

Mémoire

Auteur : Bruneteaux, Marion

Promoteur(s) : Legrand, Sylvie

Faculté : Faculté des Sciences

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

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/21067>

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.

Université de Liège

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Vie

Activation stérile des cellules T non-conventionnelles, *invariant Natural Killer T cells* (iNKT), par des macrophages cultivés dans un milieu enrichi en lipides

Promotrice : **Sylvie Legrand**

Marion Bruneteaux

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master

en Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire

Année académique 2023-2024

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont aidé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Ce mémoire n'aurait pas pu voir le jour sans vous !

En premier lieu, j'adresse mes remerciements sincères à ma promotrice, Sylvie Legrand, pour l'accueil au sein de son laboratoire. Je lui suis reconnaissante pour son temps, sa confiance, sa patience et ses nombreux conseils très précieux lors de ces derniers mois. J'espère d'ailleurs avoir la chance dans le futur de poursuivre cette collaboration !

Deuxièmement, je remercie grandement Chloé Wilkin pour son accompagnement et son encadrement très patient et bienveillant. Je lui suis redevable de l'aide immense qu'elle m'a apporté lors des manipulations mais également pour les corrections de ce manuscrit. Elle m'a apporté un précieux support lors de la finalisation de ce travail. Grâce à sa présence, j'ai eu l'occasion de vivre une réelle expérience enrichissante autant académiquement que personnellement !

Je remercie également l'ensemble des personnes des laboratoires de virologie et d'immunologie qui m'ont soutenu via leurs conseils avisés pendant la réalisation de ce travail. Je pense particulièrement à Cédric Lassence, Marielle Lebrun et Victoire Mouton. Il m'est aussi important de remercier l'entièreté des laboratoires d'immunométabolisme et nutrition, de virologie et immunologie et PSI pour leur accueil et leur bonne humeur contagieuse.

Un autre tout grand merci revient aux autres mémorants avec qui j'ai eu le plaisir de partager cette expérience : Lola Adam, Manon Koumoth, Florine Pitti, Elise Gilson et Christophe Vigneaux. Je leur suis reconnaissante de l'entraide et de l'agréable collaboration qu'on a pu avoir ces derniers mois.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis et plus particulièrement ma sœur, Aline, et ma mère, Ingrid, pour leurs encouragements et leurs soutiens inconditionnels. Je salue la patience de ma sœur pour mes retards presque quotidien à la sortie du laboratoire. Enfin, je suis reconnaissante pour le temps consacré aux nombreuses relectures de ce travail spécialement par ma mère et ma belle-mère.

TABLE DES MATIÈRES

1	Introduction	1
1.1	Les lipides	1
1.1.1	Les acides gras.....	1
1.1.2	Le métabolisme des acides gras	2
1.1.3	La dyslipidémie chez les patients obèses	3
1.2	Le stress du réticulum endoplasmique.....	4
1.2.1	Les trois voies de l'UPR.....	5
1.2.2	L'UPR et les acides gras.....	7
1.3	Les cellules iNKT	8
1.3.1	Les particularités des cellules iNKT	8
1.3.2	Les sous-populations des cellules iNKT	10
1.3.3	Modes d'activation des cellules iNKT	11
1.3.4	Les rôles des cellules iNKT.....	12
1.3.5	Le CD1d	13
1.3.6	Interactions entre les cellules iNKT et les macrophages.....	14
1.4	Les cellules iNKT et leur lien avec l'obésité.....	15
1.4.1	Les cellules iNKT dans les tissus adipeux obèses	16
2	Objectifs	18
3	Matériel et méthodes.....	20
3.1	Tampons et solutions	20
3.2	Lignées cellulaires.....	22
3.3	Culture cellulaire.....	22
3.3.1	Décongélation et culture cellulaire	22
3.3.2	Mise au repos des cellules iNKT	23
3.4	Différenciation THP-1-CD1d en macrophages à l'aide du PMA	23
3.5	Traitements des THP1-CD1d.....	24
3.6	Coculture.....	25

3.7	ELISA	26
3.8	Cytométrie en flux	27
3.8.1	Préparation des « <i>carrier cells</i> »	27
3.8.2	Préparation des échantillons pour la cytométrie en flux	27
3.9	Test de viabilité	29
3.10	Western blot	30
3.10.1	Extraction des protéines	30
3.10.2	Dosage protéique	30
3.10.3	Western blot	30
3.11	Programmes et analyses statistiques	31
4	Résultats.....	33
4.1	Activation des cellules iNKT par des macrophages pré-traités avec des acides gras saturés	33
4.2	Évaluation de l'implication du CD1d dans l'activation des cellules iNKT	36
4.2.1	L'activation des cellules iNKT exige un contact avec les macrophages	36
4.2.2	L'activation des cellules iNKT implique leur TCR.....	38
4.2.3	L'activation des cellules iNKT est dépendante de la présentation d'antigène lipidique via le CD1d	39
4.3	Etude de l'implication des voies du stress du RE dans l'activation des cellules iNKT .	41
4.3.1	Évaluation de l'implication de la voie de IRE1	41
4.3.2	Évaluation de la voie de PERK	44
5	Discussion	50
5.1	Partie 1 : Implication du CD1d dans l'activation indirecte des cellules iNKT.....	51
5.2	Partie 2 : Implication des voies d'IRE1 et de PERK dans l'activation indirecte des cellules iNKT	56
6	Bibliographie	60
7	Annexes	68

ABBREVIATIONS

- α -GalCer : α -galactosylcéramide
- Acétyl-CoA : Acétyl-coenzyme A
- AP : Protéine adipocyte
- APS : Persulfate d'ammonium
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- ARNt : Acide ribonucléique de transfert
- ATF : *Activating transcription factor*
- ATP : Adénosine triphosphate
- BiP : *Binding immunoglobuline protein*
- BSA : *Bovin Serum Albumin*
- CD : *Cluster of Differentiation*
- CHOP : *C/EBP Homologous Protein*
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
- eiF2 α : *eukaryotic initiation factor 2 α*
- ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- FBS : *Fetal Bovin Serum*
- GSK2606414 : 7-Methyl-5-(1-([3-(trifluorométhyl)phényl]acétyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine
- GTP : Guanosine triphosphate
- HEPES : Acide sulfonique N-2-hydroxyéthylpiperazine-N-2-éthane
- HDL : Lipoprotéine de forte densité
- HRP : Péroxydase de raifort
- HSP : *Heat Shock Protein*
- IFN : Interféron
- IGEPAL : Octylphenoxyethoxyethanol
- IL : Interleukine
- IMC : Indice de masse corporel
- iNKT : *Invariant Natural Killer T cell*
- IRE1 : *Inositol Requiring Enzyme type 1*

- ISRIB : *Integrated Stress Response Inhibitor*
- LDL : Lipoprotéine de faible densité
- OMS : Organisme Mondial de la Santé
- MFI : *Median Fluorescence Intensity*
- MTP : Protéine de transfert de triglycéride microsomal
- MTT : 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide
- NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NK : *Natural killer*
- NKG2D : *Natural killer group 2 member D*
- NKT : *Natural killer T-cell*
- PBS : *Phosphate-Buffered Saline*
- PERK : *Protein Kinase R-like ER kinase*
- PMA : Phorbol-12-myristate-13-acetate
- PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyl
- PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*
- PVDF : Fluorure de polyvinylidène
- RAR : Récepteur d'acide rétinoïque
- RE : Réticulum Endoplasmique
- RIDD : *Regulated IRE1-Dependant Decay*
- rpm : rotation par minute
- S1/2P : *Site-1/2 Protease*
- siARN : Petit ARN interférent
- SD : *Standard deviation*
- SDS : Dodécylsulfate de sodium
- TA : Température ambiante
- TCR : Récepteur des cellules T
- Thapsi : Thapsigargine
- TLR : Récepteur de type Toll
- TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
- TNF : *Tumor necrosis factor*
- TR 4x : Tampon de chargement 4x
- UPR : *Unfolded Protein Response*
- VLDL : Lipoprotéine de très faible densité
- WB : *Western blot*
- XBP1 : *X-Box Protein 1*

1 INTRODUCTION

1.1 LES LIPIDES

Les lipides, communément connus comme matière grasse, sont des macromolécules biologiques essentielles au développement et à l'homéostasie d'un individu^{1,2}. Les lipides ont des fonctions diverses et variées. Ce sont les constituants majeurs des membranes biologiques mais ils représentent aussi une source d'apport énergétique^{1,2}. Les lipides forment un grand groupe hétérogène composé, entre autres, des acides gras, des triglycérides, des stérols, des phospholipides et des lipoprotéines¹. Nous nous sommes majoritairement intéressés aux acides gras lors de ce mémoire. Ils seront donc principalement détaillés par la suite.

1.1.1 Les acides gras

Le rôle principal des acides gras dans l'organisme est l'apport énergétique².

Les acides gras sont composés d'un groupement carboxylique suivi d'une chaîne hydrocarbonée non-ramifiée² (**Figure 1**). La longueur de la chaîne hydrocarbonée varie entre 4 et 32 atomes de carbones, bien que les acides gras les plus courants chez les mammifères comprennent 12 à 24 atomes de carbones². La longueur de la chaîne hydrocarbonée comporte généralement un nombre paire d'atomes de carbone².

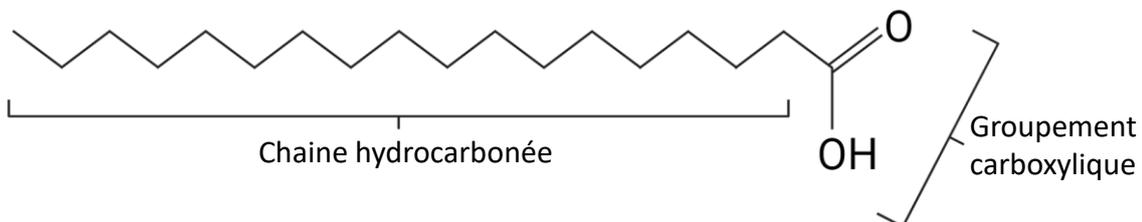


Figure 1 : Représentation d'un acide gras saturé en particulier l'acide stéarique ou C18:0. Les acides gras sont divisés en deux parties : la chaîne hydrocarbonée et le groupement carboxylique. Figure créée via Biorender.com.

Les acides gras existent sous plusieurs formes. On distingue les acides gras saturés des acides gras insaturés^{1,2}. Les acides gras saturés sont caractérisés par leur absence de doubles liaisons entre les atomes de carbone qui constituent leur chaîne hydrocarbonée^{1,2}. Ce sont des acides gras qui peuvent être obtenus dans l'alimentation essentiellement à partir de produits animaux tel que le beurre, le lard, mais également à partir de sources végétales comme l'huile de palme ou encore le chocolat². À l'inverse, les acides gras insaturés possèdent une ou plusieurs liaisons doubles entre les atomes de carbone de leur chaîne hydrocarbonée^{1,2}. Les acides gras insaturés sont également issus de l'alimentation mais généralement de produits végétaux comme l'huile d'olive

ou de tournesol pour les acides gras mono-insaturés². Les acides gras poly-insaturés se retrouvent dans certaines graines comme le soja mais peuvent également être issus de poissons gras comme le saumon ou encore le thon².

Les acides gras sont nommés sous la forme : Cx:y. Le C signifie carbone, le x correspond au nombre de carbones de la chaîne hydrocarbonée et le y correspond au nombre de liaisons insaturées dans la chaîne².

Les acides gras les plus abondants dans l'organisme sont les acides gras composés de 16 ou de 18 atomes de carbone, appelés respectivement acide palmitique (C16:0) et acide stéarique (C18:0) alors qu'ils sont nommés acide palmitoléique (C16:1) et acide oléique (C18:1) pour leur version monoinsaturée^{1,2}.

1.1.2 Le métabolisme des acides gras

Comme mentionné précédemment, les acides gras proviennent majoritairement de l'alimentation². Lorsque les acides gras sont assimilés par les entérocytes dans l'intestin, ils sont transformés en triglycérides afin d'être transportés vers un lieu de stockage³. Les triglycérides sont majoritairement stockés dans les tissus adipeux bien que le foie soit également un lieu de stockage⁴. Afin d'être transportés vers les lieux de stockage, les triglycérides sont véhiculés par différentes lipoprotéines³. En effet, les triglycérides sont des composés hydrophobes et ils n'ont donc pas la capacité de se dissoudre dans le sang².

Les lipoprotéines, transportant les triglycérides, sont triées en fonction de leur densité. On retrouve ainsi, classé en fonction de leur densité croissante : les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les lipoprotéines de forte densité (HDL)⁵. Les chylomicrons, produits par les cellules de l'intestin, vont servir à transporter les triglycérides dans la lymphe tandis que les VLDL et LDL transportent les acides gras dans le sang vers leurs lieux de stockage⁵. Une fois arrivé à destination, la lipoprotéine va relarguer des triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase⁶ et ceux-ci seront stockés dans les cellules⁴.

Lorsque le besoin en énergie se fait sentir, les triglycérides sont dégradés par lipolyse en acides gras et en glycérol, qui se retrouvent dans le sang⁷. Lorsque les acides gras se retrouvent dans la circulation, ils sont qualifiés de « libres »⁸. Similairement aux triglycérides, les acides gras libres doivent être liés à un véhicule qui est l'albumine⁹. Les acides gras sont véhiculés jusqu'aux cellules nécessitant de l'énergie et sont ensuite transformés en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) par β -oxydation^{8,10}. L'acétyl-CoA rentre dans le cycle de Krebs afin de produire de l'adénosine triphosphate (ATP) et ainsi générer l'énergie requise à la cellule¹⁰. Seule une faible proportion des triglycérides transformés en acides gras est en réalité utilisée pour produire de l'énergie¹¹.

Effectivement, 75 % des acides gras ainsi formés parcourent le sang sans être oxydés, cela permet à l'organisme d'avoir une source d'énergie directement mobilisable¹¹. Une grande quantité d'acide gras libres parcourt donc le sang en permanence.

Pour entrer dans les cellules, les acides gras libres nécessitent un récepteur afin de traverser la membrane plasmique, le « *Cluster of Differentiation* » (CD)36¹²⁻¹⁴. Le CD36 est essentiel pour les acides gras à chaîne longue, comme le C16:0 et le C18:0^{13,14}. Par contre, les acides gras courts ou insaturés pénètrent généralement plus facilement dans la cellule via un phénomène de « Flip-flop »¹⁵. Le « Flip-Flop » est un phénomène de diffusion passive qui permet aux acides gras libérés de l'albumine de passer d'un côté à l'autre de la membrane plasmique¹⁵.

1.1.3 La dyslipidémie chez les patients obèses

Le laboratoire d'immunométabolisme et nutrition a commencé à s'intéresser aux acides gras dans le contexte de l'obésité. Un individu est considéré obèse par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), lorsque son indice de masse corporel (IMC) est supérieur à 30 kg/m²¹⁶. L'IMC est calculé en divisant le poids d'un individu en kg sur sa taille en mètre au carré selon la formule suivante¹⁶ :

$$\frac{\text{Poids (kg)}}{\text{Taille}^2 \text{ (m)}}$$

Chez des personnes obèses, plusieurs phénomènes sont observables : l'hypertrophie et hyperplasie des adipocytes, une infiltration des macrophages dans les tissus adipeux, une augmentation des macrophages ayant un profil pro-inflammatoire et une modulation de la sécrétion d'adipokines¹⁷⁻¹⁹. Outre ces phénomènes, l'obésité est également accompagnée d'une dyslipidémie²⁰⁻²².

La dyslipidémie est définie comme une modification du profil lipidique d'un individu. Environ 60 à 70 % des individus obèses sont sujets à la dyslipidémie²¹. La dyslipidémie du patient obèse est marquée par une augmentation des triglycérides, des LDL et des VLDL. À l'inverse, les HDL sont moins abondantes²⁰⁻²². Il a également été montré que les acides gras sont présents en quantité plus importante chez les personnes obèses par rapport aux personnes saines^{20,23}. Plusieurs raisons de cette augmentation ont été mises en évidence.

Premièrement, l'augmentation d'acides gras est le résultat de la mort des adipocytes par hypoxie¹⁷. En effet, suite à l'augmentation du nombre et de la taille de ces cellules, leur besoin en oxygène augmente^{17,18}. Cependant, tous les adipocytes ne peuvent pas être correctement pourvus en oxygène et une partie finit donc par mourir^{17,18}. Lorsque les adipocytes meurent, la totalité de leur

contenu est relarguée dans le milieu extracellulaire, y compris leur réserve de triglycérides et d'acides gras dont une partie atteindra le sang¹⁷.

Une autre cause de l'augmentation sanguine des acides gras est la résistance à l'insuline²⁴. Une résistance à l'insuline est observée chez le patient obèse et découle d'une hyposensibilité des cellules aux effets de l'insuline²⁴. La résistance à l'insuline est définie comme la modification de l'impact de l'insuline sur le métabolisme du glucose²⁵. Plus précisément, l'insuline ne permettra pas de manière efficace le stockage du glucose présent dans le sang notamment par les adipocytes²⁵. Outre ces effets, sur la glycémie, l'insuline possède également un rôle important dans la régulation du stockage des lipides, entre autre par inhibition de la lipolyse. Ainsi, une résistance à l'insuline perturbe la régulation de la quantité d'acides gras dans le sang²⁴.

L'augmentation des acides gras dans le sang des personnes obèses a différentes conséquences. Par exemple, les acides gras saturés ont un lien établi avec une hausse du taux de cholestérol, particulièrement des LDL, dans le sang²⁶⁻²⁸. En effet, les LDL sont formées en fonction de la quantité de triglycérides, donc d'acides gras, qu'il y a dans le sang²⁸. Comme chez les obèses il y a davantage d'acides gras libres, il y a davantage de cholestérol dans le sang²⁶. L'augmentation du cholestérol est associée à différentes maladies comme des maladies cardiovasculaires^{2,27,28}. Ce dernier favorise ainsi la formation de plaques ou de caillots dans le sang qui conduisent notamment à de l'athérosclérose, une thrombose ou même la mort².

1.2 LE STRESS DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE

Le réticulum endoplasmique (RE) est une organelle responsable de divers rôles essentiels au sein de l'organisme, notamment la synthèse et le repliement des protéines, le stockage des ions calcium et la synthèse des lipides^{29,30}. Par conséquent, un déséquilibre de son homéostasie a des effets considérables sur la cellule. Un stress du RE peut résulter d'une accumulation de protéines non ou mal repliées, d'un dérèglement de l'homéostasie du calcium ou même d'un problème lipidique²⁹⁻³¹. L'accumulation de protéines non ou mal repliées peut être indirectement due à plusieurs facteurs comme l'hypoxie, une infection virale, un manque d'ion Ca^{2+} ou encore une glycosylation anormale^{30,31}. Le stress au niveau du RE a pour conséquence une augmentation temporaire du nombre de protéines non ou mal repliée³¹. Ce phénomène conduit à l'activation de l'UPR ou « *Unfolded Protein Response* » qui a justement pour but de palier à l'augmentation du mauvais repliement des protéines²⁹⁻³¹.

Le rôle principal de l'UPR est de limiter l'accumulation du nombre de protéines non ou mal repliées dans la cellule²⁹⁻³¹. Pour ce faire, il influence la quantité totale de protéines en diminuant le processus de synthèse et en induisant la dégradation de protéines non ou mal repliées²⁹⁻³¹.

Il existe des agents pharmacologiques qui ont pour rôle d'induire un stress du RE et par conséquent l'UPR (ex. thapsigargine et tunicamycine)³⁰. La thapsigargine inhibe les pompes ATP/Ca²⁺ au niveau de la membrane sarcoplasmique tandis que la tunicamycine perturbe la N-glycosylation des protéines³⁰.

Chez les mammifères, l'UPR est complexe et divisée en trois voies ; la voie PERK ou « *Protein Kinase R-like ER kinase* », la voie IRE1 pour « *Inositol Requiring Enzyme type 1* » et la voie ATF6 pour « *Activating Transcription Factor* »⁶³¹ (**Figure 2**). ATF6, PERK et IRE1 α sont des récepteurs transmembranaires du RE²⁹⁻³¹.

Les sections suivantes décrivent le mécanisme de chaque voie.

1.2.1 Les trois voies de l'UPR

1.2.1.1 La voie d'ATF6

La voie d'ATF6 est la voie la moins étudiée et par conséquent la moins connue à ce jour. Certains mécanismes de l'activation d'ATF6 sont d'ailleurs toujours méconnus³¹. Néanmoins, l'activation d'ATF6 nécessite la dissociation de BiP pour « *Binding immunoglobulin Protein* » du domaine luminal d'ATF6^{31,32} (**Figure 2 A**). Dans des conditions normales, BiP est liée à ATF6 et empêche son activation^{31,32}. BiP est une chaperonne du RE de la famille « *Heat Shock Protein* » (HSP) 70³³ qui possède une forte affinité pour les protéines non ou mal repliées³³. Lorsque la présence de celles-ci augmente dans le lumen du RE, BiP se lie préférentiellement aux protéines non ou mal repliées, libérant ainsi le domaine luminal d'ATF6^{31,32}. Une fois libéré de BiP, ATF6 migre dans l'appareil de Golgi. ATF6 régule l'expression de gènes en agissant directement dans le noyau^{31,32}. Pour ce faire, il faut que le domaine cytoplasmique d'ATF6 soit clivé et qu'il entre dans le noyau³¹. Les protéines S1P et S2P (« *Site-1/2 Protease* ») sont probablement responsables du clivage du domaine cytoplasmique d'ATF6 mais la protéine qui transporte le domaine cytoplasmique d'ATF6 n'a pas encore été identifiée³¹.

Dans le cadre de ce mémoire, la voie d'ATF6 n'a pas été étudiée.

1.2.1.2 La voie de PERK

L'activation de la voie de PERK dépend également de la dissociation de BiP du domaine luminal de PERK^{31,32} (**Figure 2 B**). Dans des conditions normales, BiP est aussi liée à un monomère de PERK et empêche son activation^{31,32}. En présence de protéines non ou mal repliées, BiP se détache du monomère de PERK pour se lier à ces protéines^{31,32}. Cela conduit à l'activation de PERK via l'oligomérisation et la transphosphorylation de ses monomères³¹.

En temps normal, c'est-à-dire sans stress du RE, le complexe de pré-initiation ou complexe 43S se lie aux acides ribonucléiques messagers (ARNm) et scanne ce dernier jusqu'au premier codon « AUG » rencontré³¹. Ce complexe 43S est formé de « *eukaryotic initiation factor* » 2α (eIF2α), de guanosine triphosphate (GTP) et de l'initiateur méthionyl-ARN transfert (ARNt)³¹. La liaison du complexe 43S sur le codon « AUG » permet la formation du complexe 60S et l'initiation de la traduction³¹. Par contre, une fois activé à la suite d'un stress du RE, PERK phosphoryle eIF2α au niveau de la sérine 51^{31,32} ce qui empêche la formation du complexe 43S de la traduction³¹. Ainsi la traduction est diminuée pour la grande majorité des ARNm, excepté pour l'ARNm *ATF4* qui est d'autant plus traduit lors d'un stress du RE chez les vertébrés^{31,32}. ATF4 ainsi produit permet d'induire l'expression d'ATF3 et de « *C/EBP Homologous Protein* » (CHOP)^{31,32}. CHOP intervient dans l'apoptose des cellules alors que de ATF3 intervient dans la déphosphorylation de eIF2α^{31,32}.

Deux inhibiteurs de cette voie ont été utilisés lors du présent mémoire : le trans-ISIRIB (« *Integrated Stress Response Inhibitor* ») qui inactive la forme phosphorylée d'eIF2α³⁴ et GSK2606414 (7-Methyl-5-(1-[[3-(trifluorométhyl)phényl]acétyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine) qui inhibe l'activité kinase de PERK³⁵ (**Figure 2 B**).

1.2.1.3 La voie d'IRE1

La voie IRE1 est la voie de l'UPR la plus conservée au cours de l'évolution³¹. C'est la seule voie de l'UPR que l'on peut retrouver chez les levures, cela démontre l'importance de cette voie dans la régulation du stress du RE³¹. L'enclenchement de la voie d'IRE1 est similaire à celle de PERK^{31,32}. En effet, l'activation est engendrée par la libération de BiP du domaine luminal d'IRE1α^{31,32} (**Figure 2 C**).

Suite à son activation, le domaine endonucléase de IRE1α clive l'ARNm *XBP1u* (« *X-Box Protein 1 unspliced* »)^{31,32}. Ce clivage permet l'excision d'un intron et la maturation de l'ARNm dans sa forme « splicée » (*XBP1s*)^{31,32}. L'ARNm *XBP1s* est alors traduit en protéine, appelée XBP1s. Une fois formée, XBP1s entre dans le noyau où elle favorise la transcription de plusieurs enzymes impliquées dans le repliement de protéines^{31,32}. La traduction d'*XBP1s* a pour conséquence d'augmenter la taille et l'efficacité du RE pour pallier au stress dont il est victime³⁶.

En parallèle, l'activation de la voie de IRE1 est également responsable de la mise en route du « *regulated IRE1-dependant decay* » (RIDD)^{31,32}. Le RIDD, est une voie permettant la dégradation non-spécifique d'ARNm au niveau des cellules soumises à un stress du RE^{31,32}. Si l'accumulation de protéines non ou mal repliées se poursuit dans la cellule, le RIDD peut conduire à l'apoptose de la cellule concernée^{31,36}. Bien que le RIDD ait un rôle régulateur de l'homéostasie, il va peu à peu dégrader des ARNm de protéines nécessaires à la survie de la cellule. Si le stress est trop sévère, ce phénomène conduit à l'apoptose de la cellule stressée^{31,36}.

Pour étudier cette voie, l'inhibiteur MKC-8866 a été choisi (**Figure 2 C**). Il agit directement sur IRE1 α en inhibant son activité ribonucléase et par conséquent en empêchant l'épissage de l'ARNm *XBP1u* et donc la production de la protéine XBP1s³⁷.

