans un milieu riche en acides gras saturés [72].

Afin d'élucider un rôle potentiel de ces deux voies de l'UPR dans l'activation des cellules iNKT que nous observons après co-culture avec les macrophages THP1-CD1d +PMA traités avec les acides gras saturés, nous avons planifié de tester l'impact de différents inhibiteurs de ces deux voies. Nous n'avons eu le temps que de tester ISRIB, une molécule capable de renverser l'effet inhibant de la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  par PERK. Une seule expérience a été réalisée qui a consisté à pré-incuber pendant 1h les macrophages (THP1-CD1d) avec l'inhibiteur ISRIB à différentes concentrations ou avec le véhicule (DMSO) avant de réaliser les traitements avec la BSA et les 3 acides gras (C18:0, C18:1 et C16:0, 200  $\mu$ M). Après 8h de traitement, la co-culture a été réalisée en ajoutant les cellules iNKT (BV10). Les concentrations en inhibiteurs (2,5 et 5 nM) ont été sélectionnées sur base des résultats publiés avec la thapsigargine [71]. Les surnageants de la co-culture ont donc été récupérés afin de quantifier l'IFN- $\gamma$  sécrétée.

En figure 32B, lorsque l'inhibiteur ISRIB est testé sur les macrophages traités avec la thapsigargine, comme attendu, on remarque une diminution dose-dépendante de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT. Cette réduction de l'activation des cellules iNKT suite aux pré-traitements des macrophages avec ISRIB est également observée lorsque ceux-ci sont traités avec les acides gras saturés (Figure 32A). Ces résultats préliminaires pourraient suggérer que les acides gras libres C18:0 et C16:0 induisent la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d dans les macrophages par un mécanisme impliquant la voie PERK de l'UPR. Cependant, dans cette première expérience, l'inhibiteur ISRIB semble également affecter l'activation des cellules iNKT en réponse à la présentation du glycolipide  $\alpha$ -GalCer (Figure 32C) ainsi que les niveaux d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants des conditions contrôles BSA et DMSO

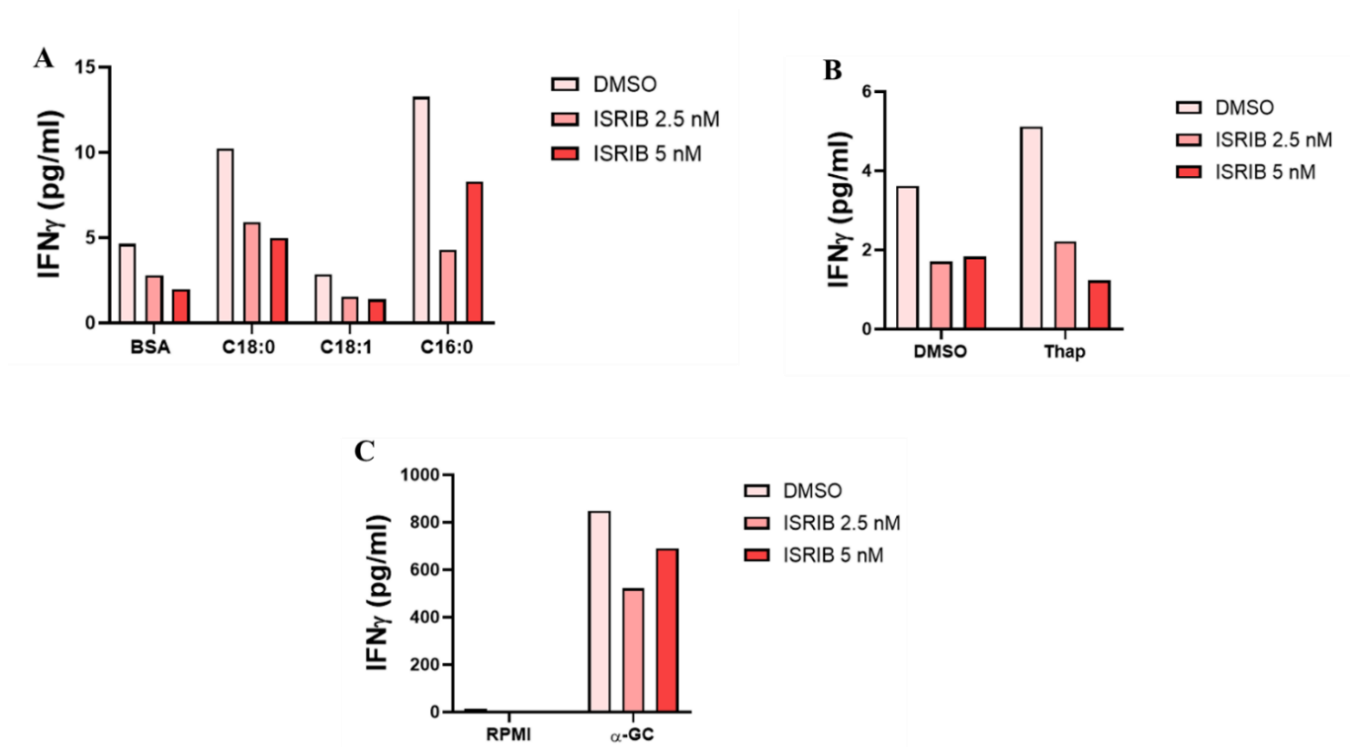


**Figure 30 – Comparaison de l’expression de la protéine membranaire CD1d à la surface des cellules THP1 classiques et des cellules THP1 CD1d. (A) Histogramme représentatif (B) MFI. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  SD. Un t-test a été utilisé pour calculer la p-value \*\*\* $p < 0,001$ .**



**Figure 31 - Production d’IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT (BV10) après co-culture avec les macrophages THP1 classiques ou THP1-CD1d traités (A) avec les acides gras libres (200  $\mu$ M), (B) avec un inducteur du stress du RE et (C) avec l’antigène lipidique  $\alpha$ -GC. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences indépendantes  $\pm$  SD.**

(Figures 32A-B). Ces résultats pourraient être expliqués par un effet *off-target* ou cytotoxique d'ISRIB puisque ces trois conditions ( $\alpha$ GalCer, BSA et DMSO) ne sont pas connues pour induire la voie PERK. Ces expériences doivent être répétées avec ISRIB mais également avec d'autres inhibiteurs de cette voie PERK et aussi de la voie IRE1.