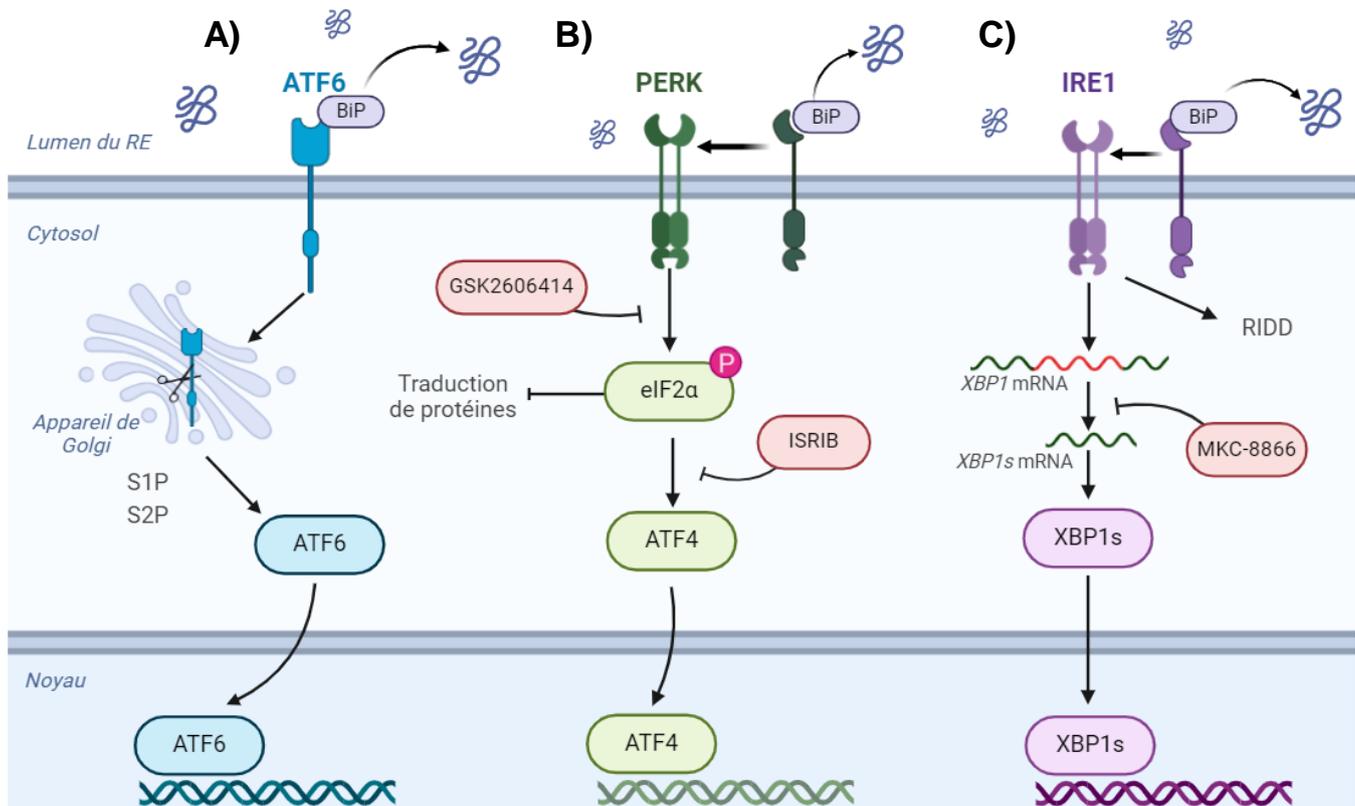


Figure 2 : Représentation de l'activation des trois voies de l'UPR lors de la présence de protéines non ou mal repliées. **A)** La voie d'ATF6 **B)** La voie de PERK **C)** Voie d'IRE1. En encadré rouge, sont identifiés les trois inhibiteurs utilisés dans ce mémoire et leur action sur les différentes voies de l'UPR. Figure créée via Biorender.com.

1.2.2 L'UPR et les acides gras

De façon intéressante, il a été démontré que les acides gras sont capables d'induire un stress du RE en activant la cascade de l'UPR³⁸⁻⁴⁰. La manière dont les acides gras déclenchent un stress du RE est relativement différente par rapport à celle d'un inducteur classique^{39,40}. En effet, les inducteurs classiques induisent une accumulation de protéines non ou mal repliées dans le lumen du RE³⁰. Ainsi, les protéines PERK, IRE1 α et ATF6 sont activées via leur domaine luminal lors du départ de BiP³¹. Or, pour les acides gras, l'activation de l'UPR est dépendante du domaine transmembranaire et non du domaine luminal de PERK et IRE1 α ^{39,40}. Lorsque les acides gras entrent dans la cellule, ils s'insèrent dans la membrane du RE ce qui a pour conséquence de rigidifier sa membrane plasmique³⁹. En effet, les acides gras, particulièrement les acides gras saturés, possèdent des températures de fusion importantes, autour de 60-65 °C². Cette rigidification va ensuite entraîner une activation du domaine transmembranaire de PERK et d'IRE1 en favorisant leur oligomérisation^{39,40}.

À noter, l'UPR et le métabolisme des lipides sont deux voies de signalisation interconnectées³⁶. En plus d'avoir lieu au sein de la même organelle, l'UPR est responsable de la régulation de plusieurs voies de signalisation du métabolisme des lipides notamment la voie de l'élongation, de l'oxydation et de la lipogenèse des acides gras³⁶.

1.3 LES CELLULES iNKT

Les cellules iNKT ou « *invariant Natural Killer T-cells* » représentent une sous-population des « *Natural Killer T-cells* » ou NKT⁴¹⁻⁴³. Ces dernières sont des cellules immunes, plus particulièrement des lymphocytes T non-conventionnels⁴¹⁻⁴³. Le nom « NKT » vient du fait que ces cellules possèdent à la fois des caractéristiques de lymphocytes T et de cellules « *Natural Killer* » (NK)⁴¹⁻⁴³. Les cellules NKT sont des lymphocytes T puisqu'elles expriment un récepteur des cellules T (TCR) mais elles expriment également certains récepteurs des NK : le NK1.1 ou CD161, le NKG2D (« *Natural killer group 2 member D* ») et d'autres récepteurs de la famille des Ly49⁴¹⁻⁴³. Elles possèdent aussi des capacités cytotoxiques par leur sécrétion de perforines et de granzymes^{41,42}. Les cellules NKT expriment aussi constitutivement certains marqueurs, entre autres les marqueurs d'activation CD25 et CD69^{41,43}.

1.3.1 Les particularités des cellules iNKT

La particularité principale des NKT réside dans leur TCR (semi-)invariant⁴². Suivant leur TCR, il est possible de distinguer les cellules NKT de type I ou iNKT pour « *invariant Natural killer T-cells* » et les cellules NKT de type II ou « *variant* » NKT^{41,44}. Bien que le nom iNKT suggère que le TCR est invariable, celui-ci est en réalité semi-invariable chez la souris mais invariable chez l'homme^{42,44}. Le TCR est composé de deux chaînes différentes : une chaîne α et une chaîne β . Chacune de ces chaînes est divisée en deux domaines : un domaine constant et un domaine variable^{42,44} (**Figure 3**). Chez l'homme, le TCR des cellules iNKT est composé de la chaîne alpha Va24-Ja18 toujours associée à la chaîne V β 11^{41,42,44}. À l'inverse, chez les souris, le TCR des cellules iNKT est un peu plus diverse^{41,42,44}. En effet, la chaîne Va14-Ja18 peut être associée à 5 chaînes β différentes (V β 8.1-3, V β 2 et V β 7)⁴⁴. Ainsi chez la souris, la diversité d'antigènes reconnus par le TCR provient des boucles CDR situées à l'extrémité des domaines variables du TCR⁴⁴ (**Figure 3**). En ce qui concerne les cellules NKT de type II, celles-ci possèdent un TCR moins limité et donc plus difficile à étudier^{41,44}.

Une autre différence des NKT de type I et II repose sur le type d'antigène reconnu⁴¹. Les cellules iNKT sont capables de reconnaître des glycolipides et des phospholipides⁴². Grâce à leur TCR plus variable, les NKT de type II sont capables de reconnaître des peptides hydrophobes endogènes en plus de certains glycolipides et phospholipides⁴⁵.

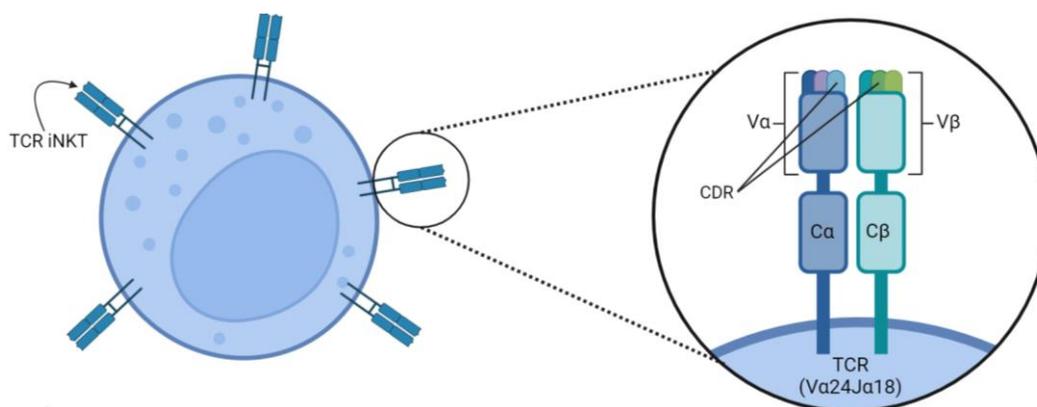


Figure 3 : TCR des cellules iNKT. Zoom sur le TCR des cellules iNKT. Figure réalisée via BioRender.com

Les cellules iNKT se distinguent également des NKT de type II par leur capacité à reconnaître l' α -galactosylcéramide (α -GalCer)⁴¹. L' α -GalCer est un glycolipide qui a initialement été découvert chez une éponge marine, *Agelas mauritanus*^{43,46}. Il a ensuite été observé que ce lipide est dérivé de la paroi bactérienne d'une bactérie vivant à l'intérieur du spongiaire, *Novosphingobium*⁴³. Ce composé a vite intéressé les chercheurs à cause de sa capacité à activer fortement les cellules iNKT. Ce glycolipide est aujourd'hui utilisé comme inducteur ou contrôle positif dans de nombreuses recherches sur les cellules iNKT⁴³.

La reconnaissance des antigènes lipidiques par les cellules iNKT est uniquement possible par l'interaction entre leur TCR et le récepteur CD1d^{42,43}, un homologue du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I^{44,47}. Le CD1d sera détaillé dans le paragraphe **1.3.5**.

Une deuxième spécificité des cellules iNKT est le fait qu'elles sont considérées comme des cellules intermédiaires de l'immunité en appartenant à la fois à l'immunité adaptative et à l'immunité innée^{41,43}. Elles sont impliquées dans l'immunité innée par le fait qu'elles possèdent des récepteurs des cellules NK, par leur capacité à produire de la perforine et des granzymes et par leur rapidité de réaction et de sécrétion de cytokines suite à une infection⁴¹⁻⁴³. Par contre, elles sont considérées comme des cellules de l'immunité adaptative parce qu'elles possèdent un TCR capable de reconnaître spécifiquement certains types antigènes, ici des antigènes lipidiques⁴¹⁻⁴³.

Une dernière caractéristique importante des cellules iNKT est leur capacité à entretenir des interactions avec une multitude de cellules immunes : neutrophiles, lymphocytes B, cellules NK, cellules dendritiques, macrophages⁴⁸. En effet, les cellules iNKT communiquent avec ces cellules par l'intermédiaire de cytokines, de chémokines et de récepteurs⁴⁸. Ainsi, elles vont notamment pouvoir induire l'activation des lymphocytes T et B mais également des cellules NK, des cellules dendritiques et des macrophages⁴⁸. De plus, les cellules iNKT promeuvent le recrutement des neutrophiles ainsi que la régulation de leur action⁴⁸. Une autre action des cellules iNKT est l'induction de la polarisation des macrophages⁴⁸ qui sera détaillée dans le paragraphe **1.3.6**.

Finalement, il est important de se rendre compte que les cellules iNKT sont des cellules rares. Elles représentent en effet entre 0,01 et 0,2 % des lymphocytes T circulant chez l'homme^{41,48}. Chez la souris par contre, les cellules iNKT sont environ 10 fois plus abondantes et représentent ainsi près de 0,1 à 1 % des lymphocytes T circulant^{41,48}. Par ailleurs, la fréquence des cellules iNKT varie fortement en fonction de l'organe auquel on s'intéresse. Par exemple, chez la souris, dans la rate, dans les tissus adipeux ou dans le foie, elles représentent encore un plus grand pourcentage : 2,5 %, 15-20 % et 40 % respectivement⁴¹.

1.3.2 Les sous-populations des cellules iNKT

Il y existe trois sous-populations majeures de cellules iNKT selon sur les cytokines sécrétées par ces cellules^{41,48,49} (**Figure 4**). On distingue :

- Les cellules NKT1 ou Th1 iNKT : ces cellules ont un profil pro-inflammatoire. Elles produisent majoritairement de l'interféron (IFN)- γ et du « tumor necrosis factor » (TNF) α ^{41,48,49} (**Figure 4 A**).
- Les cellules NKT2 ou Th2 iNKT : elles sont considérées comme anti-inflammatoires. Elles produisent majoritairement de l'IL-4, de l'IL-13 et d'IL-10^{41,48,49}. Toutefois, elles sont également capables de produire de l'IFN- γ dans certaines circonstances⁴¹. Elles possèdent également quelques propriétés régulatrices, telles que la régulation de macrophages, la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10^{41,48,49} (**Figure 4 B**).
- Les cellules NKT17 ou Th17 iNKT : elles produisent de l'interleukine (IL)-17A, IL-21 et IL-22^{41,48,49}. Les cellules NKT17 sont importantes dans la réponse aux pathogènes extracellulaires, aux maladies auto-immunes et allergiques⁵⁰ (**Figure 4 C**).

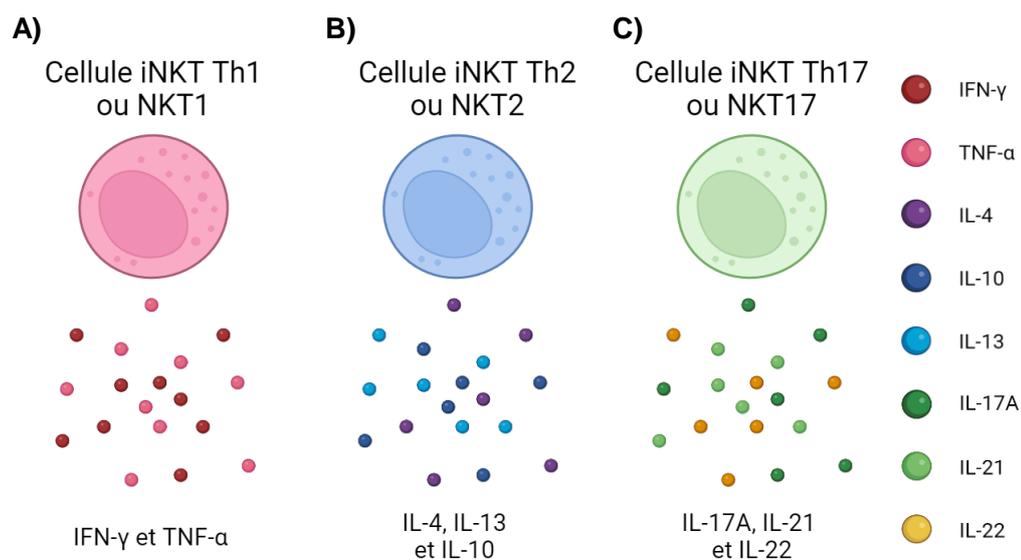


Figure 4 : Représentation des trois sous-populations de cellules iNKT avec les cytokines majoritairement sécrétées par chaque groupe. **A)** Cellules iNKT Th1 ou NKT1. **B)** Cellules iNKT Th2 ou NKT2. **C)** Cellule iNKT Th17 ou NKT17. Figure réalisée via BioRender.com.

1.3.3 Modes d'activation des cellules iNKT

Les cellules iNKT peuvent être stimulées par quatre modes d'activation^{41,48,51}.

1. Les cellules iNKT peuvent être activées par une stimulation unique via leur TCR. Pour ce faire l'interaction du TCR avec l'antigène doit être de forte affinité^{41,48,51}. C'est par exemple le cas lors de la présentation de l' α -GalCer via le CD1d^{41,51} (**Figure 5 A**).
2. Lorsque le signal d'activation via le TCR n'est pas suffisant pour activer les cellules iNKT^{41,48,51} (ex : l'antigène présenté est de faible affinité). Un deuxième signal comme des cytokines (ex : de l'IL-12 ou de l'IL-18) est nécessaire pour stimuler les cellules iNKT^{41,48,51} (**Figure 5 B**).
3. Dans certaines circonstances, les cellules iNKT peuvent être activées exclusivement par un signal venant des cytokines^{41,48,51}. Pour cela, il est essentiel que la quantité de cytokines soit importante et que les récepteurs de ces cytokines soient assez présents sur les cellules iNKT^{41,51}. Parmi les cytokines capables de stimuler les cellules iNKT, on retrouve l'association d'IL-12 et d'IL-18^{41,48,51,52} (**Figure 5 C**).
4. Finalement, les cellules iNKT peuvent être activées via le récepteur NKG2D⁴¹. Ce type d'activation permet l'activation du rôle cytolytique des cellules iNKT⁴¹ (**Figure 5 D**).

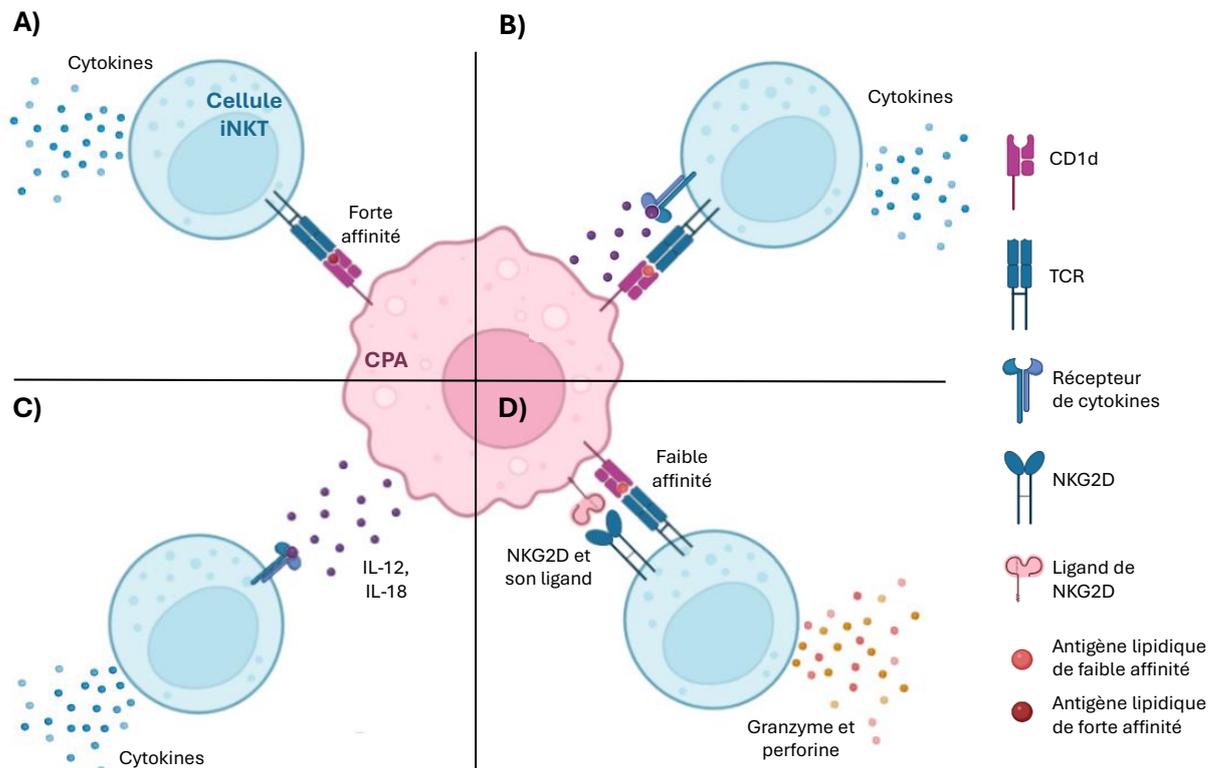


Figure 5 : Les quatre modes d'activation des cellules iNKT. Activation via **A**) une forte interaction entre le TCR et le CD1d présentant un antigène lipidique de forte affinité. **B**) Une faible interaction entre le TCR et le CD1d présentant un antigène lipidique de faible intensité couplé à la présence de cytokines. **C**) Une forte concentration en cytokines (ex. IL-12 et IL-18). **D**) Les récepteurs NK des cellules iNKT souvent couplés à une faible interaction entre le TCR et le CD1d présentant un antigène lipidique de faible intensité. Figure adaptée de Wilkin et al., et réalisée via BioRender.com.

1.3.4 Les rôles des cellules iNKT

Les cellules iNKT possèdent une place particulière dans l'immunité. En effet, en plus d'appartenir à l'immunité adaptative et innée, les cellules iNKT possèdent aussi la double casquette de pouvoir induire une réponse pro- ou anti-inflammatoire^{41,43}. La manière dont les cellules iNKT choisissent la réponse adaptée dépend entre autres du mode d'activation, de la force de l'activation, de l'environnement dans lequel elles se trouvent^{41,43}. Un autre facteur important est le type de cellules iNKT qui est activé⁵¹. Effectivement, des cellules NKT1 induiront plutôt une réponse pro-inflammatoire tandis que les cellules NKT2 induiront plutôt une réponse anti-inflammatoire^{41,48,49,51}.

La diminution du nombre de cellules iNKT dans le sang est corrélée avec une augmentation de différentes maladies auto-immunes⁴⁸ et même avec certains types de cancer⁵³. Ce constat met en lumière le fait que les cellules iNKT sont essentielles dans leur rôle d'immunomodulateur.

Au regard de ces multiples paramètres, il est aisé de deviner que les cellules iNKT possèdent de nombreux rôles dans l'immunité.

1.3.4.1 Réponse aux pathogènes

Premièrement, les cellules iNKT ont un rôle protecteur lors d'infections, notamment lors d'infections bactériennes, virales ou fongiques⁵⁴. Par exemple, lors d'une infection respiratoire telle que *Mycobacterium tuberculosis*⁵⁵, les cellules iNKT sont activées via des macrophages infectés⁵⁵. Ainsi les cellules iNKT vont induire la mort de ceux-ci par la libération de granzymes⁵⁶. De plus, elles vont recruter des cellules immunes, comme des neutrophiles, sur le site de l'infection⁴⁸ ou encore induire la maturation des cellules dendritiques⁴⁸.

1.3.4.2 Immuno-surveillance de tumeurs

Les cellules iNKT protègent l'organisme des cellules cancéreuses par différentes méthodes⁵³. Premièrement, les iNKT peuvent tuer directement les cellules tumorales via leur action cytolytique⁵³. Ainsi, lorsque les cellules iNKT reconnaissent certains types d'antigènes lipidiques présentés par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) cancéreuse, les cellules iNKT peuvent sécréter des granzymes et de la perforine afin d'éliminer les cellules cancéreuses responsables de leur activation⁵³. Deuxièmement, elles sont capables d'activer et de recruter d'autres cellules immunes, comme les cellules NK, grâce aux cytokines pro-inflammatoires⁵³. Finalement, elles sont aptes à réguler les cellules immunosuppressives (ex : macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes-T régulateurs) dans les tumeurs et leur environnement⁵³. Les cellules iNKT sont d'ailleurs très étudiées dans le contexte du cancer grâce aux nombreuses possibilités de thérapies anti-cancéreuses qui les visent⁵³.

1.3.4.3 Auto-immunité

Les cellules iNKT sont des cellules immunorégulatrices et leur déplétion est liée à de nombreuses maladies auto-immunes : diabète de type I, sclérose en plaque, polyarthrite rhumatoïde⁵⁴. Le fait que les cellules iNKT soient présentes en nombre plus faible chez les patients malades suggère qu'elles sont impliquées dans la protection contre ces maladies. C'est par exemple le cas dans le lupus⁵⁴ ; maladie auto-immune chronique qui se manifeste notamment au niveau des articulations⁵⁷. Les cellules iNKT ont un rôle protecteur dans la maladie et son amélioration est liée à la production de cytokines anti-inflammatoire comme l'IL-4⁵⁴. En général, les cellules iNKT sont capables de protéger l'organisme contre les maladies auto-immunes de deux façons : grâce à la production de cytokines Th2 et par l'activation d'autres cellules immunes⁵⁴.

1.3.5 Le CD1d

Les cellules iNKT reconnaissent essentiellement les antigènes lipidiques présentés par le CD1d^{41,42}. Le CD1d est un sous-groupe de récepteur de la famille des CD1 qui sont des analogues du CMH de type I⁴⁷. Deux groupes principaux de CD1 ont été mis en évidence chez l'homme : le groupe 1 qui comprend les CD1a, CD1b et CD1c et le groupe 2 qui comprend les CD1d⁴⁷. Il existe également les CD1e qui représentent un groupe intermédiaire aussi considéré comme le groupe 3^{44,47}. Chez les souris, seul le CD1d est exprimé⁴⁷.

Une molécule de CD1d est constituée de deux hélices α : $\alpha 1$ et $\alpha 2$ ^{47,58}. Ces hélices α s'associent de manière non-covalente à une molécule de β -2-microglobuline, ce qui stabilise le complexe et forme un hétérodimère⁵⁸. Les molécules de CD1d, comme le CMH de type I, sont synthétisées et maturées dans le lumen du RE^{47,58}.

Le groupe 2 de CD1 a pour rôle de présenter des antigènes lipidiques aux cellules NKT^{44,47}. Le CD1d est capable de présenter des antigènes lipidiques parce qu'il possède un sillon hydrophobe qui convient aux antigènes lipidiques mais pas aux peptides^{44,47}. Par ailleurs, le CD1d est à même de présenter à la fois des antigènes lipidiques exogènes et endogènes^{47,59}.