**Figure 32 - Effet d'un inhibiteur de la voie PERK.** Les macrophages (THP1-CD1d) ont été pré-traités avec l'inhibiteur ISRIB (2,5 et 5 nM) ou le véhicule (DMSO) pendant 1h avant d'être incubés avec les acides gras ou la BSA (A), la thapsigargine ou le DMSO (50 nM) (B) ou l'antigène lipidique  $\alpha$ -GC (C). Après 8h, les macrophages ont été co-cultivés avec les cellules iNKT (BV10) pendant 24h. L'IFN- $\gamma$  a été mesuré sur les surnageants de co-culture par ELISA. Les résultats présentés proviennent d'une seule expérience.

## 5. Discussion & Conclusions

L'obésité est devenue un problème majeur de santé publique, car elle atteint des proportions épidémiques et favorise non seulement le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires, mais aussi le cancer [67]. Une perte d'immuno-surveillance a été mise en évidence comme un mécanisme probable reliant l'obésité et le cancer [75]. En effet, l'obésité s'accompagne d'un dysfonctionnement de plusieurs populations de cellules immunes périphériques telles que les cellules NK (Natural Killer) [69].

Des résultats obtenus au sein du laboratoire ont montré la preuve d'une activation des cellules iNKT périphériques chez le patient obèse en comparaison aux individus contrôles (Wilkin C et al., manuscrit en préparation). D'autre part, des études récentes ont démontré que des cellules myéloïdes (monocytes, macrophages, DCs), après un stress du RE (thapsigargine, tunicamycine), sont capables de présenter des antigènes lipidiques via le CD1d aux cellules iNKT ayant pour conséquence de les activer [70-71]. Parce qu'il est connu que les acides gras libres sont plus abondants dans le sang et les tissus des patients obèses [68] et que ceux-ci, lorsqu'ils sont saturés, sont capables d'induire un stress du RE dans des macrophages [72], nous avons décidé d'investiguer l'impact de macrophages cultivés dans un milieu riche en acides gras libres sur l'activation des cellules iNKT.

Nous avons donc étudié un éventuel effet indirect des acides gras sur l'activation des cellules iNKT en réalisant des co-cultures de cellules iNKT avec des macrophages THP1-CD1d traités par différents acides gras libres ou avec un inducteur classique du stress du RE. Un contrôle  $\alpha$ -GalCer a été ajouté afin de garantir la capacité des cellules THP1 à induire l'activation des cellules iNKT. L'activation des cellules iNKT a été évaluée par (1) le dosage de cytokines dans les surnageants de co-culture et (2) par l'analyse du phénotype des iNKT co-culture. Comme attendu, les macrophages traités à l' $\alpha$ -GalCer ont activé significativement la production de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-4 par les 2 lots d'iNKT (BV10 et BV13) comparativement à la condition où les macrophages ne sont pas traités (RPMI). Les deux inducteurs classiques du stress du RE, la thapsigargine et la tunicamycine, ont induit une sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 en comparaison à la condition contrôle DMSO par les cellules iNKT du BV10, mais pas BV13. Les résultats du BV10 sont en adéquation avec les papiers décrivant une activation des cellules iNKT lorsque les macrophages THP1 sont traités par thapsigargine et tunicamycine [70-71].





Par contre, le manque d'effet sur BV13 peut être expliqué par le fait que la thapsigargine n'a pas eu l'effet attendu sur BV13 (n'a pas induit un stress du RE) ou que BV13 n'est pas capable de produire des antigènes lipidiques adéquats en réponse (faible affinité). De nouvelles expériences avec ce stock de cellules iNKT (BV13) où non seulement les cytokines seront investiguées, mais également les marqueurs d'activation sur les cellules iNKT permettront d'éclaircir ces résultats. En ce qui concerne les acides gras, une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 est observée pour les traitements avec les 2 acides gras saturés, C18:0 et C16:0 par rapport à leur condition contrôle BSA. Ceci est observé pour les 2 stocks de cellules iNKT. De plus, cette stimulation est supérieure à celle observée pour la thapsigargine. Par contre, le traitement des macrophages avec l'acide gras mono-insaturé, C18:1, ne montre aucun effet sur la sécrétion de cytokines par aucun des 2 stocks de cellules iNKT (BV10 et BV13).

Ensuite, nous avons investigué l'effet des différents traitements des macrophages sur le phénotype des cellules iNKT (BV10) après co-culture. Après leur mise au repos, les cellules iNKT du BV10 sont majoritairement CD4<sup>+</sup>. Le traitement des macrophages THP1 avec les acides gras saturés ou mono-insaturés ne montre globalement pas d'effet sur la répartition des sous-populations de cellules iNKT après co-culture (excepté une très légère diminution du pourcentage des cellules CD4<sup>+</sup> lorsque les THP1 sont traitées avec l'acide gras saturé C16:0). Par contre, on observe que le traitement des macrophages avec le glycolipide antigénique  $\alpha$ -GalCer induit une diminution du pourcentage des cellules iNKT CD4<sup>+</sup> au profit des CD8<sup>+</sup> après co-culture. Cette augmentation du pourcentage des cellules iNKT CD8<sup>+</sup> est assez attendue, car déjà observée à plusieurs reprises dans la littérature. En effet, après une stimulation avec de l' $\alpha$ -GalCer, les cellules iNKT CD8<sup>+</sup> se développent sélectivement produisant principalement de l'IFN- $\gamma$  et possédant une cytotoxicité accrue [76-77].

Concernant les marqueurs cellulaires, on observe une augmentation de l'expression du marqueur d'activation tardive CD25 très spécifique pour les acides gras saturés par rapport à la BSA, contrairement à l'acide gras insaturé où aucun effet n'a été mis en évidence. Les traitements des macrophages avec la thapsigargine et l' $\alpha$ -GalCer montrent également une belle stimulation de l'expression du CD25 sur les cellules iNKT. Quant au marqueur d'activation précoce CD69, son expression est augmentée dès que les cellules iNKT sont co-cultivées avec les macrophages que ceux-ci soient traités ou non. Ces deux biomarqueurs cellulaires utilisés dans la littérature pour analyser le profil d'activation sont exprimés à des stades différents du processus d'activation. Le CD69 est un marqueur d'activation précoce ; il est exprimé très



fortement quelques heures après l'activation des cellules iNKT pour ensuite atteindre un plateau après 24h puis son expression diminue. Le CD25 est un marqueur d'activation plus tardif ; il est exprimé après 12h pour arriver à un pic d'expression vers 72h après activation [78-79]. Ceci peut expliquer les résultats obtenus. Lors de la récupération des cellules iNKT après 24h, celles-ci expriment le marqueur d'activation tardif (CD25) lorsque son expression est en phase montante, ce qui permet d'observer des différences d'activation. À l'inverse, le marqueur d'activation précoce (CD69) se trouve à son maximum d'expression au moment de la récolte des cellules iNKT. Ayant une cinétique plus courte, il semble être trop tard pour observer une différence d'expression de CD69, nous sommes seulement capables de voir que les cellules iNKT ont été activées suite à une rencontre avec les CPAs. Il peut donc être intéressant de proposer une cinétique plus courte pour étudier l'expression du marqueur d'expression précoce CD69. Enfin, le marqueur d'apoptose, CD95, a également été analysé. Tout comme le CD25, l'expression de CD95 est fortement augmentée sur les cellules iNKT lorsque les macrophages sont traités par les acides gras saturés ou stimulés avec le glycolipide  $\alpha$ -GalCer. De plus, cette expression va également dans le même sens que l'augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , preuve d'une activation des cellules iNKT. Lorsque les cellules iNKT sont activées, elles vont proliférer afin de supporter la réponse immunitaire inflammatoire qui a débuté. Pour retrouver un stade basal (pré-activation), l'inflammation doit diminuer. Pour cela, les cellules iNKT vont commencer à exprimer des marqueurs permettant d'induire la mort cellulaire de cellules cibles telle que le marqueur d'apoptose CD95 [80-81].

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure qu'il y a bien une activation des cellules iNKT quand elles sont mises en culture avec les macrophages pré-traités avec des acides gras saturés, comme démontré par la stimulation de la sécrétion des cytokines (IFN- $\gamma$  et IL-4) et le phénotype activé des cellules iNKT (CD25 et CD69). Pour confirmer cela, ces mêmes expérimentations doivent être effectuées sur au moins deux autres stocks de cellules iNKT provenant de patients différents. Il peut être aussi intéressant d'utiliser des macrophages primaires humains (MDMs, monocyte-derived macrophages) exprimant aussi la molécule du CD1d, plutôt qu'une lignée cellulaire comme les cellules THP1 ou THP1-CD1d.

Les résultats montrant que l'activation est spécifiquement induite par les macrophages traités avec les acides gras saturés (C18:0, C16:0) et pas avec les acides gras mono-insaturés (C18:1) sont également intéressants. Ces observations sont en accord avec la littérature qui démontre que les acides gras saturés induisent un stress du RE et une altération de l'autophagie cytoprotectrice. Ce phénomène entraîne une augmentation de l'apoptose et du stress



métabolique contribuant à une réponse pro-inflammatoire chez la cellule [82-84]. À l'inverse, les acides gras poly-/mono-insaturés sont connus pour avoir des propriétés plutôt protectrices sur les cellules en inhibant les processus inflammatoires [85]. Nos résultats montrent que le traitement des macrophages avec les acides gras saturés les rend capables d'activer des cellules iNKT. Pour étayer l'hypothèse de ce rôle spécifique des acides gras saturés, il serait intéressant de réaliser un traitement des macrophages en combinant un lipide saturé (C18:0) avec un lipide insaturé (C18:1) afin de voir si l'effet protecteur de l'acide gras insaturé empêcherait l'effet stressant de l'acide gras saturé et son impact sur la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 par les cellules iNKT.

De surcroît, on remarque que l'effet des acides gras saturés est plus marqué sur la sécrétion d'IFN- $\gamma$  que sur celle d'IL-4. Il en est de même pour le glycolipide antigénique l' $\alpha$ -GalCer, connu pour induire une réaction de préférence de type pro-inflammatoire. Suivant nos résultats, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les cellules iNKT initieraient peut-être une réponse plutôt de type pro-inflammatoire lorsqu'elles sont dans un milieu riche en acides gras saturés.