Les CD1d sont exprimés par les CPAs, comme les macrophages et les monocytes^{58,60}. Le CD1d se retrouve cependant également sur diverses cellules comme les adipocytes et les hépatocytes^{58,61}. Les CD1d se répartissent différemment sur la membrane en fonction des antigènes qu'ils portent^{58,60}. Quand l'antigène est de type Th1, soit pro-inflammatoire, les CD1d sont surtout localisés au niveau de radeaux lipidiques alors que si les antigènes sont de type Th2 ou anti-inflammatoire, les CD1d sont répartis de manière plus homogène⁵⁸. Étant donné que le CD1d est capable de présenter un large spectre d'antigènes lipidiques aux cellules iNKT, les cytokines qui seront sécrétées par les cellules iNKT suite à cette activation dépendront du type d'antigènes

lipidiques présenté^{41,43}. De plus, la réponse des cellules iNKT va également dépendre de l'environnement dans lequel l'activation a lieu^{41,43}.

1.3.5.1 Présentation des antigènes lipidiques sur le CD1d

Le chargement des lipides sur le CD1d est un phénomène dynamique. Il existe un nombre important de méthodes de chargement des antigènes lipidiques sur le CD1d^{47,59}. Le chargement des antigènes lipidiques sur les molécules de CD1d dépend en partie de la nature de l'antigène lipidique, c'est-à-dire endogène ou exogène^{47,59}.

Pour les antigènes endogènes, tout débute au sein du RE où sont produites et assemblées les molécules de CD1d^{47,58,59} (**Figure 6**). Au sein du RE, les chaînes de CD1d repliées se lient à la β -2-microglobuline afin de stabiliser le complexe^{47,58,59}. L'hétéromère de CD1d continue son chemin dans l'appareil de Golgi où les antigènes lipidiques endogènes peuvent être chargés à l'aide de la protéine de transfert de triglycéride microsomal (MTP)-B^{47,58,59}. Ensuite, les molécules de CD1d couplées à leur antigène lipidique endogène sont transférées à la membrane plasmique^{47,58,59} (**Figure 6**).

Par contre, les antigènes lipidiques exogènes et endogènes peuvent être chargés sur les molécules de CD1d lors du recyclage de celui-ci^{47,58,59} (**Figure 6**). Pour ce faire, le CD1d est endocyté, grâce aux protéines adipocytes (AP) 2 et 3 et à la clathrine^{47,58,59}. La molécule du CD1d est ensuite dirigée vers l'endosome qui fusionne avec un lysosome^{47,58,59}. Au sein de ce lysosome se trouve des glycolipides exogènes et endogènes qui pourront à leur tour être chargés sur le CD1d grâce à la saponine B^{47,58,59}. Après cette étape, les récepteurs membranaires sont de nouveau acheminés vers la membrane plasmique où ils pourront activer des cellules iNKT à proximité^{47,58,59} (**Figure 6**).

1.3.6 Interactions entre les cellules iNKT et les macrophages

Une des particularités des cellules iNKT est leur capacité à entretenir des interactions avec une multitude de cellules immunes^{48,62}. La relation qui a été étudiée durant ce mémoire est celle entretenue avec les macrophages.

Les macrophages sont capables de présenter des antigènes lipidiques à leur surface via le CD1d qui sont reconnus par des cellules iNKT^{58,60}. Une fois ces dernières activées, elles sont aptes à sécréter différentes cytokines, comme de l'IFN- γ , de l'IL-4 et de l'IL-10⁴¹. Les cytokines pro-inflammatoires produites sont à leur tour capables d'influencer la polarisation des macrophages présents dans le milieu pour qu'ils adoptent un profil pro-inflammatoire⁶². Tandis que l'IL-10 produit par les cellules iNKT aura tendance à polariser les macrophages vers un profil anti-inflammatoire⁶².

À l'inverse, les macrophages sécrètent aussi des cytokines susceptibles d'activer les cellules iNKT⁶². Parmi les cytokines sécrétées, on retrouve l'IL-18 et l'IL-12 qui sont susceptibles d'accentuer l'activation des cellules iNKT⁶³.

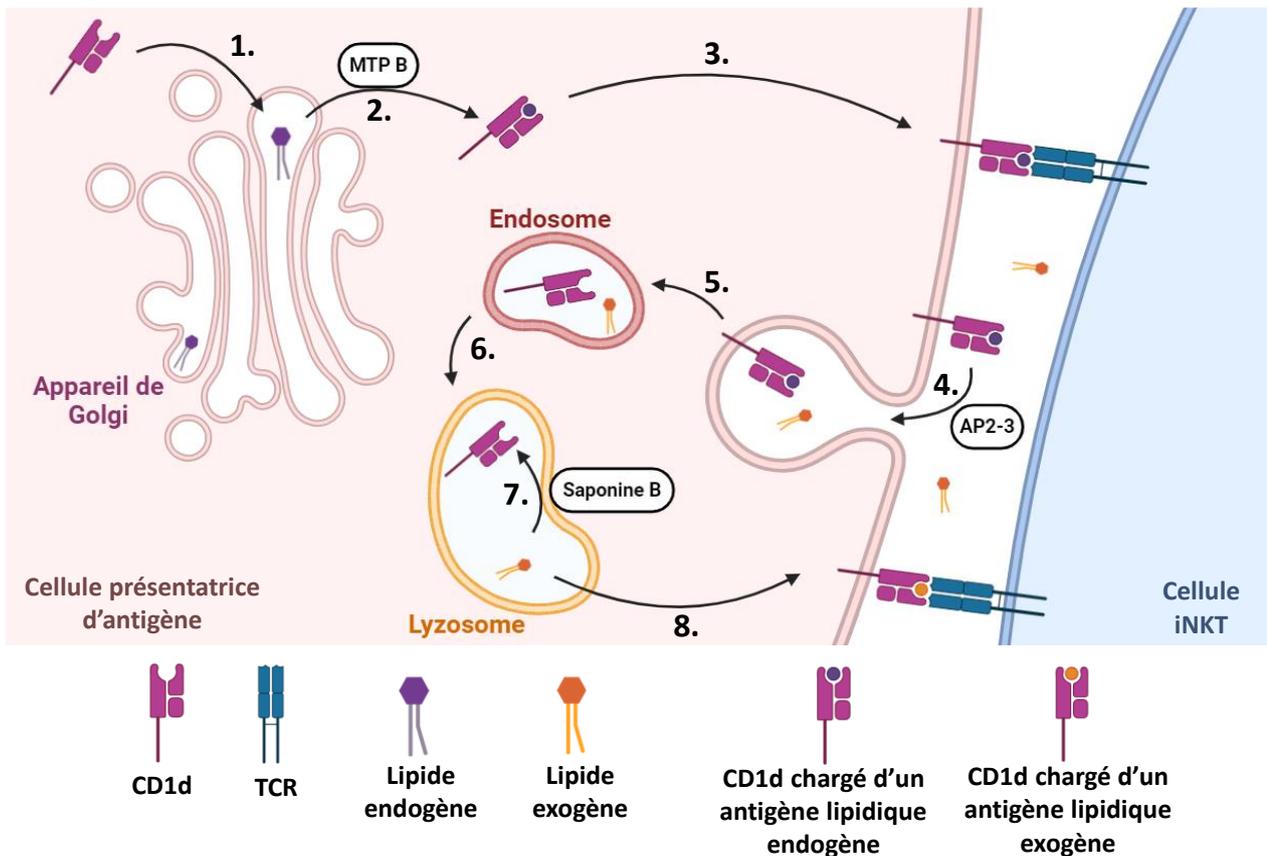


Figure 6 : Mécanisme de chargement des antigènes lipidiques endogènes et exogènes sur le CD1d. 1. Le CD1d pénètre dans l'appareil de Golgi. 2. La MTP B charge l'antigène lipidique endogène sur le CD1d. 3. Le CD1d est ensuite acheminé vers la membrane plasmique. 4. Le CD1d est endocyté afin d'être recyclé avec l'aide d'AP2 et 3 et de clathrine. 5. Le CD1d passe dans l'endosome 6. L'endosome devient un lysosome 7. L'antigène lipidique exogène est chargé sur le CD1d avec l'aide de la saponine B. 8. Le CD1d est acheminé à la membrane pour être reconnu par une cellule iNKT par exemple. AP : protéine adipocyte. MTP : Protéine de transfert de triglycéride microsomal. Figure adaptée de Morris et al. (2023) et réalisée via BioRender.com

1.4 LES CELLULES iNKT ET LEUR LIEN AVEC L'OBÉSITÉ

Il a été démontré par plusieurs équipes^{58,64,65} que l'obésité induit une diminution du nombre de cellules iNKT dans le sang périphérique des personnes obèses. Plusieurs laboratoires dont celui d'immunométabolisme et nutrition se sont intéressés à cette modulation induite par l'obésité et ont observé un profil d'activation plus important des cellules iNKT périphériques^{66,67} (Wilkin et al., manuscrit en préparation) pouvant induire leur apoptose. En effet, lorsqu'on s'intéresse au profil d'activation des cellules iNKT chez des patients obèses, on remarque une activation accrue démontrée par une hausse de l'expression des marqueurs CD25 et CD69^{66,67} (Wilkin et al., manuscrit en préparation).

De façon surprenante, la diminution des cellules iNKT dans le sang ne semble pas particulièrement liée à une augmentation de l'IMC. Différentes études ont d'ailleurs mis en avant des résultats contradictoires quant à un lien entre la hausse de l'IMC et une diminution du nombre de cellules iNKT⁶⁶⁻⁶⁸. En réalité, la déplétion des cellules iNKT serait plutôt liée à une augmentation de l'adiposité viscérale^{41,65}.

1.4.1 Les cellules iNKT dans les tissus adipeux obèses

Bien que les tissus adipeux soient majoritairement connus pour leur capacité à stocker les lipides et à servir de réserve d'énergie, leur rôle endocrinien n'est pas à négliger⁶⁹. En effet, le tissu adipeux est responsable de la sécrétion de nombreuses adipokines régulant notamment la satiété, le stockage de lipides et la régulation du glucose⁶⁹. C'est également le lieu de résidence de différentes cellules immunes dont les cellules iNKT⁶⁹. L'obésité induit un changement de phénotype du tissu adipeux. Comme mentionné précédemment, les conséquences de l'obésité sont diverses : hypertrophie et hyperplasie des adipocytes, infiltration des macrophages dans les tissus adipeux, augmentation des macrophages ayant un profil pro-inflammatoire, modulation de la sécrétion d'adipokines et dyslipidémie¹⁷⁻¹⁹.

Parallèlement à ce qui est observé dans le sang, les cellules iNKT sont également impactées par l'obésité au niveau des tissus adipeux⁶⁹. Elles y sont également déplétées^{58,64,65,69}. Cette diminution est corrélée à une augmentation de la masse grasseuse⁶⁵ et à l'augmentation de l'infiltration de macrophages dans les tissus adipeux⁶⁵. Bien que ces phénomènes soient liés, la raison de la diminution du nombre d'iNKT n'a pas encore été déterminée. Comme les cellules iNKT interagissent avec un grand nombre d'autres cellules immunes, leur déplétion peut avoir un impact significatif sur la régulation des cellules immunes dans les tissus adipeux⁴¹.

Chez un individu sain, les cellules iNKT des tissus adipeux sont tout à fait particulières⁶⁹. Premièrement, elles ont une production de cytokines différentes de leurs égales dans le sang et dans d'autres tissus⁶⁹. Elles produisent en effet davantage de cytokines anti-inflammatoires (IL-4) que pro-inflammatoires (IFN- γ)⁶⁹. Elles sont également de grandes productrices IL-10 suite à leur activation⁶⁹. Il a aussi été démontré que les cellules iNKT des tissus adipeux ont un rôle protecteur contre l'obésité et l'inflammation qui s'en suit^{64,69}. En effet, il a été prouvé que lorsque des cellules iNKT sont injectées dans les tissus adipeux de souris obèses celles-ci perdent du poids et retrouvent un métabolisme normal du glucose⁶⁴. Ces améliorations ont également été observées lorsque les cellules iNKT sont activées indirectement par l'injection d' α -GalCer⁶⁴. Cependant, ces résultats sont controversés car une augmentation de cytokines pro-inflammatoires a aussi été constatée^{64,69}.

Étant donné que chez les personnes obèses ces cellules sont moins présentes, une plus faible quantité de cytokines anti-inflammatoires est produite⁶⁹. Comme l'obésité induit également un environnement pro-inflammatoire dans les tissus adipeux, les cellules régulatrices qui sont les cellules iNKT ne sont plus en mesure de permettre l'homéostasie du tissu⁶⁹.

2 OBJECTIFS

Ce mémoire s'est inscrit dans la continuité des études réalisées dans le laboratoire du Dr. Legrand et de la thèse de Chloé Wilkin sur les cellules iNKT. Le principal objectif de ce mémoire a été d'investiguer plus en détails les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent l'activation des cellules iNKT dans l'obésité.

Il a été démontré que les monocytes pro-inflammatoires des personnes obèses présentent davantage de molécules CD1d que leur équivalent des personnes saines (Wilkin *et al.*, manuscrit en préparation). Le laboratoire a donc émis l'hypothèse que la perte d'activité et la mort par apoptose des cellules iNKT observées chez le patient obèse seraient dues à une activation chronique des cellules iNKT (Wilkin *et al.*, manuscrit en préparation). Cette hypothèse est également issue du fait que chez les personnes obèses, un profil lipidique particulier est observé dans le sang, appelé dyslipidémie. Il est donc raisonnable de penser que l'augmentation de lipides dans le sang et de CD1d sur les CPAs puisse conduire à une plus grande exposition d'antigènes lipidiques et par conséquent, à l'activation chronique des iNKT. En sachant que les acides gras saturés sont accrus chez les personnes obèses, il peut être imaginé un lien entre l'augmentation de lipides dans le sang et l'augmentation de l'activation ainsi que de l'apoptose des cellules iNKT chez les personnes obèses. Il a également déjà été proposé qu'une augmentation des acides gras dans l'environnement des CPAs aurait un effet sur la présentation des antigènes lipidiques via le CD1d mais rien n'a encore été prouvé⁵⁸. Des expériences préliminaires réalisées dans le laboratoire d'immunométabolisme et nutrition ont déjà démontré que les macrophages THP1-CD1d traités avec des acides gras saturés, contrairement aux insaturés, étaient capables d'induire l'activation indirecte des cellules iNKT suite à une coculture.

La première étape de ce travail a été de confirmer que les acides gras saturés induisent effectivement une activation indirecte des cellules iNKT. Pour ce faire, des cellules THP1-CD1d différenciées en macrophages ont été traitées avec des acides gras et ont ensuite été mises en culture avec des cellules iNKT. Pour quantifier l'effet des traitements sur l'activation des cellules iNKT, deux méthodes ont été choisies : la cytométrie en flux et le dosage d'une cytokine pro-inflammatoire (IFN- γ).

Un autre objectif de ce mémoire a été de vérifier que l'activation indirecte des cellules iNKT est dépendante du CD1d. Pour ce faire, 1) la mise en évidence de l'internalisation du TCR des cellules iNKT et 2) la possibilité que l'induction des cellules iNKT soit totalement ou en partie due à la présence de facteurs solubles produits par les THP1-CD1d dans le milieu, comme de l'IL-12 ou de

IL18, a été investiguée. Ensuite, un troisième axe a été choisi : 3) l'utilisation d'anticorps bloquant du CD1d afin d'analyser leur impact sur la stimulation indirecte des cellules iNKT.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux voies de l'activation indirecte des cellules iNKT. En effet, il a été montré par deux équipes en parallèle que des CPAs pré-traitées avec les deux inducteurs classiques du stress du RE (thapsigargine et tunicamycine) et cultivées avec des cellules iNKT étaient capables d'induire leur activation par un mécanisme dépendant du CD1d. Ils ont démontré que l'activation indirecte des cellules iNKT implique les voies PERK et IRE1 de l'UPR au sein de macrophages^{70,71}. Or, il a été précédemment démontré par le laboratoire d'immunométabolisme et nutrition que les acides gras saturés, en particulier le C18:0 et le C16:0, sont des inducteurs non-classiques du stress du RE dans les macrophages primaires dérivés de monocytes^{40,72} ou dans les cellules THP1 différenciées en macrophages avec du PMA^{72,73}. Ainsi, l'objectif de ce mémoire a été de déterminer si un inducteur non classique du stress du RE, à savoir l'acide gras C18:0 est capable d'activer de manière indirecte les cellules iNKT. L'accent a été mis sur l'étude des voies PERK et IRE1 via l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de protéines impliquées dans ces deux voies. Ce choix a été posé car ce sont les deux voies précédemment mises en évidence par Govindarajan *et al.*⁷⁰ et Bedard *et al.*⁷¹.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 TAMPONS ET SOLUTIONS

Dans cette section est détaillée la composition de l'ensemble des tampons et solutions qui ont été utilisés durant le mémoire.

Milieu complet ou RPMI : « *Roswell Park Memorial Institute medium* » 1640 (BioWest, France) complémenté de 10 % de « *Fetal Bovine serum* » (FBS) (Gibco™, MA USA) et 100 U/mL de Streptomycine-pénicilline (BioWest, France).

Milieu iNKT : « *Roswell Park Memorial Institute medium* » 1640 (BioWest, France) complémenté de 10 % de FBS (Gibco™, MA USA), de 100 U/mL Streptomycine-pénicilline (BioWest, France), de 25 mM d'HEPES (acide sulfonique N-2-hydroxyéthylpiperazine-N-2-éthane)(Capricorn Scientific, Allemagne), 1/50 d'acides aminés essentiels (Gibco™, MA USA) et 1/100 d'acides aminés non-essentiels (Gibco™, MA USA), de 1 mM de pyruvate de sodium (BioWest, France), de 50 µM de 2-mercaptoéthanol (Gibco™, MA USA) et de 2,5 µg/mL d'amphotéricin B-fungizone (Gibco™, MA USA). Le milieu iNKT se conserve 1 mois à 4 °C. Avant utilisation, entre 250 et 10 U/mL d'rhIL-2 (PeproTech®, NJ USA) sont ajoutés au milieu. Le milieu contenant l'rhIL-2 n'est conservé que maximum 2 semaines à 4 °C.

Solution d'α-GalCer : L'α-GalCer lyophilisé (Avanti® Polar Lipids, AL USA) a été re-solubilisé à 1mg/mL dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Carl Roth, Allemagne). Après avoir chauffé la solution à 80 °C, elle a été soniquée pendant 10 minutes. Les aliquotes de cette solution stock ont été conservés à -20 °C. Lors de traitement à l'α-GalCer, l'aliquote est décongelé puis vortexé pendant 1 minute avant d'être chauffé à 80 °C et vortexé de nouveau. Il est ensuite dilué à une concentration de 20000 ng/mL. La solution est une nouvelle fois vortexée pendant 1 minute, puis chauffée à 80 °C pendant 2 minutes avant d'être vortexée pendant 1 minute supplémentaire.

Solutions d'acides gras : Les acides gras libres ne sont pas solubles dans le sang. Pour être transportés, il faut qu'ils soient liés à un véhicule comme l'albumine. Les solutions d'acides gras utilisées dans ce mémoire ont été solubilisées dans du milieu « *Roswell Park Memorial Institute medium* » 1640 contenant 5 % d'albumine sanguine de bovin (BSA, vwr™, PA USA). La solution BSA 5 % à pH 7 a été chauffée 1 heure à 37 °C pour favoriser sa solubilisation. L'acide gras utilisé (C18:0, Sigma-Aldrich, MA USA) a été dissout à 0,1 M dans du NaOH (0,1 M) (Carl Roth, Allemagne) avant d'être chauffé 1 heure à sa température de fusion soit à 75 °C. Après cette étape, les acides gras sont dilués dans la solution de BSA 5 % à une concentration de 2,5 mM. Finalement, les solutions ont été chauffées 10 minutes à 55 °C pour que la liaison entre les acides gras et l'albumine puisse

avoir lieu. Les solutions ont alors été filtrées et stockées à -20 °C jusqu'à leur utilisation. Avant emploi, les solutions d'acides gras et de BSA doivent être chauffées 10 minutes à 65 °C.

Tampon FACS : Solution constituée de « *Phosphate-Buffered Saline* » (PBS, BioWest, France) avec 3 % de FBS (Gibco™, MA USA).

Wash ELISA : Solution constituée de PBS (BioWest, France) avec 0,05 % de Tween-20 (Fisher bioreagents, KS USA).

Solution Stop ELISA : Solution constituée d'acide sulfurique (H₂SO₄, Carl Roth, Allemagne) à 1 M.

Tampon de lyse : Le tampon de lyse, utilisé pour récupérer les protéines des THP1-CD1d en vue d'effectuer un WB, est composé de : 50 mM de Tris-HCl (vwr™, PA USA), 150 mM de NaCl (vwr™, PA USA), 5 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, vwr™, PA USA), 1 % d'octylphénolpolyéthoxyéthanol (IGEPAL, Sigma-Aldrich, MA USA), 0,5 % de désoxycholate de sodium (Carl Roth, Allemagne) et 0,1 % de dodécylsulfate de sodium (SDS, Carl Roth, Allemagne). Le tampon a ensuite été complété avec différents inhibiteurs de protéases, à savoir du fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF, Carl Roth, Allemagne) et du complete (Roche, Suisse), et d'inhibiteur de phosphatases : orthovanadate de sodium (Na₃VO₄, Fisher bioreagents, KS USA), β-glycérophosphate (β-gly, Carl Roth, Allemagne) et NitroPhénylPhosphate (NPP, Sigma-Aldrich, MA USA).

Gel de concentration 4 % western blot : Les gels de concentration sont composés de 25 % d'acrylamide/bisacrylamide (37,5:1, Carl Roth, Allemagne) à 40 % (correspond à 10 % au total), 25 % de tris (Fisher bioreagents, KS USA) 1,5 M à pH 8,8, 1 % de SDS (Carl Roth, Allemagne) 10 %, 0,75 % de persulfate d'ammonium (APS, Carl Roth, Allemagne) 10 % et 0,0375 % de Temed (Fisher bioreagents, KS USA).

Gel de séparation 10 % western blot : Les gels de séparation sont composés de 10 % d'acrylamide/bisacrylamide (37,5 :1, Carl Roth, Allemagne) à 40 % (correspond à 4 % au total), 25 % de tris (Fisher bioreagents, KS USA) 0,5 M à pH 6,8, 1 % de SDS (Carl Roth, Allemagne) 10 %, 1 % d'APS (Carl Roth, Allemagne) 10 % et 0,1 % de Temed (Fisher bioreagents, KS USA).

Tampon de chargement 4X (TR 4X) : Le tampon de chargement est composé de 125 mM de tris-HCl (vwr™, PA USA) à pH 6,8, 20 % de glycérol (Fisher bioreagents, KS USA), 4 % de SDS (Carl Roth, Allemagne), 6 % de β-mercaptoéthanol (Carl Roth, Allemagne) et de bleu de bromophénol (Carl Roth, Allemagne).

Tampon de migration : Tampon constitué de 0,1 % de SDS (Carl Roth, Allemagne), 0,6 % de Tris (Fisher bioagents, KS USA) et 1,44 % de Glycine (Carl Roth, Allemagne). Ce tampon est utilisé lors de la migration des protéines sur gel de polyacrylamide lors des WB.

Tampon de transfert : Tampon composé de 16 % de méthanol (Fisher bioagents, KS USA), 1,44 % de glycine (Carl Roth, Allemagne), 0,303 % de Tris (Fisher bioagents, KS USA) et 0,01 % de SDS (Carl Roth, Allemagne). Cette solution est employée lors du transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF, Cytiva, MA USA).

TBS-Tween : Cette solution est réalisée avec 0,244 % de tris (Fisher bioagents, KS USA), 0,8 % de NaCl (vwr™, PA USA) et 0,1 % de Tween-20 (Fisher bioagents, KS USA). La solution est mise à un pH de 7,4. Cette solution sert à laver les membranes entre les incubations d'anticorps et avant la révélation, mais est également la base de la solution de lait utilisée lors de la saturation et lors de la dilution des anticorps.

Solution de révélation : Solution d'électrochimiluminescence composée de luminol (Carl Roth, Allemagne), d'acide coumarique (Fisher bioagents, KS USA) et de peroxyde d'hydrogène (Fisher bioagents, KS USA).

Détergent MTT : Solution de 0,1 M d'HCl (Carl Roth, Allemagne) supplémentée de 10 % de SDS (Carl Roth, Allemagne).

3.2 LIGNÉES CELLULAIRES

Ce mémoire se base sur de la coculture entre deux types cellulaires. Les cellules THP1-CD1d sont dérivées de cellules THP1 qui sont des monocytes humains cancéreux issus d'un patient atteint d'une leucémie⁷⁴. Ces cellules se différencient en macrophages grâce à du Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Les cellules THP1-CD1d ont été modifiées afin de sur-exprimer le récepteur CD1d, amplifiant ainsi leur capacité à présenter des antigènes lipidiques. Le deuxième type cellulaire cultivé est des cellules iNKT. Ce sont des lymphocytes T non-conventionnels précédemment isolés à partir de poches de sang par Chloé Wilkin. Les cellules isolées ont ensuite été congelées et stockées dans l'azote liquide. Durant ce travail, les cellules iNKT issues d'un seul donneur ont été étudiées, le donneur N°13.

3.3 CULTURE CELLULAIRE

3.3.1 Décongélation et culture cellulaire

Les deux types cellulaires cultivés pendant ce travail sont issus d'ampoules congelées et stockées dans de l'azote liquide. Afin de pouvoir utiliser ces cellules, elles doivent être

décongelées. Les ampoules sont d'abord sorties du tank à azote et subissent une décongélation rapide à l'aide d'un bain-marie à 37 °C.

Directement après décongélation, les cellules THP1-CD1d sont directement transférées dans 20 mL de milieu complet chaud (37 °C). Après 24 heures, 10 mL de ce milieu est éliminé et renouvelé. Une fois cette étape exécutée, les cellules THP1-CD1d sont maintenues à une concentration entre 0,5 million et 1 million de cellules par mL dans du milieu complet. Le milieu est renouvelé tous les 2-3 jours. Ces cellules sont utilisées maximum 2 mois après la décongélation.