Il a été démontré à diverses reprises que la molécule CD1d exprimée sur des CPAs joue un rôle avéré dans l'activation des cellules iNKT en présentant des antigènes lipidiques [24, 86-87]. De plus, l'induction d'un stress du RE chez les CPAs induit l'activation des cellules iNKT de manière CD1d dépendante [70]. Toutefois, la littérature a également mis en évidence que les cellules iNKT peuvent être activées de manière CD1d indépendante, via leurs récepteurs de cytokines ou via des récepteurs activateurs tel que le NKG2D qui reconnaît des ligands de stress présents à surface d'autres cellules [88-89]. Nous avons donc voulu déterminer si le CD1d était également à la base de l'activation des cellules iNKT observée dans ce travail, à la suite de la co-culture avec les macrophages pré-traités avec les acides gras saturés. Pour essayer d'y répondre, nous avons comparé la capacité des macrophages THP1 sur-exprimant le CD1d (THP1-CD1d) d'activer les cellules iNKT avec celle des macrophages différenciés à partir de la lignée THP1 d'origine après les différents traitements. Tout d'abord, lorsque les macrophages sont traités avec le glycolipide  $\alpha$ -GalCer, les cellules iNKT sont activées plus efficacement lorsque les macrophages sur-expriment le CD1d. Toutefois, la différence n'est pas statistiquement significative. Ce même effet est également observé quand les macrophages sont traités avec les acides gras saturés et la thapsigargine. La différence THP1-CD1d versus THP1 n'est pas non plus statistiquement significative, car la déviation standard est importante. Il serait donc nécessaire d'augmenter le nombre de répétition de l'expérience afin de diminuer la



variabilité inter-expérience. On remarque également une capacité plus importante des cellules THP1-CD1d par rapport THP1 classique à activer les cellules iNKT dans les conditions contrôles (RPMI, DMSO et BSA), ainsi que pour le traitement avec le C18:1. Ce résultat correspond probablement à une présentation basale d'antigènes lipidiques endogènes légèrement plus importante lorsque les cellules exposent plus de molécules du CD1d à leur surface. Cette expérience nous permet de suggérer que la capacité accrue des macrophages d'activer les cellules iNKT après un traitement avec les acides gras saturés serait dépendante de la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d comme cela a été démontré récemment pour les inducteurs classiques du stress du RE [70-71].

Afin d'étayer nos résultats, il serait déjà intéressant de reproduire cette expérience une à deux fois pour essayer d'obtenir de meilleures statistiques avec le BV10, mais également avec d'autres stocks d'iNKT et d'analyser l'expression des marqueurs d'activation sur les cellules iNKT. Ensuite, pour prouver de manière plus fiable l'implication de la molécule CD1d dans l'activation des cellules iNKT, on peut réaliser une expérience de co-culture en utilisant un anticorps anti-CD1d ou l'isotype contrôle. Une autre expérience intéressante serait d'employer un tétramère fluorescent du TCR des cellules iNKT humaines et de l'ajouter aux macrophages après traitements comme décrit précédemment [71]. Si les macrophages présentent des antigènes lipidiques via le CD1d, ceux-ci seront détectables par cytométrie en flux. L'augmentation de la médiane de fluorescence des macrophages traités avec les acides gras saturés en comparaison à la condition contrôle (BSA) permettra de démontrer la présentation plus importante d'antigènes lipidiques via le CD1d ou la présentation d'antigènes lipidiques de plus grande affinité pour le TCR des cellules iNKT.

Dans la dernière partie de mon mémoire, j'ai entamé les expériences destinées à étudier l'implication des voies de l'UPR dans la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d induite par le traitement des macrophages avec les acides gras saturés. Mon laboratoire d'accueil a démontré que le C18:0 s'insère dans les lipides des membranes des macrophages THP-1 induisant une perte de fluidité membranaire [72]. Les parties transmembranaires des protéines effectrices IRE1 $\alpha$  et PERK perçoivent ce changement, ce qui induit leur dimérisation et activation [90]. Nous avons eu seulement le temps d'effectuer une seule expérience avec l'inhibiteur de la voie PERK-eIF2 $\alpha$ , ISRIB. Comme démontré précédemment [70-71], on voit une diminution dose-dépendante de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT (BV10) lorsque les macrophages traités avec la thapsigargine sont pré-incubés avec ISRIB.





Une inhibition dose-dépendante d'ISRIB est également observée sur l'effet des acides gras saturés. Cependant, l'inhibiteur ISRIB semble aussi avoir un effet lorsque les macrophages sont traités avec le DMSO, la BSA ou l' $\alpha$ -GalCer, trois composés pas connus pour induire la voie PERK. Il est donc nécessaire de répéter cette expérience plusieurs fois ainsi que de tester d'autres inhibiteurs de la voie PERK et IRE1 $\alpha$  pour montrer une possible implication du stress du RE dans l'activation des cellules iNKT par les macrophages cultivés dans un environnement riche en acides gras saturés.

Une perspective intéressante de ce travail serait d'étudier l'impact sur l'activation des cellules iNKT humaines d'une co-culture avec des macrophages (THP1-CD1d ou MDMs) cultivés pendant 24h dans du milieu enrichi en plasma de patients obèses ou d'individus contrôles. Un éventuel effet des plasmas de patients obèses sur l'activation des cellules iNKT pourrait être associé à la concentration en acides gras saturés ou autres lipides dans les plasmas.



## Bibliographie

- [1] Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):231-7. doi: 10.1038/nri1309. PMID: 15039760.
- [2] Díaz-Basabe A, Strati F, Facciotti F. License to Kill: When iNKT Cells Are Granted the Use of Lethal Cytotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2020 May 30;21(11):3909. doi: 10.3390/ijms21113909. PMID: 32486268; PMCID: PMC7312231.
- [3] Krijgsman D, Hokland M, Kuppen PJK. The Role of Natural Killer T Cells in Cancer-A Phenotypical and Functional Approach. *Front Immunol.* 2018 Feb 27;9:367. doi: 10.3389/fimmu.2018.00367. PMID: 29535734; PMCID: PMC5835336.
- [4] Antigen recognition in adaptive immunity. (2020a). [Diapositives]. ppt download. <https://slideplayer.com/slide/17230787/>
- [5] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:297-336. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711. PMID: 17150027.
- [6] Macho-Fernandez E, Brigl M. The Extended Family of CD1d-Restricted NKT Cells: Sifting through a Mixed Bag of TCRs, Antigens, and Functions. *Front Immunol.* 2015 Jul 28;6:362. doi: 10.3389/fimmu.2015.00362. PMID: 26284062; PMCID: PMC4517383.
- [7] Seino K, Taniguchi M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *J Exp Med.* 2005 Dec 19;202(12):1623-6. doi: 10.1084/jem.20051600. PMID: 16365145; PMCID: PMC2212962.
- [8] Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2008 Jun;20(3):358-68. doi: 10.1016/j.coi.2008.03.018. Epub 2008 May 22. PMID: 18501573; PMCID: PMC2546701.
- [9] Li Y, Girardi E, Wang J, Yu ED, Painter GF, Kronenberg M, Zajonc DM. The V $\alpha$ 14 invariant natural killer T cell TCR forces microbial glycolipids and CD1d into a conserved binding mode. *J Exp Med.* 2010 Oct 25;207(11):2383-93. doi: 10.1084/jem.20101335. Epub 2010 Oct 4. PMID: 20921281; PMCID: PMC2964572.
- [10] Krovi SH, Gapin L. Invariant Natural Killer T Cell Subsets-More Than Just Developmental Intermediates. *Front Immunol.* 2018 Jun 20;9:1393. doi: 10.3389/fimmu.2018.01393. PMID: 29973936; PMCID: PMC6019445.
- [11] Gapin L. Development of invariant natural killer T cells. *Curr Opin Immunol.* 2016 Apr;39:68-74. doi: 10.1016/j.coi.2016.01.001. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26802287; PMCID: PMC4801673.
- [12] Ryu S, Park JS, Kim HY, Kim JH. Lipid-Reactive T Cells in Immunological Disorders of the Lung. *Front Immunol.* 2018 Sep 26;9:2205. doi: 10.3389/fimmu.2018.02205. PMID: 30319649; PMCID: PMC6168663.
- [13] Pellicci, D.G., Koay, HF. & Berzins, S.P. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and  $\gamma\delta$  T cells emerge. *Nat Rev Immunol* 20, 756–770 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0345-y>
- [14] Rossjohn, J., Pellicci, D. G., Patel, O., Gapin, L., & Godfrey, D. I. (2012). Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nature reviews. Immunology*, 12(12), 845–857. <https://doi.org/10.1038/nri3328>
- [15] Bennis SB. Unraveling Natural Killer T-Cells Development. *Front Immunol.* 2018 Jan 9;8:1950. doi: 10.3389/fimmu.2017.01950. PMID: 29375573; PMCID: PMC5767218.
- [16] Chandra S, Kronenberg M. Activation and Function of iNKT and MAIT Cells. *Adv Immunol.* 2015;127:145-201. doi: 10.1016/bs.ai.2015.03.003. Epub 2015 Apr 25. PMID: 26073984.
- [17] Hu, T., Gimferrer, I., & Alberola-Ila, J. (2011). Control of early stages in invariant natural killer T-cell development. *Immunology*, 134(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03463.x>
- [18] Bassiri H, Nichols KE. It's up to you Egr2. *Immunol Cell Biol.* 2009 Jul;87(5):361-3. doi: 10.1038/icb.2009.20. Epub 2009 Mar 31. PMID: 19333249.
- [19] Bendelac A. (1995). Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *The Journal of experimental medicine*, 182(6), 2091–2096. <https://doi.org/10.1084/jem.182.6.2091>
- [20] Crosby CM, Kronenberg M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat Rev Immunol.* 2018 Sep;18(9):559-574. doi: 10.1038/s41577-018-0034-2. PMID: 29967365; PMCID: PMC6343475.
- [21] Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol.* 2010 Mar;11(3):197-206. doi: 10.1038/ni.1841. Epub 2010 Feb 7. PMID: 20139988.