Directement après décongélation, les cellules iNKT sont lavées deux fois à l'aide de PBS chaud (37 °C) puis centrifugées pendant 5 minutes à 500 g à température ambiante (TA). Le PBS est éliminé avant de re-suspendre les cellules iNKT dans du PBS chaud (37 °C). Après lavage, les cellules iNKT sont re-suspendues à une concentration de 1 million par mL dans du milieu iNKT supplémenté de 250 IU de rhIL-2 et de 10 % de FBS. Les cellules sont ensuiteensemencées à une concentration de 1×10^6 cellules/mL dans une plaque 96 puits à fond rond.

3.3.2 Mise au repos des cellules iNKT

Le « *resting* » des cellules iNKT est la méthode grâce à laquelle les cellules iNKT sont mises au repos suite à leur décongélation. Tous les 2-3 jours, 150 µL de milieu sont enlevés de chaque puit et remplacés par 150 à 200 µL de milieu iNKT supplémentés avec des concentrations décroissantes en rhIL-2. Ainsi, lors du premier changement, est ajouté du milieu à 100 U/mL, puis 50 U/mL, puis 20 U/mL et finalement 10 U/mL de rhIL-2 (*Tableau 1*). 24 à 48 heures après le dernier changement de milieu (milieu iNKT + 10 U/mL de rhIL-2), les cellules iNKT sont considérées comme au repos et prêtes pour la coculture avec les THP1-CD1d.

	Vendredi (Jour de la décongélation)	Lundi	Mercredi	Vendredi	Lundi	Mercredi (Jour de la coculture)
Milieu	Milieu iNKT + 250 U/mL de rhIL-2	Milieu iNKT + 100 U/mL de rhIL-2	Milieu iNKT + 50 U/mL de rhIL-2	Milieu iNKT + 20 U/mL de rhIL-2	Milieu iNKT + 10 U/mL de rhIL-2	Milieu iNKT + 10 U/mL de rhIL-2

Tableau 1 : Exemple de planning de « *resting* ».

3.4 DIFFÉRENCIATION THP-1-CD1D EN MACROPHAGES À L'AIDE DU PMA

Avant de co-cultiver les cellules THP1-CD1d avec les cellules iNKT, celles-ci doivent être différenciées en macrophages. Pour différencier les cellules THP1-CD1d, du PMA (Sigma-Aldrich, MA USA) a été utilisé. Les cellules THP1-CD1d sontensemencées à une concentration de $0,75 \times 10^6$ cellules/mL dans du milieu complet supplémenté avec du PMA (0,1 mg/mL). $1,5 \times 10^5$ de cellules sontensemencées par puit d'une plaque 96 puits. Des plaques 12 puits avec $1,5 \times 10^6$ cellules ont également étéensemencées pour la réalisation de western blot (WB). Après 24 heures, les puits

sont lavés avec du PBS et du milieu complet frais est ajouté pour permettre le relâchement des cellules. Après 16 heures de relâchement, les cellules THP1-CD1d sont considérées comme différenciées et prêtes à être utilisées.

3.5 TRAITEMENTS DES THP1-CD1D

Les traitements sont réalisés sur les THP1-CD1d différenciées. Pour ce faire, le milieu des puits est éliminé et les puits sont lavés une fois au PBS. Ensuite, du milieu complet supplémenté avec les différents traitements est ajouté (**Tableau 2**). Les cellules sont ainsi incubées à 37 °C et 5 % CO₂ pendant 8 heures. Pour les expériences utilisant des inhibiteurs, 1 heure de pré-traitement est réalisé à l'aide de l'inhibiteur (**Tableau 2**), puis les traitements sont ajoutés.

Lors des expériences nécessitant un anticorps bloquant du CD1d (BioLegend, CA USA), l'anticorps bloquant (20 µg/mL) ou son isotype contrôle (20 µg/mL, BioLegend, CA USA) est directement ajouté après l'étape de lavage et incubé pendant 1 heure avant d'effectuer la coculture.

Nom	Rôle	Firme	Concentration	Temps d'incubation
α-GalCer	Inducteur des cellules iNKT	Avanti-polars	100 ng/mL	8 h
DMSO	Contrôle de la thapsigargine et des inhibiteurs	Carl Roth	NA	NA
Thapsigargine	Inducteur du stress du RE	Sigma-Aldrich	50-100 nM	8 h
BSA	Contrôle des acides gras	Sigma-Aldrich	200 µM	8 h
C18:0	Inducteur du stress du RE	Sigma-Aldrich	200 µM	8 h
MKC-8866	Inhibiteur de IRE-1α	Bio-Connect	5-15 µM	1 h de pré-traitement et maintenu durant le traitement
GSK2606414	Inhibiteur de PERK	Sigma-Aldrich	0,25-1 µM	1 h de pré-traitement et maintenu durant le traitement
Trans-ISRIB	Inhibiteur de la voie PERK en agissant sur eIF2α	Sigma-Aldrich	0,05-1 µM	1 h de pré-traitement et maintenu durant le traitement
Isotype contrôle de l'anti-CD1d	Contrôle de l'anticorps bloquant anti-CD1d	BioLegend (clone QA16A13)	20 µg/mL	1 h post-traitement et maintenu lors de la coculture
Anticorps bloquant anti-CD1d	Anticorps bloquant l'interaction entre le TCR iNKT et le CD1d	Biolegend (clone 51.1)	20 µg/mL	1 h post-traitement et maintenu lors de la coculture

Tableau 2 : Traitements utilisés sur THP1-CD1d. NA : non applicable.

3.6 COCULTURE

La coculture entre les cellules iNKT mises au repos et les macrophages THP1-CD1d se réalise suite aux traitements des cellules THP1-CD1d différenciées. Les cellules iNKT mises au repos sont récoltées et centrifugées 5 minutes à 1200 rpm à TA. Elles sont ensuite re-suspendues à une concentration de $0,2 \times 10^6$ cellules/mL dans du milieu iNKT supplémenté avec 10 U/mL de rhIL-2. À la fin des traitements, les plaques de culture sont lavées trois fois au PBS. $0,5 \times 10^5$ cellules iNKT re-suspendues sont alors ajoutées par puit. Les cellules sont incubées 24 heures à 37 °C à 5 % CO₂. À la suite de l'incubation, le surnageant est récolté puis congelé afin de réaliser un « *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* » (ELISA). Les cellules sont également collectées pour effectuer une analyse par cytométrie en flux.

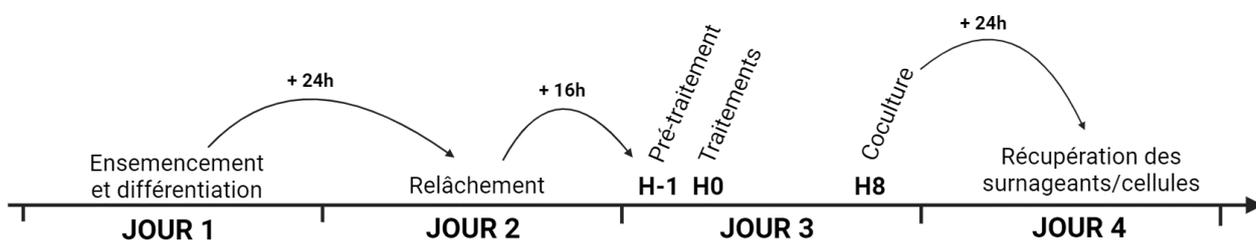


Figure 7 : Organisation des différentes étapes de traitements et la coculture sur une semaine. Figure réalisée via BioRender.com.

Une expérience dans laquelle les cellules iNKT ont été cultivées uniquement dans des surnageants de macrophages THP1-CD1d pré-traités a été exécutée. Cette expérience a une organisation particulière. En effet, à la fin des 8 heures de traitements, les cellules THP1-CD1d sont lavées 3 fois au PBS identiquement à ce qui a lieu en préparation à la coculture avec les cellules iNKT, la différence est que seul du milieu iNKT complémenté de 10 U/mL de rhIL-2 est ajouté sur les cellules THP1-CD1d pré-traitées. En parallèle, les cellules iNKT mises au repos et re-suspendues à une concentration de $0,2 \times 10^6$ cellules/mL dans du milieu iNKT supplémenté avec 10 U/mL de rhIL-2, sont placés dans des puits à fond rond d'une plaque 96 puits. Les deux types de cellules sont incubés indépendamment 24 heures à 37 °C à 5 % CO₂. À la suite de l'incubation, le surnageant des macrophages THP1-CD1d est récolté et centrifugé 5 minutes à 1200 rpm à TA. Le surnageant est ensuite déposé sur les cellules iNKT chez qui le milieu a été éliminé. Finalement, les cellules iNKT sont incubées 24 heures supplémentaires à 37 °C à 5 % CO₂. À la suite de l'incubation, le surnageant est récolté puis congelé afin de réaliser un ELISA (**Figure 8**).

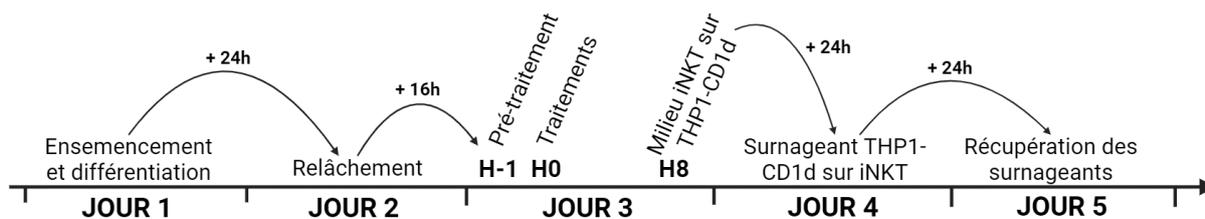


Figure 8 : Organisation des différentes étapes de traitements et de coculture sur une semaine dans le cas où les cellules iNKT ne sont cultivées que dans le surnageant des macrophages THP1-CD1d pré-traités.

3.7 ELISA

Un ELISA ou « *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* » est un test de dosage. Dans le cadre de ce mémoire, un seul type d'ELISA a été effectué pour doser l'IFN- γ , une cytokine présente dans les surnageants suite à la coculture entre les THP1-CD1d et les cellules iNKT. Le kit utilisé lors de ce mémoire est le kit « *Human IFN gamma Uncoated ELISA Kit* » (Invitrogen, MA USA). Le protocole du fournisseur a été suivi lors de l'utilisation du kit.

Un ELISA permet le dosage d'un analyte en particulier. L'échantillon à doser est placé dans un puits dans lequel l'anticorps de capture a préalablement été lié au fond. L'analyte présent dans l'échantillon se lie à l'anticorps de capture. Une fois l'analyte en complexe avec l'anticorps de capture, l'anticorps de détection, également capable de lier l'analyte, est ajouté à la solution. L'analyte est pris en « sandwich » entre l'anticorps de capture et l'anticorps de détection. À l'extrémité de l'anticorps de détection est fixé de la biotine. La biotine possède une affinité très importante pour la streptavidine. Ainsi, la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP) se lie à l'anticorps de détection. Finalement, du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) est ajouté. Ce composé est transparent mais suite à l'action du HRP, il prend une couleur bleue. Après 10-15 minutes, la réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. Le milieu prend alors une couleur jaune. La plaque ELISA est ensuite analysée au spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, Molecular Devices) aux longueurs d'onde 450 et 570 nm afin de déterminer la concentration en analyte grâce à une courbe standard (**Figure 9**).

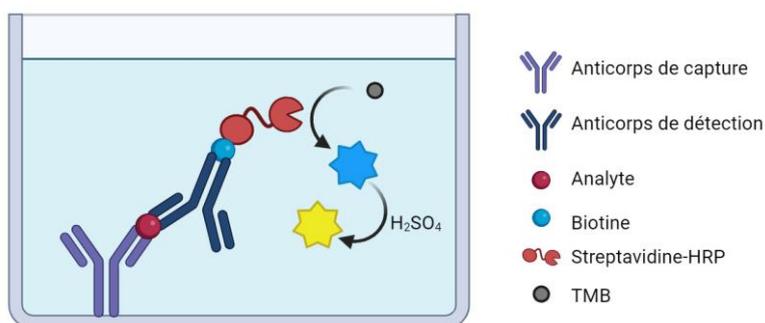


Figure 9 : Représentation du principe de l'ELISA en « sandwich ». Figure réalisée via Biorender.com

3.8 CYTOMÉTRIE EN FLUX

La cytométrie en flux a été utilisée pour étudier l'activation des cellules iNKT après coculture. La cytométrie en flux mesure différents paramètres sur chaque cellule de manière individuelle grâce à l'action de lasers. Les paramètres qui peuvent être étudiés sont divers : taille, complexité structurale et marquage fluorescent. L'émission et l'intensité de fluorescence sont mesurées et permettent d'obtenir des informations sur la quantité de marqueurs et l'influence des traitements sur ces mêmes marqueurs.

Lors de ce travail, des marqueurs de « *gating* », d'activation et d'apoptose ont été évalués. Un marqueur de viabilité (zombie NIR™ (BioLegend, CA USA)) a également été employé afin de ne sélectionner que les cellules vivantes.

Avant d'évaluer les marqueurs d'intérêt, il est important de sélectionner uniquement les cellules iNKT vivantes et les singulets. Pour ce faire, une stratégie de « *gating* » a été mise en place et est présentée à la **Figure 10**. Brièvement, les cellules sont d'abord choisies en fonction de leur taille, on ne considère par la suite que des cellules de petites tailles et peu complexes, on estime que ce sont des lymphocytes (**Figure 10 A**). Ensuite, les doublets (**Figure 10 B**) et les cellules mortes sont exclues (**Figure 10 C**). Les cellules iNKT sont sélectionnées grâce à l'expression de deux marqueurs : CD3 et Vα24Ja18 (**Figure 10 D**). Finalement, l'expression des marqueurs CD25 (activation tardive), CD69 (activation précoce) et CD95 (apoptose) a été évaluée.

Chaque anticorps testé est associé à un fluorochrome qui possède un spectre d'excitation et un spectre d'émission (**Tableau 3, Figure 11**). Les anticorps utilisés lors de ce mémoire sont détaillés dans le **Tableau 3**. Les mesures ont été réalisées sur CytoFlex (Beckman Coulter, CA USA).

3.8.1 Préparation des « *carrier cells* »

Les analyses de cytométrie en flux nécessitent un minimum de cellules pour être interprétables. Or le nombre de cellules iNKT récupérées suite à la coculture est faible. Afin de limiter la perte de cellules iNKT lors de la préparation des échantillons pour la cytométrie en flux, $0,5 \times 10^6$ de « *carrier cells* » sont ajoutées à chaque échantillon. Les « *carrier cells* » sont des THP1-CD1d mortes suite à un traitement à la chaleur (20 minutes à 60-65 °C).

3.8.2 Préparation des échantillons pour la cytométrie en flux

Après avoir récupéré les surnageants de la coculture, les cellules iNKT sont re-suspendues dans du PBS afin de pouvoir les récupérer à leur tour. Ensuite, les « *carrier cells* » sont ajoutées et une centrifugation de 5 minutes à 500 g et à 4 °C est réalisée. Le surnageant est éliminé et un premier marquage est effectué à l'aide du Zombie NIR™ qui est laissé en contact des cellules pendant 20 minutes à l'abri de la lumière à TA.

À la fin des 20 minutes d'incubation, un lavage est réalisé à l'aide du tampon FACS. Une fois le surnageant éliminé, les différents anticorps sont ajoutés à une quantité déterminée empiriquement par titration (**Tableau 3**). Les échantillons sont une nouvelle fois incubés pendant 20 minutes dans l'obscurité à 4 °C. Finalement, un dernier lavage au PBS est effectué et les cellules sont ensuite re-suspendues dans 100 µL de PBS avant d'être analysées par cytométrie en flux.

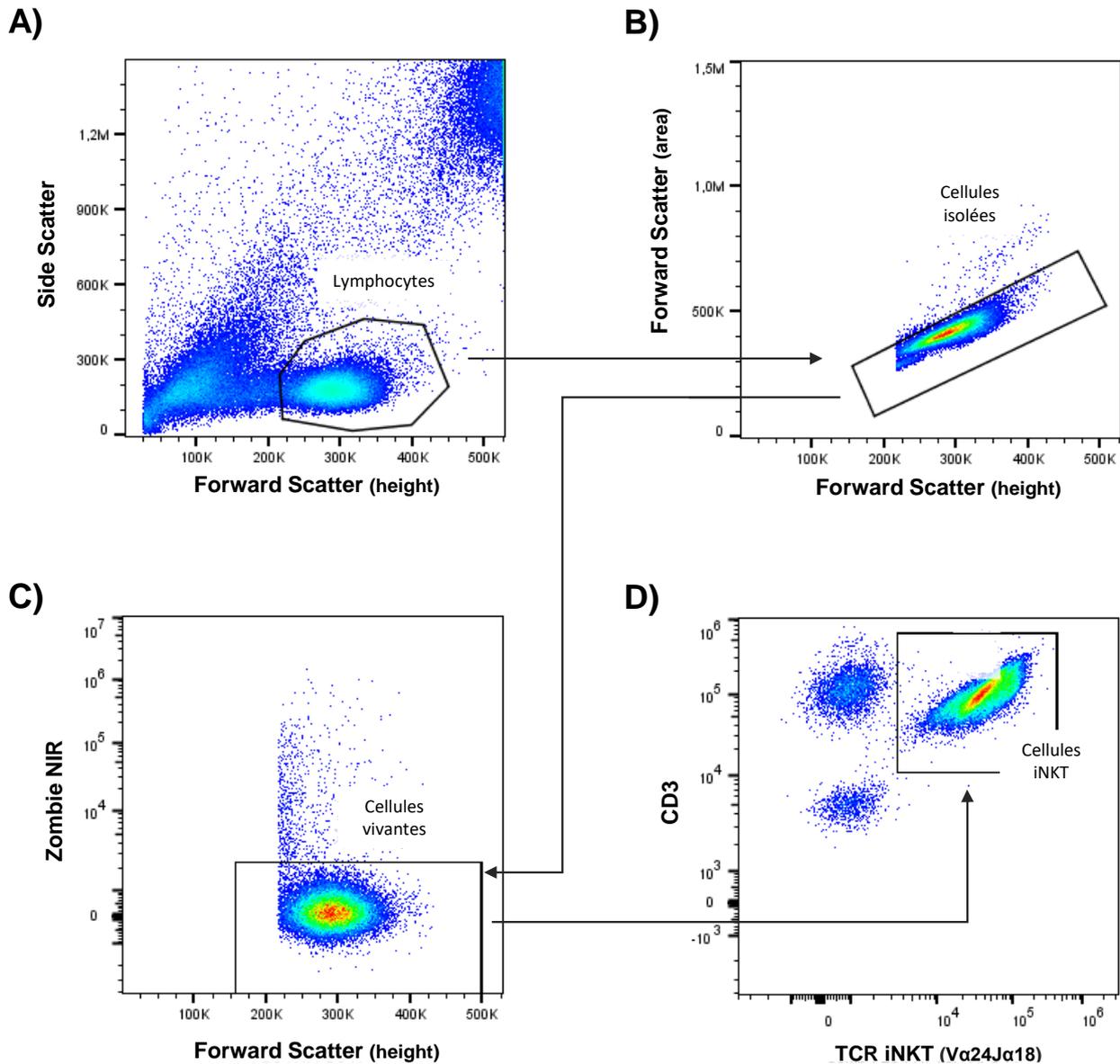


Figure 10 : Stratégie de « gating » utilisée pour sélectionner les cellules iNKT lors des analyses de cytométrie en flux. **A)** Sélection des lymphocytes en fonction de leur taille et granulosité via les paramètres : aire du « Foward » et aire du « Side Scatter ». **B)** Sélection des cellules isolées en fonction des paramètres : aire du « Foward Scatter » et hauteur du « Foward Scatter ». **C)** Sélection des cellules vivantes grâce au marqueur Zombie NIR™. **D)** Sélection des cellules iNKT grâce aux marqueurs CD3 et TCR iNKT (Va24Ja18).

	Marquage	Fluorochrome	Quantité	Clone	Firme
Zombie NIR	Viabilité	APC/Cyanine7	0,075 µL	NA	BioLegend
CD3	Lymphocyte T	BV510	1,5 µL	UCHT1	BioLegend
CD25	Activation tardive	PE/Cyanine7	2,5 µL	BC96	BioLegend
CD69	Activation précoce	FITC	2,5 µL	FN50	BioLegend
CD95	Apoptose	PE	1,5 µL	DX2	BioLegend
Va24Ja18	TCR iNKT	APC	2,5 µL	6B11	BioLegend

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés lors de la cytométrie en flux sur les cellules iNKT. NA : non applicable.

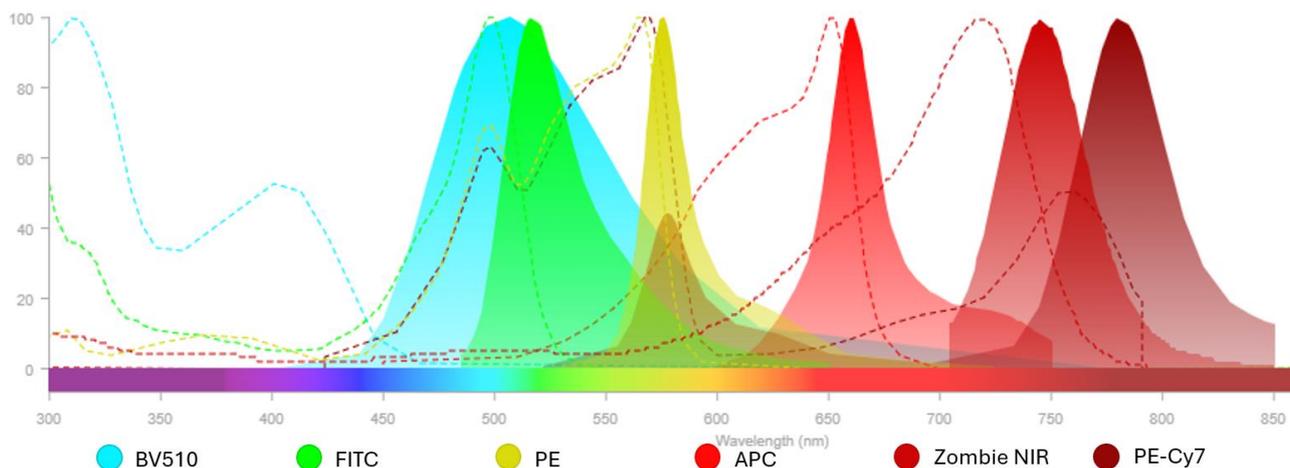


Figure 11 : Spectre d'émission de chaque fluorochrome utilisé dans le cadre de ce mémoire.

3.9 TEST DE VIABILITÉ

Afin de vérifier que les inhibiteurs n'ont pas un effet néfaste sur la viabilité des cellules lors des traitements, un test de viabilité par 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) a été réalisé. Le MTT est un composé qui rentre dans les cellules vivantes. Lorsque celui-ci pénètre dans une cellule vivante, il est réduit par des enzymes de la mitochondrie, en particulier, des enzymes nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) dépendantes de type oxydoréductase⁷⁵. Le MTT réduit devient ainsi du formazan qui a une couleur mauve et forme des cristaux insolubles qui restent dans la cellule.

Après les traitements, les puits sont lavés trois fois au PBS. 250 µL de milieu iNKT supplémentés de 10 U/mL d'rhIL-2 sont ajoutés et la plaque est incubée « *overnight* » à 37 °C et 5 % CO₂. Après cette incubation, le milieu est remplacé par 100 µL de milieu iNKT supplémentés de 10 U/mL d'rhIL-2 frais et 20 µL de MTT y sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées pendant 4 heures à 37 °C à 5 % CO₂. La réaction est arrêtée avec 100 µL de détergent MTT. Ce détergent a pour effet de lyser les cellules, mais aussi de libérer et de casser les cristaux de fromazan dans le milieu. La plaque est incubée durant 16 heures supplémentaires à 37 °C à 5 % CO₂. Après cette incubation, la plaque

est lue au spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, Molecular Devices) à 570 et 690 nm.

3.10 WESTERN BLOT

Afin de vérifier l'effet des inhibiteurs sur les cellules THP1-CD1d, des western blot (WB) ont été réalisés pour chaque utilisation des inhibiteurs : MKC-8866, trans-ISRIB et GSK2606414. Un WB a pour but de séparer les protéines d'un échantillon en fonction de leur taille. Il est ensuite possible d'observer l'expression de protéines en utilisant des anticorps adéquats.

Le WB s'effectue en plusieurs étapes qui seront détaillées ci-dessous.

3.10.1 Extraction des protéines

Après traitement, les cellules THP1-CD1d sont lavées à l'aide de PBS et congelées à sec. Les protéines sont ensuite extraites grâce à du tampon de lyse combiné à une lyse mécanique. Le lysat est récupéré et transféré dans un tube propre puis placé sur glace 10 minutes. Ensuite, le lysat est centrifugé 15 minutes à 4 °C à vitesse maximale pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est finalement récupéré et les extraits protéiques sont stockés à -20 °C avant d'être dosés.

3.10.2 Dosage protéique

Un dosage des protéines est nécessaire pour déposer une quantité de protéines identique entre les différentes conditions. Pour ce faire, un test « *Detergent compatible Protein Assay* » (BioRad, CA USA) a été utilisé. Brièvement, dans chaque puit est ajouté 25 µL de solution de tartrate de cuivre supplémentée de 2 % de surfactant. À ce mélange est ajouté 1 µL de l'extrait protéique à doser. Finalement, 200 µL de sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate sont ajoutés dans chaque puit. Après avoir homogénéisé le mélange, la plaque incube 15 minutes à l'obscurité. L'absorbance est finalement mesurée à 690 nm (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, Molecular Devices). Grâce à la droite étalon, la concentration en protéines de chaque échantillon peut être calculée.

3.10.3 Western blot

Les WB ont été réalisés sur des gels de séparation de polyacrylamide de 10 % avec un gel de concentration de 4 %.

Des échantillons contenant 100 µg de protéines et du TR 4x, en proportion 3:1, ont été préparés puis chauffés environ 3 minutes à 95 °C afin de dénaturer les protéines. Ces échantillons ont été chargés sur gel dans des cuves BioRad remplies de tampon de migration. La migration s'est d'abord déroulée à un voltage de 70-90 V dans le gel de concentration et ensuite à 120-150 V dans le gel de séparation. À la fin du processus de migration, les gels sont récupérés pour transférer les protéines sur une membrane Amersham™ HyBond™ en PVDF (Cytiva, MA US). Le processus de transfert

consiste à mettre le gel et une membrane l'un sur l'autre et à faire migrer les protéines du gel vers la membrane en exploitant le fait que les protéines sont chargées négativement car dénaturées avec du SDS. Le transfert a lieu dans des cuves de transfert de chez BioRad dans du tampon de transfert. Cette étape dure 2 heures à un ampérage de 200 mA.

Une fois le transfert terminé, la membrane est saturée dans du TBS-tween avec 5-10 % de lait (Carl Roth, Allemagne) pendant 30 à 60 minutes. Cela permet de couvrir la membrane de protéines afin que les anticorps ne se lient qu'aux protéines qui leur sont spécifiques. Les membranes sont lavées trois fois 5 minutes dans du TBS-Tween avant l'ajout de l'anticorps primaire (**Tableau 4**). L'incubation avec les anticorps primaires dure 2 heures à TA ou la nuit à 4 °C avec agitation. L'ensemble des anticorps primaires utilisés sont repris dans le **Tableau 4**. Après cette incubation, les membranes sont de nouveau lavées trois fois au TBS-Tween avant l'ajout de la solution d'anticorps secondaires pendant 1 heure à TA sous agitation.

L'anticorps secondaire est choisi en fonction de l'espèce de production de l'anticorps primaire. Deux anticorps secondaires différents ont été utilisés lors de ce mémoire, un anticorps anti-souris (CellSignaling, IgG, MA USA) et un anticorps anti-lapin (CellSignaling, IgG, MA USA).

Finalement, la membrane est une nouvelle fois lavée avant de pouvoir révéler la protéine choisie. Pour ce faire, la membrane est couverte de 1 mL de solution de révélation. Cette solution contient du luminol qui va réagir avec l'HRP présente sur l'anticorps secondaire. Par chimiluminescence, la protéine sera visible. La révélation a été faite sur l'appareil Amersham ImageQuant 800.

Nom de l'anticorps	Espèce de production	Taille	Clone	Référence	Firme
ATF4	Lapin	49 kDa	D4B8	#11815	Cell Signaling
EiF2α	Souris	36 kDa	2A10	NA	Developmental Studies Hybridoma Bank
Phospho-EIF2S1 (Ser51)	Souris	36 kDa	1A4A11	68023-1-Ig	ProteinTech
HSP90	Lapin	90 kDa	C45G5	#4877	Cell Signaling
XBP1s	Lapin	60 kDa	D2C1F	#12782	Cell Signaling

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés. NA : non applicable.

3.11 PROGRAMMES ET ANALYSES STATISTIQUES

Les données obtenues par cytométrie en flux ont été analysées par FlowJo (version 10.4). La quantification des WB a été réalisée sur le programme ImageQuant TL (version 10.2-499).

Toutes les analyses statistiques ont été exécutées via GraphPad Prism (version 8.0.1 (244)). La distribution normale des données a premièrement été évaluée par un test Shapiro-Wilk. En fonction

des résultats du test de Shapiro-Wilk, des tests paramétriques (distribution normale) ou non-paramétriques (distribution non-normale) ont été effectués. Deux types de tests ont été utilisés, un type de test comparant deux conditions (T-test (paramétrique) ou test de Mann-Whitney (non-paramétrique)) et un type de test comparant de multiples conditions (One-Way ANOVA (paramétrique) ou test de Kurskal-Wallis (non-paramétrique)).

4 RÉSULTATS

4.1 ACTIVATION DES CELLULES iNKT PAR DES MACROPHAGES PRÉ-TRAITÉS AVEC DES ACIDES GRAS SATURÉS

L'objectif principal de ce mémoire étant d'étudier l'impact des acides gras saturés sur les cellules iNKT, il est essentiel de vérifier que ceux-ci induisent une activation indirecte des cellules iNKT. Si c'est effectivement le cas, le but suivant est d'étudier les voies impliquées dans l'activation indirecte des cellules iNKT et de voir si le processus se rapproche de ce qui a été montré par d'autres équipes^{70,71} pour la thapsigargine.

Afin de vérifier que l'expérience s'est déroulée correctement, deux contrôles positifs ont été réalisés : l' α -GalCer et la thapsigargine. L' α -GalCer nous permet de confirmer que les CPAs sont capables de présenter des antigènes lipidiques aux cellules iNKT et d'induire une activation de ces dernières. La thapsigargine est un contrôle positif qui permet de reproduire les résultats précédemment obtenus par Govindarajan *et al.*⁷⁰ et Bedard *et al.*⁷¹. Pour ce faire, des cellules THP1-CD1d ont été différenciées en macrophage par traitement au PMA. Ces derniers sont ensuite traités avec des acides gras saturés (C18:0), de l' α -GalCer, de la thapsigargine ou avec leur véhicule respectif (c'est-à-dire BSA, RPMI et DMSO). Après 8 heures de traitement, les macrophages THP1-CD1d traités sont lavés 3 fois au PBS afin d'enlever tous potentiels résidus de traitement. Enfin, les cellules iNKT mises au repos sont ajoutées afin de réaliser la coculture (macrophage-cellule iNKT). Après 24 heures de coculture, les surnageants de culture et les cellules iNKT sont récupérés. Respectivement, une quantification de la production d'IFN- γ par ELISA et une quantification de l'expression des marqueurs d'activation et d'apoptose par cytométrie en flux sont ensuite effectuées.

Les cellules iNKT seules ne sécrètent pas d'IFN- γ ; ce qui confirme que ces cellules sont effectivement au repos (**Figure 12 A**). Par ailleurs, un autre contrôle a été effectué. Nous avons mesuré la quantité d'IFN- γ sécrétée par les macrophages THP1-CD1d qui n'ont pas été mis au contact des cellules iNKT suite aux traitements. Aucune sécrétion d'IFN- γ n'a pu être détectée, démontrant qu'aucun des traitements n'induit la production d'IFN- γ par les macrophages THP1-CD1d (**Annexe 1**). Lorsque les cellules iNKT sont cultivées avec les macrophages THP1-CD1d traités à l' α -GalCer, une quantité importante d'IFN- γ est mesurée dans les surnageants de culture (**Figure 12 A**). Ceci confirme la capacité des cellules THP1-CD1d à présenter des antigènes lipidiques via le CD1d. De façon rassurante, nous avons pu reproduire les résultats de Govindarajan *et al.*⁷⁰ et Bedard *et al.*⁷¹. Le traitement des cellules THP1-CD1d à la thapsigargine les rend capables d'induire

une activation des cellules iNKT démontrée par la production significativement plus importante d'IFN- γ que dans la condition contrôle (DMSO) (*Figure 12 A*). En ce qui concerne le traitement des macrophages THP1-CD1d avec le C18:0, celui-ci induit également une stimulation significative de l'activation des cellules iNKT par rapport au contrôle BSA (*Figure 12 A*).

Ensuite, l'expression de deux marqueurs d'activation, le CD25 et le CD69, a été mesurée sur les cellules iNKT par cytométrie en flux. L'expression du CD25 permet d'observer une signature similaire à la production d'IFN- γ (*Figure 12 B*). En effet, pour les traitements des macrophages avec l' α -GalCer, la thapsigargine et le C18:0, l'expression du CD25 est augmentée de manière significative lorsqu'on les compare à leur contrôle respectif (*Figure 12 B*). Par contre, seule la thapsigargine montre une augmentation significative de l'expression du CD69 par rapport à la condition contrôle DMSO (*Figure 12 C*).

L'expression du CD95, récepteur FAS, a également été évaluée. Le CD95 est utilisé dans ce mémoire comme marqueur de l'apoptose, néanmoins, l'apoptose n'est induite que si le récepteur FAS et son ligand sont présents. Les résultats pour le CD95 n'ont montré aucune différence significative entre les traitements et leur contrôle respectif, à l'exception de l' α -GalCer et son contrôle (*Figure 12 D*). Par conséquent, il a été décidé d'analyser uniquement le marqueur CD25 pour la suite des analyses.

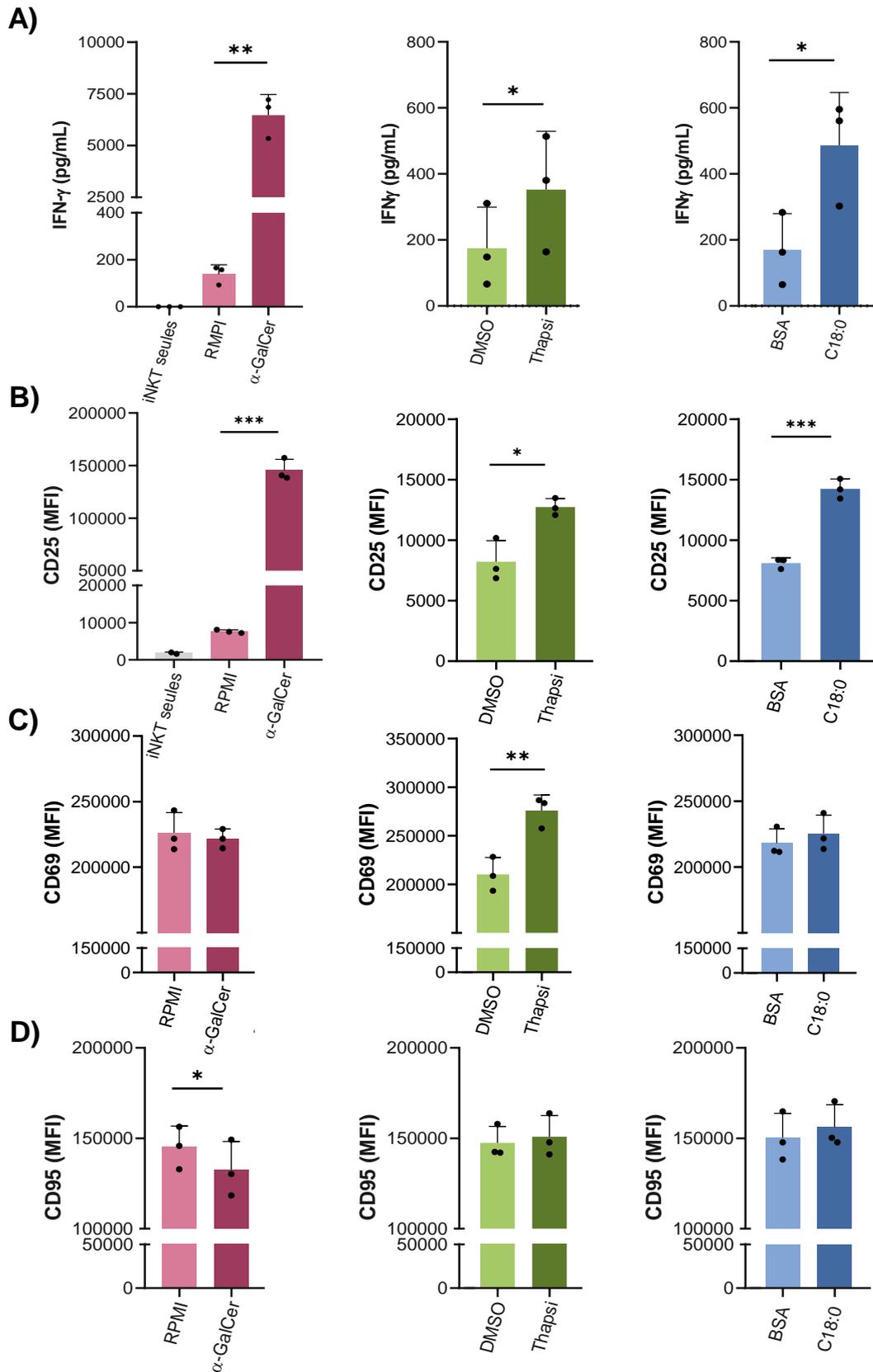


Figure 12 : Activation des cellules *i*NKT suite à leur coculture avec des THP1-CD1d pré-traitées à l' α -GalCer (100 ng/mL), à la thapsigargine (thapsi) (50 nM), au C18:0 (200 μ M) ou avec leur contrôle respectif (RPMI, DMSO, BSA). **A)** Production d'IFN- γ **B)** Expression du marqueur CD25 **C)** et CD69 **D)** CD95. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SD. N=3. Des t-tests pairés ont été réalisés afin de comparer chaque traitement à son contrôle. * p <0,05, ** p <0,01 *** p <0,001. MFI : « Median Fluorescence intensity ».

4.2 ÉVALUATION DE L'IMPLICATION DU CD1D DANS L'ACTIVATION DES CELLULES iNKT

Les cellules iNKT peuvent être activées de quatre manières différentes comme cela a été détaillé dans le paragraphe 1.3.3. Deux moyens d'activation sont les plus courants et peuvent être combinés : l'activation par le TCR des cellules iNKT et l'activation par des cytokines. Le dernier mode d'activation repose sur les récepteurs NK des cellules iNKT. Le principe des prochaines expériences présentées est de déterminer l'implication des cytokines mais aussi du CD1d présentant des antigènes lipidiques au TCR des cellules iNKT dans l'activation de ces dernières. Trois manipulations ont permis d'éclaircir la responsabilité du CD1d et des cytokines.

4.2.1 L'activation des cellules iNKT exige un contact avec les macrophages

Afin de déterminer si le contact avec les cellules THP1-CD1d est essentiel pour l'activation des cellules iNKT, celles-ci ont été mises en culture uniquement avec le milieu conditionné des macrophages THP1-CD1d traités. En pratique, les macrophages THP1-CD1d ont été traités avec de l' α -GalCer, de la thapsigargine ou du C18:0 ou avec leur contrôle respectif. Après 8h de traitement, les macrophages sont lavés 3 fois au PBS. Enfin, du milieu iNKT frais supplémenté de 10 UI/mL de rhIL-2 uniquement est ajouté. Après 24 heures d'incubation dans du milieu iNKT, les surnageants de culture des cellules THP1-CD1d sont récupérés et ajoutés sur des cellules iNKT mises au repos. Aucun contact entre les macrophages THP1-CD1d et les cellules iNKT n'a eu lieu. Après 24 heures d'incubation des cellules iNKT dans le milieu de culture conditionné des cellules THP1-CD1d, les surnageants sont récupérés afin de réaliser une quantification de la production d'IFN- γ par ELISA. Cette manipulation pourrait permettre de mettre en évidence l'implication de facteurs solubles (ex : IL-12, IL-18) libérés par les macrophages THP1-CD1d traités qui pourraient être responsables de l'activation des cellules iNKT.

Comme observé précédemment, la coculture entre les cellules iNKT et les cellules THP1-CD1d pré-traitées montre une activation des cellules iNKT par rapport au contrôle respectif (*Figure 13 A*). Par contre, lorsque ces mêmes cellules iNKT sont mises en contact uniquement avec le surnageant obtenu 24 heures après lavage des macrophages THP1-CD1d, aucune activation n'est observée (*Figure 13 B*). Seule exception, la culture de cellules iNKT dans du surnageant de macrophages THP1-CD1d pré-traités à l' α -GalCer semble induire très faiblement les cellules iNKT (*Figure 13 B*). Cette induction est cependant négligeable puisque l'induction est environ 200 fois plus faible que lorsque les cellules iNKT sont cultivées directement avec les macrophages THP1-CD1d traités à l' α -GalCer. À la vue de ces résultats, il est clair que l'activation des cellules iNKT dépend d'un contact cellulaire avec les macrophages THP1-CD1d et que l'activation ne peut pas se faire uniquement en réponse à des facteurs solubles libérés par les macrophages.

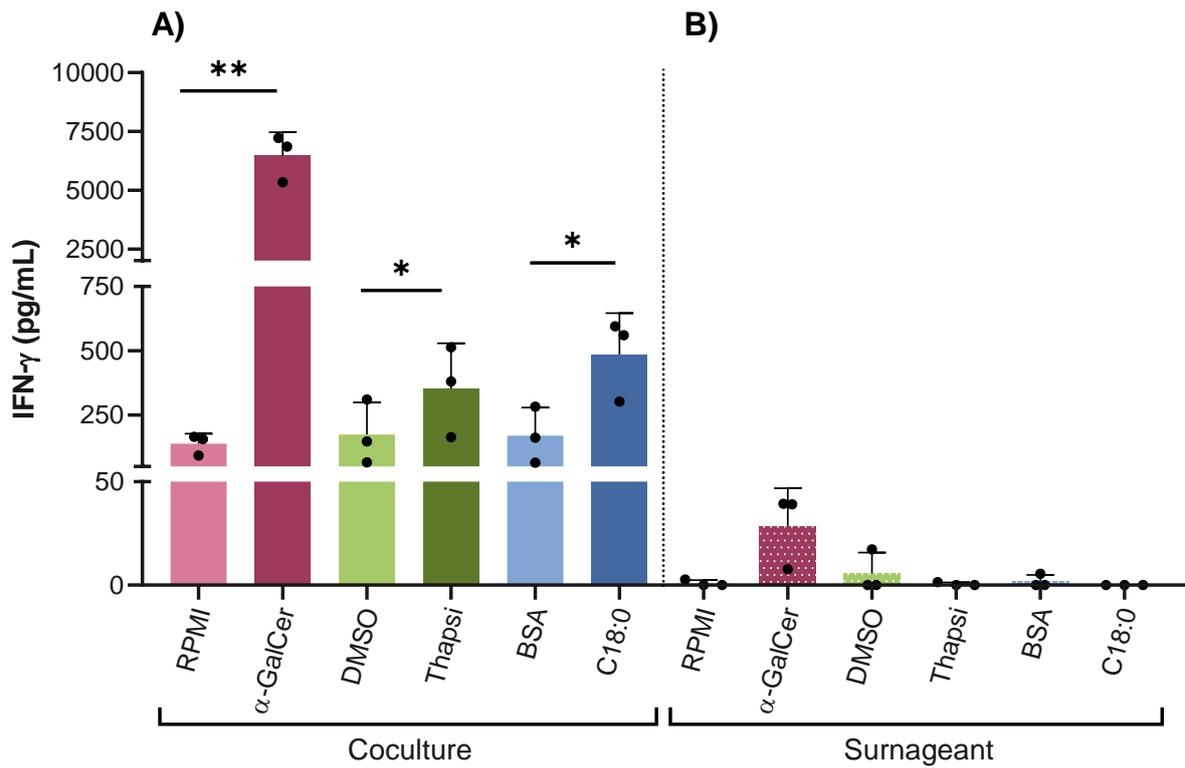


Figure 13 : Production d'IFN- γ par les cellules iNKT suite à une **A)** coculture avec des macrophages THP1-CD1d ou **B)** culture en présence des surnageants des cellules THP1-CD1d, précédemment traitées avec de l' α -GalCer (100 ng/mL), de la thapsigargine (50nM) et du C18:0 (200 μ M) ou avec leur contrôle respectif (RPMI, DMSO et BSA). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SD. N=3. Des t-tests pairés ont été réalisés afin de comparer chaque traitement à son contrôle pour chaque condition (A) et B)). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Thapsi : Thapsigargine.

4.2.2 L'activation des cellules iNKT implique leur TCR

L'expression du TCR des cellules iNKT (Va24Ja18) a également été mesurée (**Figure 14 E**). L'intérêt de ce marqueur vient du fait que lors d'une interaction entre l'antigène lipidique chargé sur le CD1d des CPAs et le TCR des cellules iNKT ce dernier est internalisé. Par conséquent, une baisse de l'expression du TCR sur les cellules iNKT démontre son activation. De façon tout à fait attendue, les cellules iNKT seules qui n'ont pas subi de coculture, montrent l'expression du TCR la plus élevée. La coculture avec des macrophages THP1-CD1d non traités suffit pour induire l'internalisation du TCR probablement à la suite de la présentation via le CD1d d'antigène lipidiques endogènes exprimés de manière constitutive par les macrophages THP1-CD1d. La stimulation avec l' α -GalCer a pour effet de diminuer davantage les niveaux membranaires du TCR. Une diminution plus faible, mais significative de l'expression du TCR des cellules iNKT est également observée lorsqu'elles sont co-cultivées avec les macrophages pré-traités à la thapsigargine ou au C18:0 suggérant que les stress « stériles » sont capables d'induire une présentation d'antigène lipidiques via leur CD1d.

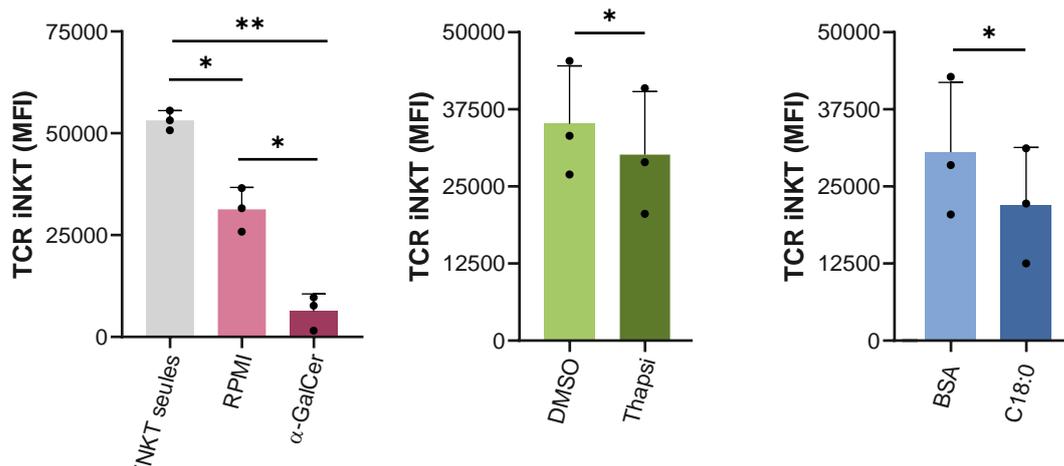


Figure 14 : Activation des cellules iNKT suite à leur coculture avec des macrophages THP1-CD1d pré-traités à l' α -GalCer (100 ng/mL), à la thapsigargine (50 nM), au C18:0 (200 μ M) ou avec leur contrôle respectif (RPMI, DMSO, BSA). Expression du marqueur TCR des cellules iNKT. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SD. N=3. Des t-tests pairés ont été réalisés afin de comparer chaque traitement à son contrôle. * p <0,05, ** p <0,01. MFI : « Median Fluorescence Intensity », Thapsi : Thapsigargine.

4.2.3 L'activation des cellules iNKT est dépendante de la présentation d'antigène lipidique via le CD1d

Dans le but de prouver ou réfuter l'implication du CD1d dans la stimulation des cellules iNKT lorsque les macrophages THP1-CD1d sont traités avec des acides gras, un anticorps bloquant le CD1d ou son isotype contrôle a été utilisé. L'anticorps bloquant, contrairement à l'isotype contrôle, va empêcher l'interaction entre le TCR des cellules iNKT et l'antigène lipidique présenté par le CD1d.

Les différents contrôles donnent les résultats attendus. Effectivement, l'isotype contrôle de l'anticorps bloquant ne semble pas impacter la capacité des cellules iNKT à reconnaître les antigènes lipidiques et à sécréter de l'IFN- γ suite à leur activation (**Figure 15**). Les résultats obtenus ont le même profil d'activation que ce qui a été détaillé au paragraphe **4.1**. La sécrétion d'IFN- γ par les cellules iNKT cultivées avec de l'anticorps bloquant ciblant le CD1d suit le même profil, mais l'activation est plus faible. Une diminution significative de la production d'IFN- γ par les cellules iNKT a pu être observée pour l' α -GalCer, et son contrôle, ainsi que pour la thapsigargine. Néanmoins, la réduction de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules iNKT lors de leur coculture avec des macrophages THP1-CD1d traités au C18:0, à la BSA ou au DMSO n'est pas significative. Cependant, une tendance à la décroissance de la concentration en IFN- γ peut tout de même être observée pour ces trois conditions.

Les résultats par cytométrie en flux du CD25 sont assez surprenants. En effet, une faible augmentation non-significative de l'expression du CD25 lors de la présence d'anticorps bloquant le CD1d a été enregistrée dans les conditions RPMI, DMSO, thapsigargine et BSA (**Figure 15 A**). Cependant, pour l' α -GalCer et le C18:0, cette impression semble inversée et une légère diminution de l'expression du CD25 est visible, mais non-significative (**Figure 15 B**).

Par ailleurs, les analyses du TCR sur les cellules iNKT par cytométrie en flux semblent corroborer les résultats de l'ELISA (**Figure 15 C**). De fait, l'expression du TCR ré-augmente en présence de l'anticorps bloquant de manière significative lorsque les macrophages THP1-CD1d ont été traités à l' α -GalCer ou C18:0 (**Figure 15 C**). De plus, une tendance à la hausse de l'expression du TCR iNKT a également été mesurée pour la thapsigargine (**Figure 15 C**). Une augmentation de l'expression du TCR iNKT avec l'anticorps bloquant le CD1d signifie que le TCR est moins sollicité, et par conséquent, moins internalisé. Le CD1d est donc par extension nécessaire à l'activation des cellules iNKT puisque son blocage réduit l'activation indirecte des cellules iNKT.