- [22] Savage AK, Constantinides MG, Han J, Picard D, Martin E, Li B, Lantz O, Bendelac A. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):391-403. doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.011. Epub 2008 Aug 14. PMID: 18703361; PMCID: PMC2613001.
- [23] Kovalovsky D, Uche OU, Eladad S, Hobbs RM, Yi W, Alonzo E, Chua K, Eidson M, Kim HJ, Im JS, Pandolfi PP, Sant'Angelo DB. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol*. 2008 Sep;9(9):1055-64. doi: 10.1038/ni.1641. Epub 2008 Jul 27. PMID: 18660811; PMCID: PMC2662733.
- [24] Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):101-17. doi: 10.1038/nri3369. Epub 2013 Jan 21. PMID: 23334244.
- [25] Ghazarian L, Simoni Y, Magalhaes I, Lehuen A. Invariant NKT cell development: focus on NOD mice. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:83-8. doi: 10.1016/j.coi.2014.02.004. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24637104.
- [26] Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. The Response of CD1d-Restricted Invariant NKT Cells to Microbial Pathogens and Their Products. *Front Immunol*. 2015 May 13;6:226. doi: 10.3389/fimmu.2015.00226. PMID: 26029211; PMCID: PMC4429631.
- [27] Lee YJ, Holzapfel KL, Zhu J, Jameson SC, Hogquist KA. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol*. 2013 Nov;14(11):1146-54. doi: 10.1038/ni.2731. Epub 2013 Oct 6. Erratum in: *Nat Immunol*. 2014 Mar;15(3):305. PMID: 24097110; PMCID: PMC3824254.
- [28] Brailey, P.M., Lebrusant-Fernandez, M. and Barral, P. (2020), NKT cells and the regulation of intestinal immunity: a two-way street. *FEBS J*, 287: 1686-1699. <https://doi.org/10.1111/febs.15238>.
- [29] Riffelmacher T, Kronenberg M. Metabolic Triggers of Invariant Natural Killer T-Cell Activation during Sterile Autoinflammatory Disease. *Crit Rev Immunol*. 2020;40(5):367-378. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2020035158. PMID: 33463949; PMCID: PMC7116673.
- [30] Gapin L. iNKT cell autoreactivity: what is 'self' and how is it recognized? *Nat Rev Immunol*. 2010 Apr;10(4):272-7. doi: 10.1038/nri2743. Epub 2010 Mar 12. PMID: 20224567; PMCID: PMC3070484.
- [31] Eagle, R. A., Jafferji, I., & Barrow, A. D. (2009). Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. *Current immunology reviews*, 5(1), 22–34. <https://doi.org/10.2174/157339509787314369>.
- [32] Wu, L., & Van Kaer, L. (2011). Natural killer T cells in health and disease. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 3(1), 236–251. <https://doi.org/10.2741/s148>
- [33] Tyznik, A. J., Verma, S., Wang, Q., Kronenberg, M., & Benedict, C. A. (2014). Distinct requirements for activation of NKT and NK cells during viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(8), 3676–3685. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300837>.
- [34] La Cava A, Van Kaer L, Fu-Dong-Shi. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol*. 2006 Jul;27(7):322-7. doi: 10.1016/j.it.2006.05.003. Epub 2006 Jun 2. PMID: 16735139.
- [35] Kuylensstierna C, Björkström NK, Andersson SK, Sahlström P, Bosnjak L, Paquin-Proulx D, Malmberg KJ, Ljunggren HG, Moll M, Sandberg JK. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol*. 2011 Jul;41(7):1913-23. doi: 10.1002/eji.200940278. Epub 2011 Jun 6. PMID: 21590763; PMCID: PMC3523190.
- [36] Leite-De-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, Machavoine F, Koezuka Y, Schneider E, Herbelin A, Dy M. A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol*. 1999 Dec 1;163(11):5871-6. PMID: 10570271.
- [37] Cruz, M. S., Loureiro, J. P., Oliveira, M. J., & Macedo, M. F. (2022). The iNKT Cell-Macrophage Axis in Homeostasis and Disease. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1640. <https://doi.org/10.3390/ijms23031640>.
- [38] Gálvez NMS, Bohmwald K, Pacheco GA, Andrade CA, Carreño LJ, Kalergis AM. Type I Natural Killer T Cells as Key Regulators of the Immune Response to Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2020 Dec 23;34(2):e00232-20. doi: 10.1128/CMR.00232-20. PMID: 33361143; PMCID: PMC7950362.
- [39] Doherty DG, Melo AM, Moreno-Olivera A, Solomos AC. Activation and Regulation of B Cell Responses by Invariant Natural Killer T Cells. *Front Immunol*. 2018 Jun 18;9:1360. doi: 10.3389/fimmu.2018.01360. PMID: 29967611; PMCID: PMC6015876.



- [40] LaMarche NM, Kane H, Kohlgruber AC, Dong H, Lynch L, Brenner MB. Distinct iNKT Cell Populations Use IFN $\gamma$  or ER Stress-Induced IL-10 to Control Adipose Tissue Homeostasis. *Cell Metab.* 2020 Aug 4;32(2):243-258.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.05.017. Epub 2020 Jun 8. PMID: 32516575; PMCID: PMC8234787.
- [41] Kinjo Y, Takatsuka S, Kitano N, Kawakubo S, Abe M, Ueno K, Miyazaki Y. Functions of CD1d-Restricted Invariant Natural Killer T Cells in Antimicrobial Immunity and Potential Applications for Infection Control. *Front Immunol.* 2018 Jun 6;9:1266. doi: 10.3389/fimmu.2018.01266. PMID: 29928278; PMCID: PMC5997780.
- [42] Ho LP, Denney L, Luhn K, Teoh D, Clelland C, McMichael AJ. Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A virus infection. *Eur J Immunol.* 2008 Jul;38(7):1913-22. doi: 10.1002/eji.200738017. PMID: 18521958.
- [43] Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002838. doi: 10.1371/journal.ppat.1002838. Epub 2012 Aug 16. PMID: 22916008; PMCID: PMC3420949.
- [44] De Santo C, Salio M, Masri SH, Lee LY, Dong T, Speak AO, Porubsky S, Booth S, Veerapen N, Besra GS, Gröne HJ, Platt FM, Zamboni M, Cerundolo V. Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J Clin Invest.* 2008 Dec;118(12):4036-48. doi: 10.1172/JCI36264. Epub 2008 Nov 13. PMID: 19033672; PMCID: PMC2582442.
- [45] Taniguchi M, Seino K, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2003 Dec;4(12):1164-5. doi: 10.1038/ni1203-1164. PMID: 14639465.
- [46] Bae EA, Seo H, Kim IK, Jeon I, Kang CY. Roles of NKT cells in cancer immunotherapy. *Arch Pharm Res.* 2019 Jul;42(7):543-548. doi: 10.1007/s12272-019-01139-8. Epub 2019 Mar 11. PMID: 30859410.
- [47] Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, Bendelac A, Littman DR. Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity.* 2005 Jun;22(6):705-16. doi: 10.1016/j.immuni.2005.03.011. PMID: 15963785.
- [48] Shisler SC, Lee MS, Webb TJ. Mixed Signals: Co-Stimulation in Invariant Natural Killer T Cell-Mediated Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017 Nov 1;8:1447. doi: 10.3389/fimmu.2017.01447. PMID: 29163518; PMCID: PMC5671952.
- [49] Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y., & Godfrey, D. I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of experimental medicine*, 191(4), 661–668. <https://doi.org/10.1084/jem.191.4.661>
- [50] Cortesi F, Delfanti G, Grilli A, Calcinotto A, Gorini F, Pucci F, Lucianò R, Grioni M, Recchia A, Benigni F, Briganti A, Salonia A, De Palma M, Biciato S, Doglioni C, Bellone M, Casorati G, Dellabona P. Bimodal CD40/Fas-Dependent Crosstalk between iNKT Cells and Tumor-Associated Macrophages Impairs Prostate Cancer Progression. *Cell Rep.* 2018 Mar 13;22(11):3006-3020. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.058. PMID: 29539427.
- [51] Taniguchi M, Seino K, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2003 Dec;4(12):1164-5. doi: 10.1038/ni1203-1164. PMID: 14639465.
- [52] Brigi M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:817-90. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608. PMID: 15032598.
- [53] Barral, D., Brenner, M. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* 7, 929–941 (2007). <https://doi.org/10.1038/nri2191>
- [54] Jullien, D., Afanassieff, M., Claudy, A., Nicolas, J.F., & Kaiserlian, D. (1999). CD1 : une nouvelle famille de molécules présentatrices d'antigènes aux caractéristiques singulières. *M S-medicine Sciences*, 15, 7-14.
- [55] Major AS, Singh RR, Joyce S, Van Kaer L. The role of invariant natural killer T cells in lupus and atherogenesis. *Immunol Res.* 2006;34(1):49-66. doi: 10.1385/ir.34:1:49. PMID: 16720898; PMCID: PMC2291524.
- [56] Jayawardena-Wolf J, Benlagha K, Chiu YH, Mehr R, Bendelac A. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity.* 2001 Dec;15(6):897-908. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00240-0. PMID: 11754812.
- [57] Huang, S., & Moody, D. B. (2016). Donor-unrestricted T cells in the human CD1 system. *Immunogenetics*, 68(8), 577–596. <https://doi.org/10.1007/s00251-016-0942-x>