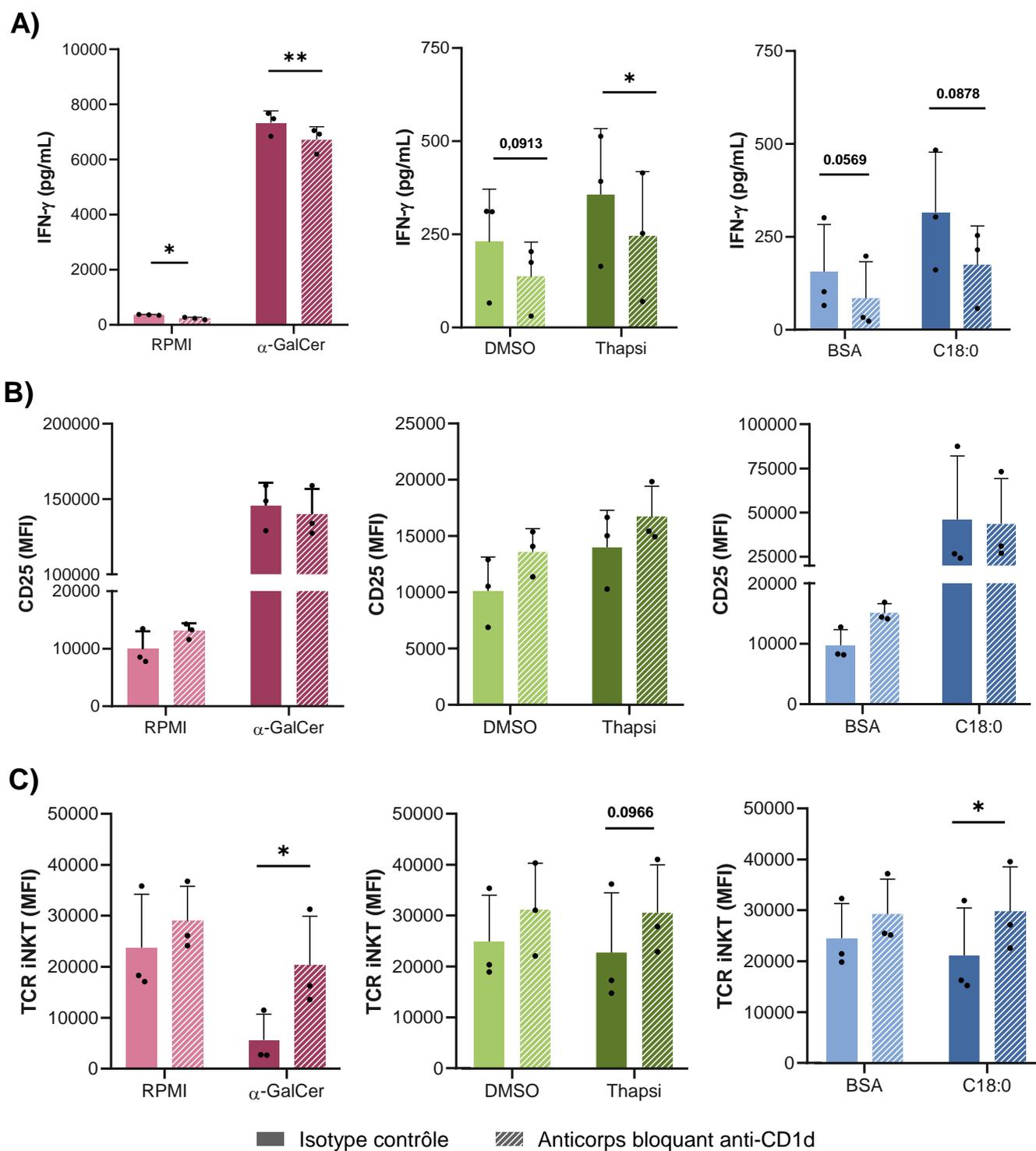


Figure 15 : Activation des cellules iNKT à la suite de la coculture avec des THP1-CD1d traitées à l' α -GalCer (100 ng/mL), à la thapsigargine (50 nM), au C18:0 (200 μ M) ou avec leur contrôle respectifs (RPMI, DMSO, BSA) avec et sans anticorps bloquant. A) Production d'IFN- γ B) Expression du marqueur CD25 C) et TCR iNKT. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SD. N=3. Des t-tests paillés ont été réalisés afin de comparer chaque traitement entre la condition isotype contrôle et anticorps bloquant. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. MFI : « Median Fluorescence Intensity », Thapsi : Thapsigargine

4.3 ETUDE DE L'IMPLICATION DES VOIES DU STRESS DU RE DANS L'ACTIVATION DES CELLULES iNKT

Une fois qu'il a été vérifié que les acides gras induisent une activation indirecte des cellules iNKT, la deuxième partie de ce mémoire a débuté. L'étape suivante consiste à étudier chaque voie de la réponse UPR afin de déterminer son éventuelle implication dans l'activation indirecte des cellules iNKT. Les voies IRE1 et PERK ont été favorisées car leur implication a déjà été démontrée précédemment par deux équipes (Govindarajan *et al.*⁷⁰ et Bedard *et al.*⁷¹) lors de l'utilisation de thapsigargine. Les expériences suivantes ont été réalisées afin de mettre en lumière l'implication de ces deux voies dans le processus conduisant à la présentation d'antigène lipidique via le CD1d au sein des macrophages THP1-CD1d en réponse au traitement par des acides gras saturés. Un contrôle à la thapsigargine a été réalisé afin de répliquer les résultats obtenus précédemment^{70,71}.

4.3.1 Évaluation de l'implication de la voie de IRE1

Avant la coculture entre macrophages THP1-CD1d pré-traités et les cellules iNKT, il a été nécessaire de valider l'impact de l'inhibiteur MKC-8866 sur les cellules THP1-CD1d. Le MKC-8866 inhibe l'activité ribonucléase d'IRE1 et empêche ainsi l'épissage de l'ARNm *XPB1u* en *XPB1s* et, par conséquent, la synthèse du facteur de transcription XPB1s.

Pour vérifier son effet, nous avons choisi de mesurer l'expression de XPB1s par western blot à différentes concentrations en inhibiteur. Pour ce faire, trois concentrations en inhibiteur ont été choisies : 5, 10 et 15 μ M. Le traitement s'est déroulé comme suit : après différenciation, les macrophages THP1-CD1d ont d'abord été pré-traités avec le MKC-8866 ou du DMSO. Après 1 heure d'incubation avec l'inhibiteur, les différents traitements (thapsigargine, C18:0 ou leur contrôle respectif) ont été ajoutés au milieu avant une incubation de 8 heures supplémentaires. À la fin du traitement, les protéines ont été récupérées suivant le protocole détaillé dans le paragraphe **3.10.1** afin de réaliser les western blot.

La **Figure 16 A** montre une image représentative d'un western blot. La quantification de trois expériences indépendantes a permis d'illustrer une inhibition significative de la synthèse de XPB1s par le MKC-8866 (**Figure 16 B**). Pour la thapsigargine, une concentration de 5 μ M d'inhibiteur suffit à inhiber totalement le clivage de *XPB1u* (**Figure 16 B**). Pour le C18:0, l'inhibition est visible et significative à partir de 5 μ M d'inhibiteur, mais elle n'est pas totale (**Figure 16 B**).

Il a ensuite fallu contrôler que les concentrations choisies en MKC-8866 n'avaient pas d'effet cytotoxique sur les cellules THP1-CD1d lors du traitement. Lors de ce contrôle, les cellules ont été traitées de la même façon que lors de la coculture, c'est-à-dire qu'à la fin des 8h de traitement les cellules destinées à la réalisation du test de viabilité ont été lavées 3 fois et du milieu iNKT a été

ajouté pour imiter l'effet de la coculture pendant 16 heures. Ensuite, le test de viabilité (MTT) a été effectué comme expliqué dans le paragraphe 3.9. Les résultats (*Figure 16 C*) ne montrent pas de cytotoxicité des cellules liée à l'inhibiteur.

Ces résultats nous ont permis de débiter les tests sur les cellules iNKT. Premièrement, les résultats de l'ELISA (*Figure 16 D*) ne montrent pas d'inhibition de l'activation des cellules iNKT suite à la coculture avec les THP1-CD1d traitées à la thapsigargine avec des concentrations croissantes de MKC-8866. Les résultats ne sont pas non plus significatifs lors de la coculture avec des THP1-CD1d traitées au C18:0 avec de l'inhibiteur mais dégagent néanmoins une forte tendance à la diminution à une concentration de 5 μ M en MKC-8866 (*Figure 16 D*).

Deuxièmement, les résultats de cytométrie analysant l'expression du CD25 démontrent bien une activation des cellules iNKT en réponse aux deux traitements, mais celle-ci n'est pas affectée par l'inhibiteur d'IRE1 (*Figure 16 E-F*).

Dans l'ensemble, ces résultats laissent à penser qu'il pourrait avoir un effet du MKC-8866 à 5 μ M sur l'activation indirecte des cellules iNKT, mais rien ne peut être affirmé à ce stade. Il serait intéressant de réitérer cette expérience avec certaines mises au point. En effet, l'implication de la voie d'IRE1 dans l'activation indirecte des cellules iNKT suite à la coculture avec des macrophages THP1-CD1d pré-traités à la thapsigargine ou au C18:0 reste ambiguë.

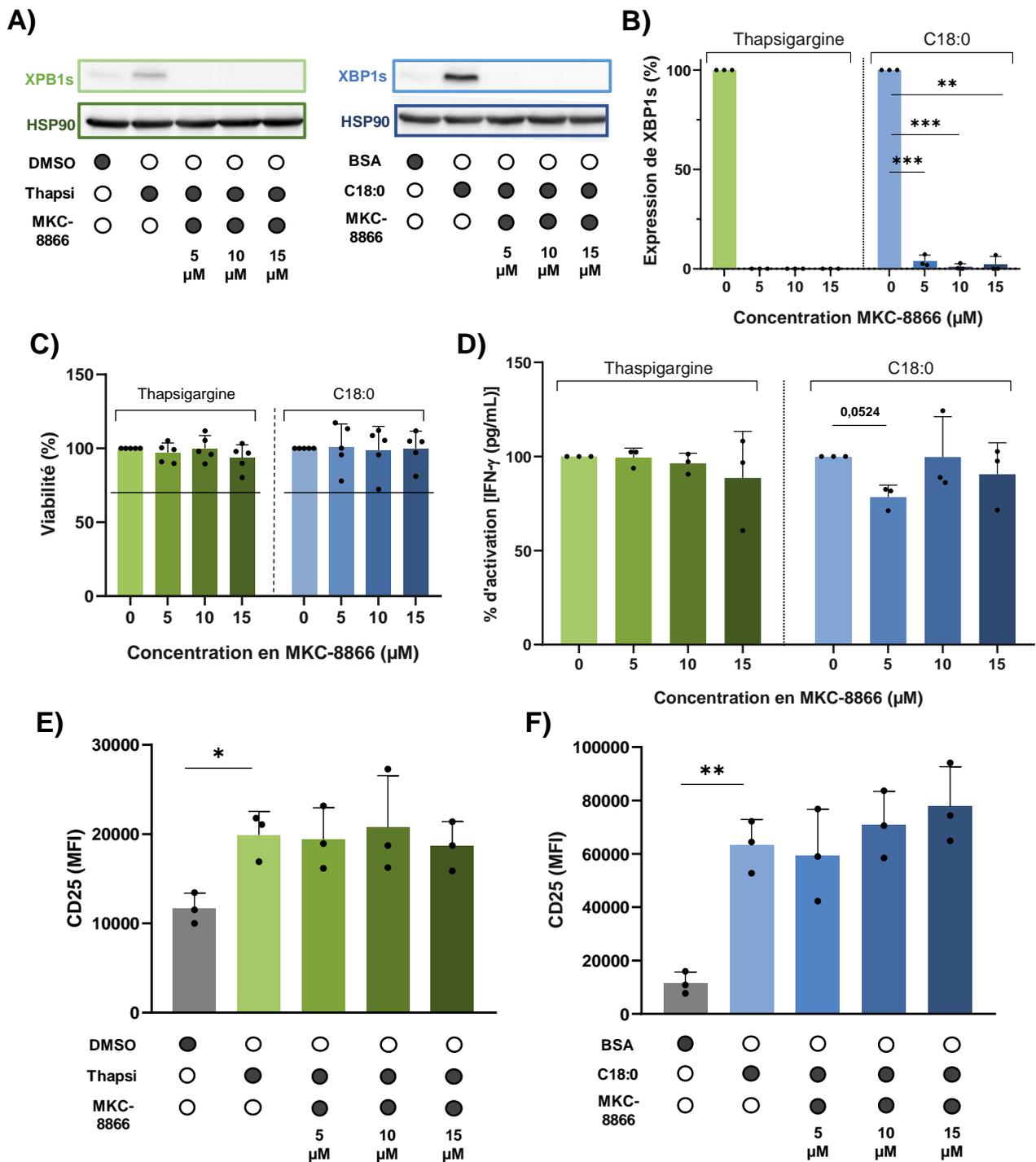


Figure 16 : Impact de l'inhibiteur MKC-8866 sur le potentiel activant des macrophages THP1-CD1d traités avec la thapsigargine ou le C18:0. Les cellules THP1-CD1d ont été pré-traitées (1h) avec l'inhibiteur MKC-8866 (5-15 μ M) ou le véhicule (DMSO) avec l'ajout pendant 8h de la thapsigargine (50 nM), du C18:0 (200 μ M) ou leur contrôle respectif (DMSO et BSA). **A)** Western blot représentatif montrant la protéine XBP1s parallèlement au contrôle de charge HSP90. N=3 **B)** Quantification des western blot (XBP1s/HSP90). **C)** Test de viabilité. N=5. **D)** Sécrétion d'IFN- γ et E), F) expression du marqueur CD25 par les cellules iNKT après 24h de coculture avec les macrophages ayant subi les traitements indiqués. **B-E)** Les données sont représentées sous forme de la moyenne \pm SD. Des t-tests pairs ont été réalisés entre chaque traitement et son contrôle et des tests One-Way ANOVA ont été réalisés entre chaque traitement et les différentes concentrations en inhibiteur afin d'obtenir des p-valeurs. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$. MFI : « Median Fluorescence Intensity », Thapsi : Thapsigargine

4.3.2 Évaluation de la voie de PERK

4.3.2.1 Évaluation de l'impact de l'inhibiteur de PERK, GSK2606414

Avant la coculture entre cellules THP1-CD1d pré-traitées et les cellules iNKT, il a été nécessaire de contrôler l'impact de l'inhibiteur GSK2606414 sur les cellules THP1-CD1d. Le GSK2606414 inhibe l'activité kinase de PERK. Pour vérifier son effet, nous avons choisi de mesurer l'expression des protéines : eiF2 α -phosphorylée, eiF2 α totale et ATF4, par western blot à différentes concentrations en inhibiteur. Pour ce faire, quatre concentrations en inhibiteur ont été sélectionnées : 0,25, 0,5, 0,75 et 1 μ M. Le traitement s'est déroulé comme suit : après différenciation, les macrophages THP1-CD1d ont d'abord été pré-traités avec les bonnes concentrations d'inhibiteur ou du DMSO. Après 1 heure d'incubation avec l'inhibiteur, les différents traitements (thapsigargine, C18:0 ou leur contrôle respectif) ont été ajoutés au milieu avant une incubation de 8h supplémentaires. À la fin du traitement, les protéines ont été récupérées suivant le protocole détaillé dans le paragraphe **3.10.1** en vue de réaliser les western blot.

La *Figure 17 A* montre une image représentative d'un western blot. La quantification d'une expérience a permis de montrer que la phosphorylation d'eiF2 α (phospho-eiF2 α /eiF2 α) (*Figure 17 B*) et l'accumulation d'ATF4 (AFT4/HSP90) (*Annexe 2*) en réponse au C18:0 et à la thapsigargine sont bien diminuées par l'inhibiteur GSK2606414. L'action de l'inhibiteur semble plus importante lors d'un pré-traitement au C18:0 par rapport à la thapsigargine. Pour la thapsigargine, l'inhibition de phospho-eiF2 α et d'ATF4 est visible, mais faible à partir d'une concentration de 0,25 μ M en inhibiteur et elle semble dose-dépendante. Pour le C18:0, l'inhibition de phospho-eiF2 α et d'ATF4 est visible à partir d'une concentration de 0,25 μ M en inhibiteur et semble relativement stable lorsque la concentration en inhibiteur augmente. Cependant, l'inhibition d'eiF2 α dans sa forme phosphorylée ne dépasse pas 50 % et ce même à une concentration de 1 μ M en inhibiteur (*Figure 17 B*).

Il a ensuite fallu surveiller que les concentrations choisies en GSK2606414 n'avaient pas d'effet cytotoxique sur les macrophages THP1-CD1d lors des traitements. Lors de ce contrôle, les cellules ont été traitées de la même façon que lors de la coculture, c'est-à-dire qu'à la fin des 8h de traitement les cellules destinées à la réalisation du test de viabilité ont été lavées 3 fois et du milieu iNKT a été ajouté pour imiter l'effet de la coculture. Ensuite, le test de viabilité a été réalisé comme expliqué dans le paragraphe **3.9**. Les résultats (*Figure 17 C*) n'indiquent pas de cytotoxicité des cellules liées à l'inhibiteur.

Ces résultats nous ont permis de débiter les tests sur les cellules iNKT. Premièrement, les résultats de l'ELISA (*Figure 17 D*) ne semblent pas montrer d'inhibition de l'activation des cellules

iNKT suite à la coculture avec les THP1-CD1d traitées à la thapsigargine avec des concentrations accrues de GSK2606414. Les résultats sont davantage encourageants lors de la coculture avec des macrophages THP1-CD1d pré-traités au C18:0 avec de l'inhibiteur, mais rien ne peut être conclu puisqu'il s'agit d'une seule expérience.

Deuxièmement, les résultats de cytométrie ne sont pas prometteurs (*Figure 17 E-F*). Une induction de l'activation a bien été observée lors des traitements à la thapsigargine et au C18:0 par rapport à leur contrôle, mais aucune diminution de l'activation n'a pu être mesurée suite à l'ajout d'inhibiteur.

Dans l'ensemble, ces résultats ne permettent pas de tirer de conclusions étant donné que l'expérience n'a pu être effectuée qu'une seule fois.

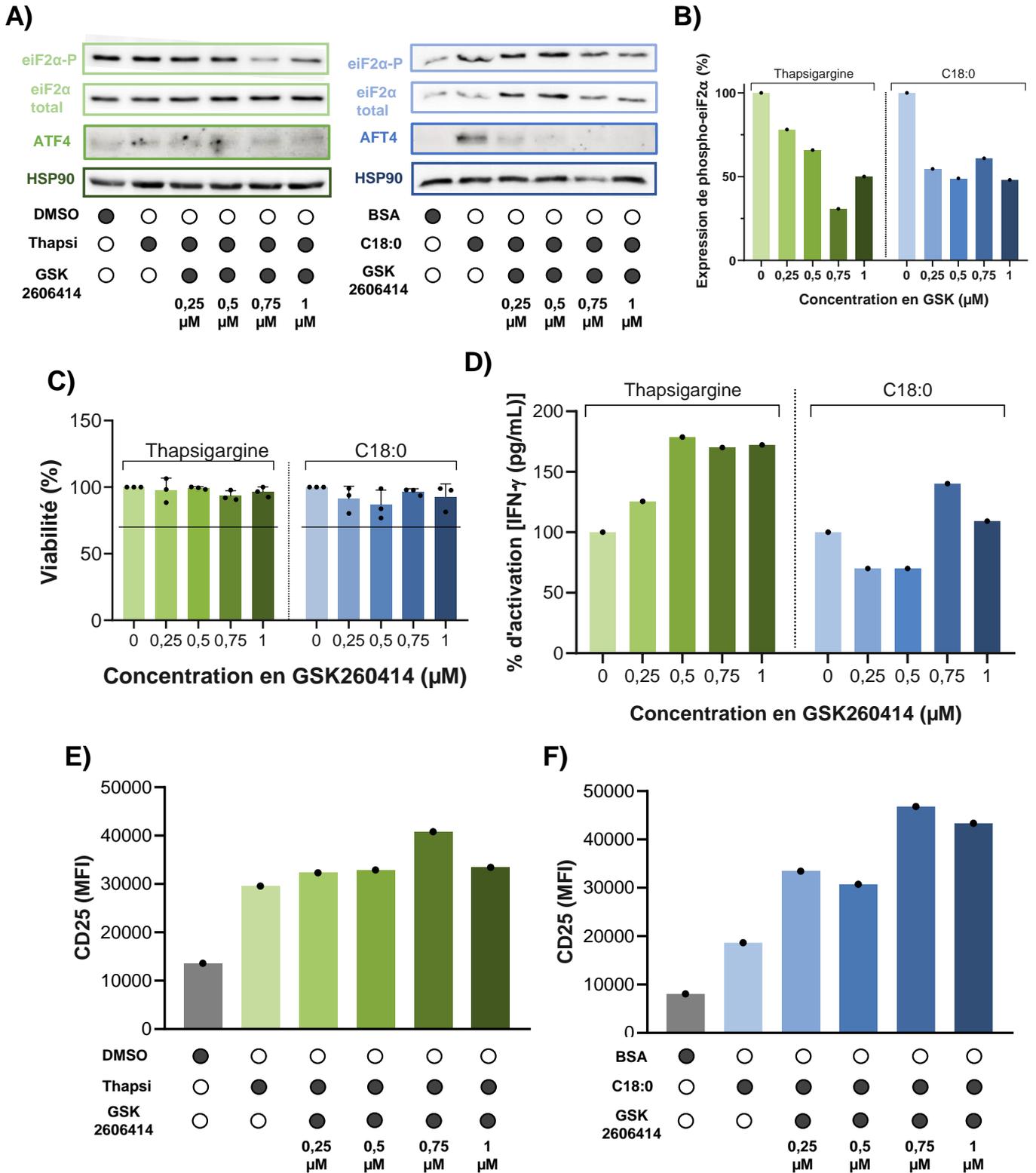


Figure 17 : Impact de l'inhibiteur GSK2606414 sur le potentiel activant des macrophages THP1-CD1d traités avec la thapsigargine ou le C18:0. Les cellules THP1-CD1d ont été pré-traitées (1h) avec l'inhibiteur GSK2606414 (0,25-1 μM) ou le véhicule (DMSO) avant l'ajout pendant 8h de la thapsigargine (100 nM, du C18:0 (200 μM) ou leur contrôle respectif (DMSO et BSA). **A)** Western blot représentatif montrant les protéines eiF2α dans sa forme phosphorylée et ATF4 parallèlement au contrôle eiF2α total et au contrôle de charge HSP90. N=1 **B)** Quantification des western blot pour (phospho-eiF2α/eiF2α). **C)** Test de viabilité. N=3. **D)** Sécrétion d'IFN-γ et **E)** expression du marqueur CD25 par les cellules iNKT après 24 heures de coculture avec les macrophages ayant subi les traitements indiqués. N=1. **B-E)** Les données sont représentées sous forme de la moyenne ± SD. Des tests One-Way ANOVA pairés ont été réalisées afin d'obtenir des P-valeurs quand N=3. MFI : « Median Fluorescence Intensity », Thapsi : Thapsigargine.

4.3.2.2 Évaluation de l'impact de l'inhibiteur de la forme phosphorylée d'eIF2 α , le trans-ISRIB

Avant la coculture entre macrophages THP1-CD1d pré-traités et les cellules iNKT, il a été nécessaire de vérifier l'impact de l'inhibiteur trans-ISRIB sur les cellules THP1-CD1d. Cet inhibiteur agit au niveau de eIF2 α dans sa forme phosphorylée et la rend inactive. Pour valider son effet, nous avons choisi de mesurer l'expression d'ATF4 par western blot à différentes concentrations en inhibiteur. Pour ce faire, quatre concentrations en inhibiteur ont été choisies : 0,05, 0,1, 0,2 et 0,5 μ M. Le traitement s'est déroulé comme suit : après différenciation, les cellules THP1-CD1d ont d'abord été pré-traitées avec les bonnes concentrations d'inhibiteur ou du DMSO. Après 1 heure d'incubation avec l'inhibiteur, les différents traitements (thapsigargine, C18:0 ou leur contrôle respectif) ont été ajoutés au milieu avant une incubation de 8h supplémentaires. À la fin du traitement, les protéines ont été récupérées suivant le protocole détaillé dans le paragraphe **3.10.1** afin de réaliser les western blot.

La **Figure 18 A** montre une image représentative d'un western blot. La quantification de trois expériences indépendantes a permis de déceler une inhibition significative d'ATF4 via l'inhibiteur trans-ISRIB (**Figure 18 B**). Pour la thapsigargine et pour le C18:0, une concentration de 0,05 μ M d'inhibiteur suffit à empêcher visiblement et significativement la traduction d'ATF4 (**Figure 18 B**). Cependant, l'inhibition de l'expression d'ATF4 n'est pas totale et ce même à 0,5 μ M d'inhibiteur (**Figure 18 B**).

Il a ensuite fallu vérifier que les concentrations choisies en trans-ISRIB n'avait pas d'effet cytotoxique sur les cellules THP1-CD1d lors des traitements. Lors de ce contrôle, les cellules ont été traitées de la même façon que lors de la coculture, c'est-à-dire qu'à la fin des 8h de traitement les cellules destinées à la réalisation du test de viabilité ont été lavées 3 fois et du milieu iNKT a été ajouté pour imiter l'effet de la coculture. Ensuite, le test de viabilité a été effectué comme expliqué dans le paragraphe **3.9**. Les résultats (**Figure 18 C**) ne décèlent pas de cytotoxicité des cellules liées à l'inhibiteur, bien qu'une perte significative de viabilité soit mesurée à une concentration de 0,2 μ M en inhibiteur lors de la culture avec le C18:0 (**Figure 18 C**). Le taux de viabilité reste cependant supérieur au seuil de cytotoxicité de 70 %⁷⁶ (**Figure 18 C**).

Ces résultats nous ont permis de débiter les tests sur les cellules iNKT. Premièrement, les résultats de l'ELISA (**Figure 18 D**) ne semblent pas montrer d'inhibition de l'activation des cellules iNKT suite à la coculture avec les THP1-CD1d traitées à la thapsigargine avec des concentrations accrues de trans-ISRIB (**Figure 18 D**). Par contre, les résultats sont encourageants lors de la coculture avec des THP1-CD1d traitées au C18:0. En effet, une diminution de l'activation est observée à partir de 0,05 μ M d'inhibiteur et semble dose-dépendante (**Figure 18 D**). Néanmoins, l'activation semble augmenter à une concentration de 0,5 μ M d'inhibiteur (**Figure 18 D**).