- [58] McEwen-Smith RM, Salio M, Cerundolo V. CD1d-dependent endogenous and exogenous lipid antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2015 Jun;34:116-25. doi: 10.1016/j.coi.2015.03.004. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25805574.
- [59] Florence WC, Bhat RK, Joyce S. CD1d-restricted glycolipid antigens: presentation principles, recognition logic and functional consequences. *Expert Rev Mol Med*. 2008 Jul 7;10:e20. doi: 10.1017/S1462399408000732. PMID: 18601810.
- [60] Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:173-94. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649. Epub 2014 Oct 27. PMID: 25387057; PMCID: PMC5568783.
- [61] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jan 18;13(2):89-102. doi: 10.1038/nrm3270. PMID: 22251901.
- [62] Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*. 2015 Mar;40(3):141-8. doi: 10.1016/j.tibs.2015.01.002. Epub 2015 Feb 2. PMID: 25656104; PMCID: PMC4340752.
- [63] Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K, Ohtake Y. ER Stress and Disease: Toward Prevention and Treatment. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(9):1337-1343. doi: 10.1248/bpb.b17-00342. PMID: 28867719.
- [64] Abdullahi A, Stanojic M, Parousis A, Patsouris D, Jeschke MG. Modeling Acute ER Stress in Vivo and in Vitro. *Shock*. 2017 Apr;47(4):506-513. doi: 10.1097/SHK.0000000000000759. PMID: 27755507; PMCID: PMC5348263.
- [65] Anand AA, Walter P. Structural insights into ISRIB, a memory-enhancing inhibitor of the integrated stress response. *FEBS J*. 2020 Jan;287(2):239-245. doi: 10.1111/febs.15073. Epub 2019 Nov 7. PMID: 31550413.
- [66] Obesity and overweight. (2021, 9 juin). World Health Organization. Consulté le 12 août 2022, à l'adresse <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#:~:text=Worldwide%20obesity%20has%20nearly%20tripled,%2C%20and%2013%25%20were%20obese>.
- [67] Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015 Jul;33(7):673-89. doi: 10.1007/s40273-014-0243-x. PMID: 25471927; PMCID: PMC4859313.
- [68] Soriguer F, García-Serrano S, García-Almeida JM, Garrido-Sánchez L, García-Arnés J, Tinahones FJ, Cardona I, Rivas-Marín J, Gallego-Perales JL, García-Fuentes E. Changes in the serum composition of free-fatty acids during an intravenous glucose tolerance test. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Jan;17(1):10-5. doi: 10.1038/oby.2008.475. Epub 2008 Oct 23. PMID: 18948964.
- [69] Michelet X, Dyck L, Hogan A, Loftus RM, Duquette D, Wei K, Beyaz S, Tavakkoli A, Foley C, Donnelly R, O'Farrelly C, Raverdeau M, Vernon A, Pettee W, O'Shea D, Nikolajczyk BS, Mills KHG, Brenner MB, Finlay D, Lynch L. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat Immunol*. 2018 Dec;19(12):1330-1340. doi: 10.1038/s41590-018-0251-7. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30420624.
- [70] Govindarajan S, Verheugen E, Venken K, Gaublomme D, Maelegheer M, Cloots E, Gysens F, De Geest BG, Cheng TY, Moody DB, Janssens S, Drennan M, Elewaut D. ER stress in antigen-presenting cells promotes NKT cell activation through endogenous neutral lipids. *EMBO Rep*. 2020 Jun 4;21(6):e48927. doi: 10.15252/embr.201948927. Epub 2020 May 3. PMID: 32363653; PMCID: PMC7271650.
- [71] Bedard M, Shrestha D, Priestman DA, Wang Y, Schneider F, Matute JD, Iyer SS, Gileadi U, Protá G, Kandasamy M, Veerapen N, Besra G, Fritzsche M, Zeissig S, Shevchenko A, Christianson JC, Platt FM, Eggeling C, Blumberg RS, Salio M, Cerundolo V. Sterile activation of invariant natural killer T cells by ER-stressed antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Nov 19;116(47):23671-23681. doi: 10.1073/pnas.1910097116. Epub 2019 Nov 5. PMID: 31690657; PMCID: PMC6876220.
- [72] L'homme L, Sermikli BP, Staels B, Piette J, Legrand-Poels S, Dombrowicz D. Saturated Fatty Acids Promote GDF15 Expression in Human Macrophages through the PERK/eIF2/CHOP Signaling Pathway. *Nutrients*. 2020 Dec 8;12(12):3771. doi: 10.3390/nu12123771. PMID: 33302552; PMCID: PMC7764024.