Deuxièmement, les résultats de cytométrie en flux semblent prometteurs (*Figure 18 E-F*). Une induction de l'activation a bien été observée lors des traitements à la thapsigargine et au C18:0 par rapport à leur contrôle (*Figure 18 E-F*). Une diminution est mesurée à la fois lors des traitements avec de la thapsigargine et avec du C18:0 (*Figure 18 E-F*). Cependant, la diminution d'activation lors de la coculture avec des macrophages THP1-CD1d pré-traités à la thapsigargine est faible (*Figure 18 E-F*).

Dans l'ensemble, ces résultats ne permettent pas de conclure l'implication de la voie de PERK-eiF2 α dans l'activation indirecte des cellules iNKT suite à la coculture avec des cellules THP1-CD1d pré-traitées car seule une expérience a pu être réalisée. Ces résultats sont encourageants bien qu'ils doivent être mis en lien avec l'expérience précédente étudiant la même voie de l'UPR.

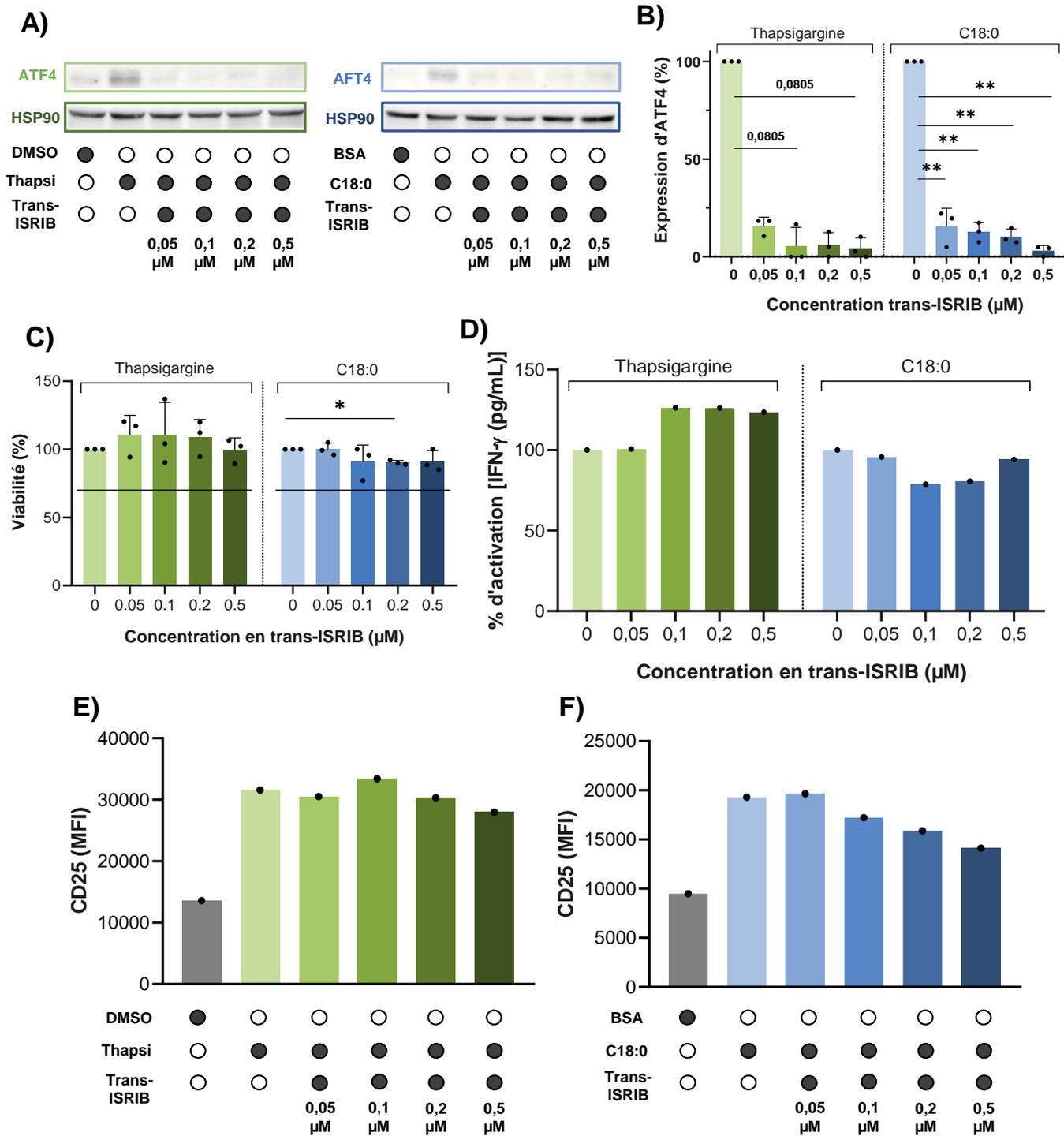


Figure 18 : Impact de l'inhibiteur trans-ISRIB sur le potentiel activant des macrophages THP1-CD1d traités avec la thapsigargine ou le C18:0. Les cellules THP1-CD1d ont été pré-traitées (1h) avec l'inhibiteur trans-ISRIB (0,05-0,5 μM) ou le véhicule (DMSO) avant l'ajout pendant 8 heures de la thapsigargine (100 nM), du C18:0 (200 μM) ou leur contrôle respectif (DMSO et BSA). **A)** Western blot représentatif montrant la protéine ATF4 parallèlement au contrôle de charge HSP90. N=3 **B)** Quantification des western blot. **C)** Test de viabilité. N=3. **D)** Sécrétion d'IFN- γ et **E), F)** Expression du marqueur CD25 par les cellules iNKT après 24 heures de coculture avec les macrophages ayant subi les traitements indiqués. N=1. **B-E)** Les données sont représentées sous forme de la moyenne \pm SD. Des tests One-Way ANOVA et Kruskal-Wallis pairés ont été réalisés entre chaque condition afin d'obtenir des p-valeurs. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$. MFI : « Median Fluorescence Intensity », Thapsi : Thapsigargine.

5 DISCUSSION

Les cellules iNKT, de par leur fonction essentielle d'immunorégulateur, sont aujourd'hui très étudiées⁴¹. Ce sont des cellules importantes notamment parce qu'elles sont connues pour réguler de nombreux mécanismes de l'immunité innée et adaptative^{41,43}. Ce mémoire s'est particulièrement intéressé à leur rôle dans l'obésité car il a été observé que le phénotype et l'activité des cellules iNKT périphériques sont perturbés chez le patient obèse en comparaison avec le patient contrôle. En effet, le pourcentage de cellules iNKT en apoptose est significativement augmenté et les cellules résiduelles montrent un profil activé et une activité diminuée^{66,67} (Wilkin *et al.*, manuscrit en préparation). On a choisi de se focaliser sur l'impact des acides gras saturés sur l'activation indirecte des cellules iNKT par des macrophages.

L'activation indirecte des cellules iNKT a été vérifiée grâce à une coculture avec des macrophages THP1-CD1d pré-traités avec de l' α -GalCer, de la thapsigargine et du C18:0 ainsi que leur contrôle respectif (RPMI, DMSO et BSA). L' α -GalCer et la thapsigargine ont été utilisés comme deux contrôles positifs afin de vérifier que l'activation des cellules iNKT s'est déroulée correctement. L'induction des cellules iNKT a été étudiée par deux méthodes, un dosage de cytokine et une analyse de marqueurs d'activation et d'apoptose par cytométrie en flux. Bien que l'utilisation de ces deux méthodes puisse sembler redondante, il est important de comprendre que les informations apportées par ces deux méthodes sont complémentaires. En effet, les résultats obtenus par l'une ou l'autre méthode ne sont pas toujours identiques. C'est d'ailleurs le cas pour les expériences faisant intervenir les inhibiteurs GSK2606414 et trans-ISRIB (*Figure 17* et *Figure 18*).

La première expérience visant à vérifier l'activation indirecte des cellules iNKT suite à une coculture avec des macrophages pré-traités à l' α -GalCer, la thapsigargine et au C18:0, montre les résultats attendus. L'induction a été analysée de deux manières : un dosage de cytokine pro-inflammatoire (IFN- γ) et la mesure de l'expression de marqueurs d'activation par cytométrie en flux (CD25 et CD69). Lorsqu'on s'intéresse aux contrôles (RPMI, DMSO et BSA), on observe une faible activation des cellules iNKT qui correspond à l'activation basale de ces cellules lors d'un contact avec des CPAs. Bien que les CPAs n'aient pas été cultivées en présence d'un inducteur, elles présentent néanmoins toujours des antigènes lipidiques endogènes aux cellules iNKT, ce qui a pour conséquence de les activer faiblement. La stimulation des cellules iNKT suite à la coculture avec des macrophages pré-traités à l' α -GalCer confirme que les macrophages THP1-CD1d sont capables de présenter des antigènes lipidiques. D'un autre côté, le pré-traitement à la thapsigargine nous a permis de reproduire les résultats engendrés par Govindarajan *et al.*⁷⁰ et Iovino

et al.⁴⁰ montrant que le stress du RE est capable d'induire la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d.

La différence majeure entre les résultats obtenus pour les marqueurs CD25 et CD69 réside dans la cinétique d'expression de ces deux marqueurs⁷⁷. En effet, le CD25, composant du récepteur de l'IL-2⁷⁸, est un marqueur d'activation tardif⁷⁷. L'augmentation de son expression débute environ 12 heures après l'activation, atteint son maximum d'expression après 72 heures et se maintient jusqu'à 2 semaines⁷⁷. Le CD69, récepteur à la lectine de type II⁷⁹, quant à lui est un marqueur d'activation précoce⁷⁷. L'augmentation de son expression commence déjà après quelques heures, atteint son maximum d'expression vers 24 heures et diminue par la suite⁷⁷. La différence entre les résultats obtenus pour ces deux marqueurs est probablement due à cette différence de cinétique. Par conséquent, nous avons choisi d'étudier principalement le marqueur CD25.

Quant au marqueur CD95, utilisé comme marqueur de l'apoptose bien que l'apoptose nécessite à la fois le CD95 (récepteur FAS) et son ligand pour être induite⁸⁰, une expression significativement plus importante du CD95 a pu être observée (*Figure 12*). Ces premiers résultats s'inscrivent dans la continuité de ce qui a précédemment été montré par le laboratoire d'immunométabolisme et nutrition, mais également aux écrits de la littérature^{70,71}.

Ces premiers constats nous ont permis de faire un focus sur les mécanismes permettant aux cellules présentatrices d'antigènes d'induire une activation des cellules iNKT.

5.1 PARTIE 1 : IMPLICATION DU CD1D DANS L'ACTIVATION INDIRECTE DES CELLULES iNKT

L'implication de cytokines produites par les cellules THP1-CD1d, est une hypothèse envisagée depuis longtemps au sein du laboratoire. Il est connu par la littérature que les cellules iNKT peuvent être activées de quatre façons différentes^{41,48,51} : 1) uniquement par une stimulation du TCR, 2) une stimulation du TCR combinée à la présence de cytokines, 3) uniquement par la présence de cytokines et 4) par stimulation des récepteurs NK (*Figure 5*). Ainsi, deux de ces quatre modes d'activation nécessitent la présence de cytokines soit de manière exclusive soit en complément à une faible stimulation du TCR des cellules iNKT^{41,48,51}. Initialement, il nous a donc semblé important de clarifier l'implication de cytokines produites par les CPAs dans la stimulation des cellules iNKT. Pour ce faire, nous avons réalisé une manipulation permettant de ne cultiver les cellules iNKT qu'en présence des surnageants de CPAs pré-traitées avec nos contrôles positifs (α -GalCer et thapsigargine), négatifs (RPMI, DMSO, BSA) et avec du C18:0. De cette manière, aucun contact cellulaire n'a lieu et l'activation éventuelle des cellules iNKT ne dépendrait que de facteurs solubles présents dans le surnageant de culture des cellules THP1-CD1d pré-traitées.

Les résultats de cette manipulation ont été très instructifs (**Figure 13**). Pour la première fois, la piste de cytokines activant seules les cellules iNKT peut être écartée. On aurait pu imaginer une réponse diminuée mais présente lors de la culture en présence de surnageants, mais il n'en est rien. Un faible signal persiste pour l' α -GalCer, mais en comparant avec la réponse obtenue lors de la coculture, celle-ci est négligeable car environ 200 fois plus faible que lors de la coculture (**Figure 13**). Il faut cependant souligner qu'on est uniquement capable de déduire que s'il y a des cytokines dans le milieu, elles ne sont pas capables d'activer seules les cellules iNKT. Il est néanmoins possible que des cytokines contenues dans les surnageants des macrophages THP1-CD1d pré-traités puissent exacerber l'induction des cellules iNKT lors de la coculture. Pour répondre à cette question, il faudrait déterminer s'il y a, dans le milieu, des cytokines capables d'intensifier l'activation des cellules iNKT lorsque celles-ci sont stimulées par un antigène lipidique de faible affinité. Ainsi, il serait utile de doser certaines cytokines dans nos surnageants. Plusieurs candidats seraient des cibles potentielles, notamment l'IL-12 et l'IL-18⁴¹. Néanmoins, lors d'un très fort signal l'association de l'IL-18 et de l'IL-12 est capable d'activer les cellules iNKT de manière TCR indépendante⁵². Il se pourrait tout de même qu'une de ces cytokines soit présente dans le milieu. Le dosage de l'IL-12 et de l'IL-18 pourrait donner des informations complémentaires sur le rôle des cytokines lors de l'activation des cellules iNKT par des CPAs stressées. L'IL-12 est un candidat particulièrement intéressant quand on fait le lien avec sa concentration accrue dans le sang des personnes obèses⁸¹. Comme l'IL-12 et le l'IL-18 sont des candidats intéressants, mais ne sont pas les seuls pouvant être impliqués, il serait également instructif de doser les cytokines présentes dans les échantillons par un dosage immunologique multiplex. Cette analyse permet le dosage de plusieurs cytokines différentes en même temps. Les surnageants de culture des macrophages THP1-CD1d pourraient également être mis en contact avec des cellules iNKT cocultivées avec des macrophages THP1-CD1d dans du RPMI. La coculture servirait ici à stimuler le contact cellule-cellule nécessaire à l'activation indirecte des cellules iNKT comme on l'a montré précédemment (paragraphe **4.2.1**). Cette manipulation pourrait permettre d'observer une activation des cellules iNKT par rapport à ce qui est observé lors d'une coculture de cellules iNKT et de macrophages THP1-CD1d dans du milieu.

Pour conclure, les résultats de la culture de cellules iNKT dans les surnageants de cellules THP1-CD1d traitées sont donc importants car ils prouvent qu'il existe au moins un autre mécanisme que les cytokines responsable de l'activation des cellules iNKT. Cette affirmation est valable pour tous les inducteurs de stress utilisés. Il est donc possible d'affirmer que l'activation indirecte des cellules iNKT nécessite au moins un contact cellulaire avec les CPAs.

La suite logique a été d'investiguer l'implication du CD1d. Le CD1d est une molécule capable de présenter des antigènes lipidiques qui sont reconnus par le TCR des cellules iNKT. Le CD1d se retrouve sur différents types cellulaires dont les CPAs et les adipocytes^{58,60,61}. L'implication du CD1d dans l'activation indirecte des cellules iNKT est une hypothèse particulièrement attrayante parce qu'elle a déjà été prouvée pour plusieurs conditions^{47,70}. En effet, il est connu que l' α -GalCer⁴⁷ est un anticorps lipidique présenté par le CD1d. Cela dit, l'implication du CD1d a également été montrée pour des inducteurs classiques du stress du RE comme la thapsigargine⁷⁰. Un premier indice de l'implication du CD1d est l'expression du TCR des cellules iNKT qui chute lors de l'activation de ces dernières. Cette diminution a été mise en évidence pour l' α -GalCer, la thapsigargine et pour le C18:0 par rapport à leur contrôle respectif (**Figure 14**).

Dans le but de confirmer l'implication du CD1d lors de l'induction des cellules iNKT par des cellules THP1-CD1d pré-traitées aux acides gras, des anticorps bloquant le CD1d ont été utilisés. L'activation des cellules iNKT suite à leur coculture avec des cellules THP1-CD1d traitées et en présence d'anticorps bloquant a été estimée par dosage d'IFN- γ et expression du marqueur CD25 et du TCR par cytométrie en flux (**Figure 15**). L'implication du CD1d dans l'activation des cellules iNKT responsable de la production de l'IFN- γ a pu être confirmée à la fois pour l' α -GalCer et pour la thapsigargine, ce qui était déjà connu dans la littérature. Cependant, pour les acides gras, le dosage de l'IFN- γ ne révèle pas de diminution significative, mais seulement une tendance à la diminution lors de l'utilisation d'anticorps bloquant (**Figure 15**). Il faut cependant remarquer que les écarts-types lors de l'usage d'acide gras sont considérablement plus importants par rapport aux autres inducteurs (**Figure 15**). Une répétition des expériences aurait pu permettre, peut-être, de réduire cet écart-type afin d'affirmer ou non l'implication du CD1d.

Par contre, lors de l'analyse des résultats obtenus par cytométrie en flux, les résultats d'expression du marqueur d'activation CD25 montrent que celui-ci s'accumule bien après la coculture avec les macrophages THP1-CD1d ayant subi les 3 types de traitements mais ses niveaux restent stables en présence de l'anticorps bloquant. L'expression du TCR des cellules iNKT, quant à lui, est très bien diminuée après la coculture avec les macrophages stimulés avec l' α -GalCer et remonte significativement en présence de l'anticorps bloquant confirmant que celui-ci est bien fonctionnel (**Figure 15**). Une augmentation de l'expression du TCR des cellules iNKT démontre que celui-ci est moins sollicité lors de la coculture. On est capable d'établir un lien entre le TCR des iNKT et le CD1d car le TCR est internalisé lorsqu'il est stimulé par la reconnaissance d'un antigène^{82,83}, tels que ceux présentés par le CD1d. Par contre, les profils d'expression du TCR après coculture avec les macrophages traités avec la thapsigargine et le C18:0 ne montrent pas de différence avec leur contrôle (DMSO et BSA) comme s'il n'y avait pas eu d'activation des cellules

iNKT via leur TCR dans ces expériences. Par conséquent, l'effet de l'anticorps bloquant est semblable sur les contrôles et les traitements comme si les traitements n'avaient pas augmenté la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d et l'activation du TCR des cellules iNKT. L'effet de l'anticorps bloquant observé s'expliquerait par l'inhibition de l'activation constitutive observée lorsque les THP1-CD1d et cellules iNKT sont co-cultivées sans traitement (**Figure 15**). Il serait néanmoins intéressant de confirmer ces résultats en utilisant des petits ARN interférents (siARNs) ciblant le CD1d. L'utilisation de siARNs ciblant le CD1d permettrait de limiter les effets « *off-target* » et, par conséquent, d'obtenir des résultats plus clairs.

Pour comprendre l'ampleur de la responsabilité du CD1d dans l'activation indirecte des cellules iNKT par les acides gras, il faudrait explorer la piste de l'up-régulation du CD1d dans l'obésité. Une des possibilités de l'activation des cellules iNKT via le CD1d par les CPAs est le fait que le CD1d soit surexprimé chez les CPAs des personnes obèses comparés à celles des personnes saines. L'augmentation de la présence du CD1d permettrait la présentation de davantage d'antigènes lipidiques ce qui favoriserait l'activation indirecte des cellules iNKT.

Cette perspective découle du fait que le laboratoire a observé une augmentation du CD1d sur les monocytes pro-inflammatoires des personnes obèses par rapport aux personnes saines (Wilkin *et al.*, manuscrit en préparation). De plus, l'expression du CD1d peut être up-régulée par plusieurs facteurs⁸⁴. Un lien a d'ailleurs été établi entre les lipides et l'expression du CD1d via l'activation du facteur de transcription « *peroxisome proliferator-activated receptor γ* » (PPAR γ)^{85,86}. En effet, il est connu dans la littérature que les acides gras à longues chaînes, comme le C18:0, sont des activateurs du PPAR γ ^{85,86}. Le PPAR γ agit sur l'expression du CD1d en activant la voie métabolique de l'acide rétinoïque. À son tour, l'acide rétinoïque active le récepteur d'acide rétinoïque (RAR) en s'y liant^{87,88}. Le RAR activé est capable d'induire la transactivation du promoteur du gène CD1D dans des CPAs^{86,87}. Il est tentant de penser qu'une augmentation de l'expression du CD1d sur des CPAs conduirait à une activation indirecte plus importante des cellules iNKT. L'intérêt d'étudier cette voie dans l'obésité repose sur le fait que les patients obèses sont souvent sujets à une dyslipidémie augmentant notamment le taux d'acide gras saturé dans le sang^{20,23}. L'homéostasie du rétinol et de l'acide rétinoïque est également perturbée dans le contexte de l'obésité⁸⁹. En prenant ces facteurs en compte, il serait utile d'explorer cette voie. Clarifier l'impact des acides gras sur le PPAR et sur le RAR ainsi que sur l'expression du CD1d permettrait peut-être d'obtenir des réponses sur l'activation chronique des cellules iNKT dans l'obésité. Il serait pertinent, par exemple, de mesurer l'expression du CD1d sur des MDM (« *monocytes-derived macrophages* ») suite à un ajout d'acide rétinoïque dans le milieu, afin d'observer une variation de l'expression du CD1d sur les CPAs. Il est par contre essentiel de ne pas travailler avec des cellules THP1-CD1d dans ce cas. En effet, ces

cellules ont été modifiées pour surexprimer le CD1d et donc celui-ci n'est plus sous le contrôle de son promoteur original mais bien dépendant d'un promoteur fort. Il est donc fort probable que les macrophages THP1-CD1d répondent différemment aux traitements par rapport aux macrophages THP1 ou aux MDM. En reproduisant ces expériences avec ces cellules, les conditions se rapprocheraient alors davantage de l'*ex vivo* que de travailler sur des cellules THP1-CD1d qui ont été modifiées afin de sur-exprimer le CD1d.

L'étude de l'expression du CD1d ainsi que de l'activation des cellules iNKT pourrait également être réalisée en ajoutant du plasma de personnes saines ou de personnes obèses sur des macrophages afin de voir si des différences sont observables. Wilkin *et al.* (manuscrit en préparation) a déjà effectué ces expériences en déposant le plasma sur des monocytes ou des macrophages THP1-CD1d et aucune différence n'a pu être mise en évidence. Il se pourrait que l'absence de variabilité entre les personnes saines et les personnes obèses soit liée à l'up-régulation transcriptionnelle du CD1d qui n'a pas pu être induite sur ces cellules. Une modulation légère du promoteur original du CD1d ne serait pas observable lorsque le CD1d est régulé par un promoteur fort comme c'est le cas chez les cellules THP1-CD1d.

Il serait cependant un peu aisé de penser que le CD1d puisse être le seul facteur influençant l'activation indirecte des cellules iNKT. Le décalage entre les résultats obtenus en analysant l'expression du CD25 versus ceux provenant de la sécrétion de cytokine et de l'expression du TCR, lors d'ajout d'anticorps bloquant le CD1d (*Figure 15*), pourrait s'expliquer par l'implication d'une autre voie que celle du CD1d dans l'activation des cellules iNKT. Il est effectivement plausible que les acides gras permettent l'activation des cellules iNKT par d'autres voies que celle impliquant le CD1d, par exemple des cytokines (mentionné précédemment), des récepteurs NK ou encore par un récepteur de type Toll⁵¹ (TLR). La piste impliquant les TLRs semble cependant peu probable étant donné que plusieurs équipes ont déterminé que les acides gras saturés (C16:0 et C18:0) ne sont pas des ligands des TLR2/4^{38,90}. Par contre, l'implication des récepteurs activateurs des cellules iNKT tel que le NKG2D reste une piste tout à fait pertinente⁹¹. Celui-ci pourrait initier l'activation des cellules iNKT après liaison d'un ligand de stress induit par les traitements avec la thapsigargine et le C18:0 sur les macrophages THP1-CD1d. Afin d'étudier sa responsabilité, l'utilisation d'un anticorps bloquant le NKG2D ou encore un siARN dirigé contre celui-ci semble deux méthodes adaptées.

Finalement, une vérification de la production d'autres cytokines pro- et anti-inflammatoires est nécessaire. Il est important de vérifier que le profil de sécrétion de l'IL-4 est similaire à celui de l'IFN- γ . Effectivement, une stimulation correcte impliquant le TCR donne lieu à la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Pour ce faire la cytokine IL-4 peut être dosée via un test ELISA. La

détection d'enzymes cytotoxiques telles que les granzymes et la perforine peut s'avérer pertinente si l'activation du NKG2D est impliquée.

5.2 PARTIE 2 : IMPLICATION DES VOIES D'IRE1 ET DE PERK DANS L'ACTIVATION INDIRECTE DES CELLULES iNKT

Suite à ces premières découvertes, la direction de ce travail a évolué pour se concentrer sur la recherche des mécanismes sur lesquels reposent la présentation des antigènes lipidiques par le CD1d en réponse aux traitements avec les acides gras saturés. Le laboratoire d'immunométabolisme et nutrition s'est intéressé aux voies de l'UPR dans le stress du RE suite à la publication quasi simultanée de deux équipes différentes traitant du stress du RE^{70,71}. Ces articles impliquent une ou deux voies du stress du RE dans l'activation des cellules iNKT suite à leur coculture avec des macrophages pré-traités par des inducteurs du stress du RE, et plus précisément la thapsigargine et la tunicamycine^{70,71}. La thapsigargine induit un stress du RE en perturbant l'homéostasie des ions calcium tandis que la tunicamycine influence le déroulement normal de la N-glycosylation des protéines^{30,31}. L'article publié par Bedard *et al.*⁷¹ démontre l'implication de la voie PERK uniquement alors que Govindarajan et son équipe⁷⁰ montre que deux voies seraient engagées : la voie PERK et la voie IRE1. Ces deux publications nous ont incités à étudier la responsabilité de ces deux voies dans l'activation des cellules iNKT suite à la coculture avec des macrophages pré-traités aux acides gras saturés. En effet, ceux-ci ont été démontrés capables d'induire un stress du RE ainsi que les voies PERK et IRE1 de l'UPR³⁸⁻⁴⁰.