- [73] Team, P. (2015, 26 novembre). Physiology illustration : Whole blood is composed of plasma and formed elements. - PhysiologyWeb. Copyright © 2000–2019 PhysiologyWeb. Consulté le 6 août 2022, à l'adresse [https://www.physiologyweb.com/figures/physiology\\_illustration\\_mldtxQRJM8Hb5XThLuOWHp4Y4ei14Y85\\_whole\\_blood\\_is\\_composed\\_of\\_plasma\\_and\\_formed\\_elements.html](https://www.physiologyweb.com/figures/physiology_illustration_mldtxQRJM8Hb5XThLuOWHp4Y4ei14Y85_whole_blood_is_composed_of_plasma_and_formed_elements.html)
- [74] Salio M, Ghadbane H, Dushek O, Shepherd D, Cypen J, Gileadi U, Aichinger MC, Napolitani G, Qi X, van der Merwe PA, Wojno J, Veerapen N, Cox LR, Besra GS, Yuan W, Cresswell P, Cerundolo V. Saposins modulate human invariant Natural Killer T cells self-reactivity and facilitate lipid exchange with CD1d molecules during antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 3;110(49):E4753-61. doi: 10.1073/pnas.1310050110. Epub 2013 Nov 18. PMID: 24248359; PMCID: PMC3856826.
- [75] Aguilar EG, Murphy WJ. Obesity induced T cell dysfunction and implications for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2018 Apr;51:181-186. doi: 10.1016/j.coi.2018.03.012. Epub 2018 Apr 11. PMID: 29655021; PMCID: PMC6338436.
- [76] Lee H, Hong C, Shin J, Oh S, Jung S, Park YK, Hong S, Lee GR, Park SH. The presence of CD8+ invariant NKT cells in mice. *Exp Mol Med*. 2009 Dec 31;41(12):866-72. doi: 10.3858/emm.2009.41.12.092. PMID: 19745607; PMCID: PMC2802682.
- [77] Singh AK, Gaur P, Shukla NK, Das SN. Differential dendritic cell-mediated activation and functions of invariant NKT-cell subsets in oral cancer. *Oral Dis*. 2015 Jan;21(1):e105-13. doi: 10.1111/odi.12238. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24654917.
- [78] Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods*. 2004 Oct;293(1-2):127-42. doi: 10.1016/j.jim.2004.07.006. PMID: 15541283.
- [79] Caballano-Infantes E, García-García A, Lopez-Gomez C, Cueto A, Robles-Diaz M, Ortega-Alonso A, Martín-Reyes F, Alvarez-Alvarez I, Arranz-Salas I, Ruiz-Cabello F, Lucena IM, García-Fuentes E, Andrade RJ, García-Cortes M. Differential iNKT and T Cells Activation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Drug-Induced Liver Injury. *Biomedicines*. 2021 Dec 28;10(1):55. doi: 10.3390/biomedicines10010055. PMID: 35052736; PMCID: PMC8772872.
- [80] Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, Ceppi P. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ*. 2015 Apr;22(4):549-59. doi: 10.1038/cdd.2015.3. Epub 2015 Feb 6. Erratum in: *Cell Death Differ*. 2015 May;22(5):885-6. PMID: 25656654; PMCID: PMC4356349.
- [81] Dou R, Hong Z, Tan X, Hu F, Ding Y, Wang W, Liang Z, Zhong R, Wu X, Weng X. Fas/FasL interaction mediates imbalanced cytokine/cytotoxicity responses of iNKT cells against Jurkat cells. *Mol Immunol*. 2018 Jul;99:145-153. doi: 10.1016/j.molimm.2018.05.011. Epub 2018 May 18. PMID: 29783159.
- [82] Yang L, Guan G, Lei L, Lv Q, Liu S, Zhan X, Jiang Z, Gu X. Palmitic acid induces human osteoblast-like Saos-2 cell apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Stress Chaperones*. 2018 Nov;23(6):1283-1294. doi: 10.1007/s12192-018-0936-8. Epub 2018 Sep 7. PMID: 30194633; PMCID: PMC6237680.
- [83] Alnahdi A, John A, Raza H. Augmentation of Glucotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells by Palmitic Acid. *Nutrients*. 2019 Aug 22;11(9):1979. doi: 10.3390/nu11091979. PMID: 31443411; PMCID: PMC6770774.
- [84] Qaisiya M, Brischetto C, Jašprová J, Vitek L, Tiribelli C, Bellarosa C. Bilirubin-induced ER stress contributes to the inflammatory response and apoptosis in neuronal cells. *Arch Toxicol*. 2017 Apr;91(4):1847-1858. doi: 10.1007/s00204-016-1835-3. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27578021.
- [85] Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med*. 2015 Nov-Dec;24(6):931-41. doi: 10.17219/acem/31243. PMID: 26771963.
- [86] Reilly EC, Wands JR, Brossay L. Cytokine dependent and independent iNKT cell activation. *Cytokine*. 2010 Sep;51(3):227-31. doi: 10.1016/j.cyto.2010.04.016. PMID: 20554220; PMCID: PMC2914806.



- [87] Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol.* 2003 Dec;4(12):1230-7. doi: 10.1038/ni1002. Epub 2003 Oct 26. PMID: 14578883.
- [88] Eberl G, MacDonald HR. Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity.* 1998 Sep;9(3):345-53. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80617-2. PMID: 9768754.
- [89] Liu J, Gallo RM, Khan MA, Iyer AK, Kratzke IM, Brutkiewicz RR. JNK2 modulates the CD1d-dependent and -independent activation of iNKT cells. *Eur J Immunol.* 2019 Feb;49(2):255-265. doi: 10.1002/eji.201847755. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30467836; PMCID: PMC6452880.
- [90] Volmer R, van der Ploeg K, Ron D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 19;110(12):4628-33. doi: 10.1073/pnas.1217611110. Epub 2013 Mar 4. PMID: 23487760; PMCID: PMC3606975.