Dans un premier temps, l'implication d'IRE1 a été investiguée. L'inhibiteur MKC-8866 a été utilisé afin d'inhiber l'épissage de *XPB1u* et bloquer la cascade de la voie IRE1. Les résultats ne permettent pas de tirer de conclusions définitives étant donné qu'il n'y a pas d'inhibition de l'activation des cellules iNKT de façon dose-dépendante (**Figure 16**). Cependant, une tendance à l'inhibition a pu être mesurée à une concentration de 5 μ M en MKC-8866 lorsque les macrophages ont été traités aux acides gras (**Figure 16**). Aucune cytotoxicité de l'inhibiteur aux concentrations utilisées n'a pu être mise en évidence (**Figure 16**). Pour obtenir des résultats plus contrastés, il serait important de réitérer l'expérience avec plusieurs mises au point. Il serait sans doute positif de changer les concentrations en inhibiteur afin de se rapprocher de la concentration 5 μ M qui a produit les meilleurs effets. Un deuxième ajustement pourrait être appliqué au niveau de la cinétique de manipulation. En s'intéressant à la réalisation de l'expérience que nous avons reproduit, il a été remarqué que les analyses effectuées sur les cellules iNKT et sur les surnageants se déroulent après 16 heures de coculture et non 24 heures comme ce que nous avons réalisé. Une coculture de 16 heures présente plusieurs avantages en plus de la facilité des analyses :

1. Cela permettrait de pouvoir exploiter les données de l'expression du marqueur CD69 ainsi que du CD25. Effectivement, le CD69 ne serait pas encore à son plateau d'expression suite à la stimulation tandis que l'expression suite à la stimulation du CD25 serait déjà engagée. Les différences entre les conditions devraient être visibles pour les deux marqueurs.
2. Une incubation plus courte des inhibiteurs permettrait de limiter leur cytotoxicité et de réduire l'effet « *off-target* ». Il est probable que les inhibiteurs aient des effets non spécifiques qui pourraient influencer indirectement la sécrétion des cytokines.
3. Le dosage des cytokines (IFN- γ et IL-4) laisserait potentiellement plus facilement apparaître des différences. En réalité, le pic de sécrétion de cytokines à 24 heures est déjà dépassé et il se pourrait que les différences induites par les inhibiteurs soient réduites et donc moins observables. En effet, à partir de 2 heures de coculture, la sécrétion d'IFN- γ est faible, mais déjà détectable⁴². En réalité, lors des premières heures de coculture, l'IL-4 serait principalement sécrétée⁴³ et à partir de 8h les cellules sécrètent alors majoritairement de l'IFN- γ ⁴³. 24 heures après la stimulation, la sécrétion d'IL-4 et d'IFN- γ diminue⁴³.

Une autre différence méthodologique existe entre les expériences exécutées dans le laboratoire d'immunométabolisme et nutrition et celles réalisées dans l'article de Govindarajan⁷⁰. L'écart réside dans le ratio de coculture entre les macrophages et les cellules iNKT. Il est cependant peu plausible que cette différence ait beaucoup d'impact sur les résultats compte tenu que Chloé Wilkin a pris soin d'évaluer différents ratios entre les macrophages et les cellules iNKT. Le ratio utilisé (3:1) est celui qui a fourni les résultats les plus prometteurs.

Ces différentes mises au point permettraient vraisemblablement de se mettre dans des conditions optimales afin d'observer un impact ou non de l'inhibiteur MKC-8866. Cela nous permettrait de confirmer ou de réfuter la responsabilité de la voie d'IRE1 dans l'activation indirecte des cellules iNKT suite à la coculture avec des macrophages traités aux acides gras. De plus, des résultats nous permettraient de s'aligner avec l'un ou l'autre des articles publiés au sujet de l'implication ou non de la voie de IRE1 dans le cas d'un traitement à la thapsigargine^{70,71}. Il serait cependant également utile d'investiguer l'implication de la voie de IRE1 en utilisant un siARN contre IRE1 afin de limiter les effets « *off-target* ». L'inhibiteur MKC-8866 a pourtant été privilégié par rapport à l'inhibiteur 4 μ 8C ayant un effet similaire grâce à sa capacité à avoir peu d'effets indésirables.

La deuxième voie qui a été analysée est la voie de PERK. Aucune conclusion n'a pu être tirée des différentes manipulations (*Figure 17* et *Figure 18*). En effet, bien que les résultats soient encourageants, les expériences avec l'inhibiteur GSK2606414 ou trans-ISRIB n'ont pu être réalisées qu'une fois chacune. Il est cependant intéressant de noter que les résultats d'inhibition de la voie

de PERK sont prometteurs (*Figure 17* et *Figure 18*). Le trans-ISRIB semble inhiber la totalité des protéines ATF4 (*Figure 17* et *Figure 18*). Par contre, l'inhibition de la phosphorylation d'eIF2 α et d'ATF4 avec le GSK2606414 n'est pas totale (*Figure 17*). Cela est sans doute dû à d'autres voies de phosphorylation que la voie de PERK (ex : HRI, PKR et GCN2). Il serait pertinent d'essayer des concentrations plus importantes en GSK2606414 pour la thapsigargine afin d'inhiber plus efficacement ATF4 (*Annexe 2*). La mise au point technique discutée plus haut mentionnant 16 heures de coculture devrait également être testée pour ces expériences.

Ces premiers résultats semblent en accord avec la publication de Bedard *et al.*⁷¹ qui met en évidence l'implication de la voie de PERK, mais pas celle d'IRE1 dans l'activation indirecte des cellules iNKT par des CPAs. Certaines manipulations supplémentaires permettraient sans doute d'éclaircir ces premiers résultats.

Pour l'ensemble de ce mémoire, les expériences ont été réalisées sur les cellules iNKT d'un seul donneur. Les résultats obtenus doivent ainsi être confirmés par des expériences sur deux donneurs supplémentaires. Néanmoins, les résultats présentés ici sont encourageants et constituent une base intéressante pour l'étude de l'impact des acides gras sur l'activation des cellules iNKT.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail permet plusieurs perspectives pour la suite des recherches dont certaines ont déjà été mentionnées précédemment. Il serait par exemple pertinent de faire des recherches comparant les personnes saines et les personnes obèses. Un autre axe serait d'analyser plus en détail le contenu du plasma des personnes obèses et de voir si celui-ci induit une activation des cellules iNKT lors de l'ajout du plasma sur des macrophages comme des MDM et non sur des THP1-CD1d. En effet, dans le cadre de ce mémoire, on s'est uniquement concentré sur les acides gras saturés sans prendre en compte l'impact d'autres facteurs qui sont présents dans le plasma. On peut prendre comme exemple les acides gras insaturés qui sont connus pour compenser l'effet des acides gras saturés². Il ne faut également pas négliger l'influence d'autres facteurs comme l'acide rétinoïque mentionné précédemment^{87,89}. Ces nouvelles informations ouvrent la porte vers de nouvelles possibilités de recherche.

Pour aller plus loin, il est également important de s'intéresser à ce qui a lieu dans les tissus adipeux et de ne pas se contenter d'étudier ce qui se déroule dans le sang. Chez un individu sain, les cellules iNKT des tissus adipeux produisent davantage d'IL-4 et d'IL-10 que d'IFN- γ ⁹². Cependant, il a été observé que la production de cytokines par les cellules iNKT lors de la présentation d'antigènes lipidiques par des adipocytes était influencée et modifiée par la présence de lipides dans le milieu⁶¹. La production d'IFN- γ était augmentée tandis que celle d'IL-4 et d'IL-10 diminuait⁶¹. Il serait important de mesurer la quantité d'IL-4 sécrétée dans les expériences qui ont

été réalisées afin de savoir si la proportion entre l'IFN- γ et l'IL-4 reste similaire dans le cas d'un traitement à la thapsigargine et aux acides gras.

En résumé, ce travail a permis de mettre en lumière la nécessité des contacts cellulaires entre les CPAs et les cellules iNKT pour l'activation de ces dernières dans notre contexte d'étude. Cette constatation a été permise par l'intermédiaire de la découverte que les milieux conditionnés des macrophages traités ne sont pas capables d'activer seuls les cellules iNKT dans notre configuration d'analyse. Ensuite, l'implication du CD1d dans l'activation indirecte des cellules iNKT lors d'un pré-traitement de macrophages à l' α -GalCer a été confirmée. Les résultats suite à un pré-traitement des macrophages à la thapsigargine et aux acides gras sont moins définitifs. Finalement, des résultats préliminaires ont été générés quant à l'implication des voies IRE1 et PERK dans l'activation indirecte des iNKT suite à une coculture avec des macrophages THP1-CD1d pré-traités aux acides gras. Ces premiers résultats, bien qu'informatifs, ne permettent pas de tirer de conclusions définitives sur l'implication de ces deux voies. Il reste ainsi du travail notamment pour confirmer les résultats obtenus mais aussi pour décrypter et comprendre les voies sous-jacentes impliquées dans l'activation des cellules iNKT dans l'obésité.

6 BIBLIOGRAPHIE

1. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2011 Nov [cited 2024 Aug 8];1811(11):637–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198111000916>
2. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE - A REVIEW. PART 1: CLASSIFICATION, DIETARY SOURCES AND BIOLOGICAL FUNCTIONS. *Biomed Pap* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2024 Jun 3];155(2):117–30. Available from: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2011.038.html>
3. Ko CW, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020 Mar [cited 2024 Aug 8];17(3):169–83. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41575-019-0250-7>
4. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2017 [cited 2024 Aug 8]. p. 1–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c170012>
5. Iqbal J, Walsh MT, Hammad SM, Hussain MM. Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2017 Jul [cited 2024 Aug 8];28(7):506–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276017300413>
6. Wu SA, Kersten S, Qi L. Lipoprotein Lipase and Its Regulators: An Unfolding Story. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2021 Jan [cited 2024 Aug 8];32(1):48–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104327602030223X>
7. Grabner GF, Xie H, Schweiger M, Zechner R. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nat Metab* [Internet]. 2021 Nov 19 [cited 2024 Aug 8];3(11):1445–65. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42255-021-00493-6>
8. He Q, Chen Y, Wang Z, He H, Yu P. Cellular Uptake, Metabolism and Sensing of Long-Chain Fatty Acids. *Front Biosci-Landmark* [Internet]. 2023 Jan 16 [cited 2024 Aug 8];28(1):10. Available from: <https://www.imrpess.com/journal/FBL/28/1/10.31083/j.fbl2801010>
9. Van Der Vusse GJ. Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metab Pharmacokinet* [Internet]. 2009 [cited 2024 Aug 8];24(4):300–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1347436715301154>
10. Ryan DG, O'Neill LAJ. Krebs Cycle Reborn in Macrophage Immunometabolism. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2020 Apr 26 [cited 2024 Aug 8];38(1):289–313. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-081619-104850>
11. Rosenthal MD, Glew RH. *Medical biochemistry: human metabolism in health and disease*. Hoboken: J. Wiley; 2009.
12. Hao JW, Wang J, Guo H, Zhao YY, Sun HH, Li YF, et al. CD36 facilitates fatty acid uptake by dynamic palmitoylation-regulated endocytosis. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Sep 21 [cited 2024 Aug 8];11(1):4765. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18565-8>

13. Jay AG, Hamilton JA. The enigmatic membrane fatty acid transporter CD36: New insights into fatty acid binding and their effects on uptake of oxidized LDL. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* [Internet]. 2018 Nov [cited 2024 Aug 8];138:64–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327816300291>
14. Pohl J, Ring A, Herrmann T, Stremmel W. New concepts of cellular fatty acid uptake: role of fatty acid transport proteins and of caveolae. *Proc Nutr Soc* [Internet]. 2004 May [cited 2024 Aug 8];63(2):259–62. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665104000333/type/journal_article
15. Kleinfeld AM. Lipid Phase Fatty Acid Flip-Flop, Is It Fast Enough for Cellular Transport? *J Membr Biol* [Internet]. 2000 May [cited 2024 Aug 8];175(2):79–86. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002320001056>
16. WHO European Regional Obesity: Report 2022. Copenhagen: World Health Organization, Regional Office for Europe; 2022.
17. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 May 13 [cited 2024 Aug 9];20(9):2358. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2358>
18. Jin X, Qiu T, Li L, Yu R, Chen X, Li C, et al. Pathophysiology of obesity and its associated diseases. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2023 Jun [cited 2024 Aug 9];13(6):2403–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383523000126>
19. Clemente-Suárez VJ, Redondo-Flórez L, Beltrán-Velasco AI, Martín-Rodríguez A, Martínez-Guardado I, Navarro-Jiménez E, et al. The Role of Adipokines in Health and Disease. *Biomedicines* [Internet]. 2023 Apr 27 [cited 2024 Jul 7];11(5):1290. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/5/1290>
20. Klop B, Elte J, Cabezas M. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* [Internet]. 2013 Apr 12 [cited 2024 May 21];5(4):1218–40. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/4/1218>
21. Nussbaumerova B, Rosolova H. Obesity and Dyslipidemia. *Curr Atheroscler Rep* [Internet]. 2023 Dec [cited 2024 Jun 16];25(12):947–55. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11883-023-01167-2>
22. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism* [Internet]. 2019 Mar [cited 2024 Jun 16];92:71–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049518302440>
23. Hierons SJ, Abbas K, Sobczak AIS, Cerone M, Smith TK, Ajjan RA, et al. Changes in plasma free fatty acids in obese patients before and after bariatric surgery highlight alterations in lipid metabolism. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Sep 12 [cited 2024 Jun 16];12(1):15337. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-19657-9>
24. Zhao J, Wu Y, Rong X, Zheng C, Guo J. Anti-Lipolysis Induced by Insulin in Diverse Pathophysiologic Conditions of Adipose Tissue. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther* [Internet]. 2020 May [cited 2024 Aug 10];Volume 13:1575–85. Available from: <https://www.dovepress.com/anti-lipolysis-induced-by-insulin-in-diverse-pathophysiologic-conditio-peer-reviewed-article-DMSO>

25. Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Ragni M, Nisoli E. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord - Stud Anorex Bulim Obes* [Internet]. 2018 Apr [cited 2024 Jul 2];23(2):149–57. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40519-018-0481-6>
26. Lottenberg AM, Afonso MDS, Lavrador MSF, Machado RM, Nakandakare ER. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2012 Sep [cited 2024 Aug 10];23(9):1027–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286312000605>
27. Bi X, Yeo PLQ, Loo YT, Henry CJ. Associations between circulating fatty acid levels and metabolic risk factors. *J Nutr Intermed Metab* [Internet]. 2019 Mar [cited 2024 Aug 10];15:65–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235238591830094X>
28. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *J Parenter Enter Nutr* [Internet]. 2015 Sep [cited 2024 Aug 10];39(1S). Available from: <https://aspenjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1177/0148607115595980>
29. Di Conza G, Ho PC. ER Stress Responses: An Emerging Modulator for Innate Immunity. *Cells* [Internet]. 2020 Mar 12 [cited 2024 Aug 10];9(3):695. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/3/695>
30. So JS. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells*. 2018 Aug 31;41(8):705–16.
31. Read A, Schröder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology* [Internet]. 2021 Apr 29 [cited 2024 Apr 23];10(5):384. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/5/384>
32. Celik C, Lee SYT, Yap WS, Thibault G. Endoplasmic reticulum stress and lipids in health and diseases. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2023 Jan [cited 2024 Aug 11];89:101198. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782722000534>
33. Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem* [Internet]. 2019 Feb [cited 2024 Apr 23];294(6):2098–108. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002192582036854X>
34. Zyryanova AF, Kashiwagi K, Rato C, Harding HP, Crespillo-Casado A, Perera LA, et al. ISRIB Blunts the Integrated Stress Response by Allosterically Antagonising the Inhibitory Effect of Phosphorylated eIF2 on eIF2B. *Mol Cell*. 2021 Jan 7;81(1):88-103.e6.
35. Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, et al. Discovery of 7-Methyl-5-(1-((3-(trifluoromethyl)phenyl)acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a Potent and Selective First-in-Class Inhibitor of Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK). *J Med Chem* [Internet]. 2012 Aug 23;55(16):7193–207. Available from: <https://doi.org/10.1021/jm300713s>
36. Moncan M, Mnich K, Blomme A, Almanza A, Samali A, Gorman AM. Regulation of lipid metabolism by the unfolded protein response. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2021 Feb [cited 2024 Apr 23];25(3):1359–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.16255>
37. Volkmann K, Lucas JL, Vuga D, Wang X, Brumm D, Stiles C, et al. Potent and Selective Inhibitors of the Inositol-requiring Enzyme 1 Endoribonuclease. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Apr [cited

2024 Aug 11];286(14):12743–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820516505>

38. Anderson EK, Hill AA, Hasty AH. Stearic Acid Accumulation in Macrophages Induces Toll-Like Receptor 4/2-Independent Inflammation Leading to Endoplasmic Reticulum Stress–Mediated Apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2024 Jun 16];32(7):1687–95. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.112.250142>
39. 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* [Internet]. 2013 Mar 19 [cited 2024 May 26];110(12):4628–33. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1217611110>
40. Iovino M, Colonval M, Wilkin C, L’homme L, Lassence C, Campas M, et al. Novel XBP1s-independent function of IRE1 RNase in HIF-1 α -mediated glycolysis upregulation in human macrophages upon stimulation with LPS or saturated fatty acid. *Front Immunol*. 2023;14:1204126.
41. Wilkin C, Piette J, Legrand-Poels S. Unravelling metabolic factors impacting iNKT cell biology in obesity. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2024 Jul [cited 2024 Aug 11];116:436. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295224004192>
42. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the ‘Swiss-Army knife’ of the immune system. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2024 Aug 11];20(3):358–68. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791508000435>
43. Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2011 Jan [cited 2024 Jun 18];343(1):43–55. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-010-1023-3>
44. Rossjohn J, Pellicci DG, Patel O, Gapin L, Godfrey DI. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012 Dec [cited 2024 Jun 12];12(12):845–57. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3328>
45. Nishioka Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. CD1d-Restricted Type II NKT Cells Reactive With Endogenous Hydrophobic Peptides. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Mar 15 [cited 2024 Jul 10];9:548. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00548/full>
46. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Taura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of V α 14 NKT Cells by Glycosylceramides. *Science* [Internet]. 1997 Nov 28 [cited 2024 Jun 12];278(5343):1626–9. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.278.5343.1626>
47. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2024 Jun 12];7(12):929–41. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri2191>
48. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2024 Jul 5];13(2):101–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3369>
49. Look A, Burns D, Tews I, Roghanian A, Mansour S. Towards a better understanding of human iNKT cell subpopulations for improved clinical outcomes. *Front Immunol* [Internet]. 2023 Apr

- 19 [cited 2024 Aug 11];14:1176724. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1176724/full>
50. Hus I, Bojarska-Junak A, Kamińska M, Dobrzyńska-Rutkowska A, Szatan K, Szymczyk A, et al. Imbalance in circulatory iNKT, Th17 and T regulatory cell frequencies in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Oncol Lett*. 2017 Dec;14(6):7957–64.
51. Reilly EC, Wands JR, Brossay L. Cytokine dependent and independent iNKT cell activation. *Cytokine* [Internet]. 2010 Sep [cited 2024 Aug 11];51(3):227–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466610001262>
52. Leite-de-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, Machavoine F, Koezuka Y, Schneider E, et al. A Distinct IL-18-Induced Pathway to Fully Activate NK T Lymphocytes Independently from TCR Engagement. *J Immunol* [Internet]. 1999 Dec 1 [cited 2024 Jun 18];163(11):5871–6. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/163/11/5871/44133/A-Distinct-IL-18-Induced-Pathway-to-Fully-Activate>
53. Nair S, Dhodapkar MV. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Sep 22 [cited 2024 Jul 10];8:1178. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01178/full>
54. Wu L, Kaer L. Natural Killer T Cells and Autoimmune Disease. *Curr Mol Med* [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2024 Aug 12];9(1):4–14. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1566-5240&volume=9&issue=1&spage=4>
55. Zhang Q. Immunology of tuberculosis. *World J Exp Med* [Internet]. 2012 [cited 2024 Jul 10];2(4):70. Available from: <http://www.wjnet.com/2220-315X/full/v2/i4/70.htm>
56. Tognarelli EI, Gutiérrez-Vera C, Palacios PA, Pasten-Ferrada IA, Aguirre-Muñoz F, Cornejo DA, et al. Natural Killer T Cell Diversity and Immunotherapy. *Cancers* [Internet]. 2023 Dec 7 [cited 2024 Apr 4];15(24):5737. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/24/5737>
57. Kiriakidou M, Ching CL. Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Intern Med* [Internet]. 2020 Jun 2 [cited 2024 Aug 12];172(11):ITC81–96. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/AITC202006020>
58. Morris I, Croes CA, Boes M, Kalkhoven E. Advanced omics techniques shed light on CD1d-mediated lipid antigen presentation to iNKT cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2023 May [cited 2024 Jun 13];1868(5):159292. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198123000161>
59. McEwen-Smith RM, Salio M, Cerundolo V. CD1d-dependent endogenous and exogenous lipid antigen presentation. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2015 Jun [cited 2024 Aug 12];34:116–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791515000448>
60. Peng W, Martaresche C, Escande-Beillard N, Cedile O, Reynier-Vigouroux A, Boucraut J. Influence of lipid rafts on CD1d presentation by dendritic cells. *Mol Membr Biol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2024 Aug 12];24(5–6):475–84. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09687680701359408>
61. Van Eijkeren RJ, Morris I, Borgman A, Markovska A, Kalkhoven E. Cytokine Output of Adipocyte-iNKT Cell Interplay Is Skewed by a Lipid-Rich Microenvironment. *Front Endocrinol* [Internet].

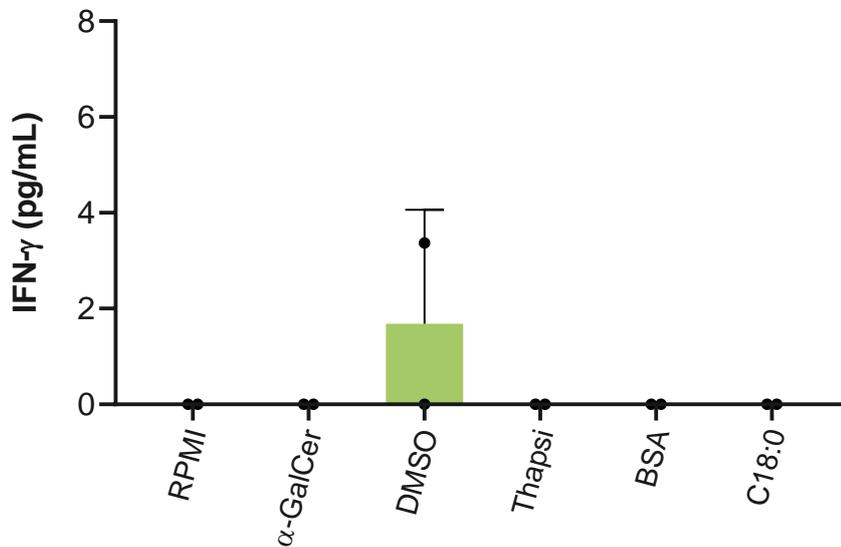
2020 Jul 31 [cited 2024 Aug 12];11:479. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2020.00479/full>

62. Cruz MS, Loureiro JP, Oliveira MJ, Macedo MF. The iNKT Cell–Macrophage Axis in Homeostasis and Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jan 31 [cited 2024 Aug 12];23(3):1640. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1640>
63. Leite-De-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, Machavoine F, Koezuka Y, Schneider E, et al. A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Dec 1;163(11):5871–6.
64. Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, Toxavidis V, et al. Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder through Regulatory Cytokine Production. *Immunity* [Internet]. 2012 Sep [cited 2024 Aug 12];37(3):574–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761312003792>
65. Wang XL, Chang XY, Tang XX, Chen ZG, Zhou T, Sun K. Peripheral invariant natural killer T cell deficiency in metabolically unhealthy but normal weight versus metabolically healthy but obese individuals. *J Int Med Res* [Internet]. 2016 Dec [cited 2024 Aug 12];44(6):1272–82. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300060516663778>
66. Ververs FA, Engelen SE, Nuboer R, Vastert B, Van Der Ent CK, Van’T Land B, et al. Immunometabolic factors in adolescent chronic disease are associated with Th1 skewing of invariant Natural Killer T cells. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Oct 11 [cited 2024 Aug 12];11(1):20082. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-99580-7>
67. López S, García-Serrano S, Gutierrez-Repiso C, Rodríguez-Pacheco F, Ho-Plagaró A, Santiago-Fernández C, et al. Tissue-Specific Phenotype and Activation of iNKT Cells in Morbidly Obese Subjects: Interaction with Adipocytes and Effect of Bariatric Surgery. *Obes Surg* [Internet]. 2018 Sep [cited 2024 Aug 12];28(9):2774–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11695-018-3215-y>
68. Li Y, Woods K, Parry-Strong A, Anderson RJ, Capistrano C, Gestin A, et al. Distinct Dysfunctional States of Circulating Innate-Like T Cells in Metabolic Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Mar 13 [cited 2024 Aug 12];11:448. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00448/full>
69. Lynch L. Adipose invariant natural killer T cells. *Immunology* [Internet]. 2014 Jul [cited 2024 Aug 12];142(3):337–46. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.12269>
70. Govindarajan S, Verheugen E, Venken K, Gaublumme D, Maelegheer M, Cloots E, et al. ER stress in antigen-presenting cells promotes NKT cell activation through endogenous neutral lipids. *EMBO Rep* [Internet]. 2020 Jun 4 [cited 2024 May 14];21(6):e48927. Available from: <https://www.embopress.org/doi/10.15252/embr.201948927>
71. Bedard M, Shrestha D, Priestman DA, Wang Y, Schneider F, Matute JD, et al. Sterile activation of invariant natural killer T cells by ER-stressed antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2019 Nov 19 [cited 2024 May 14];116(47):23671–81. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1910097116>
72. L’homme L, Sermikli B, 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* [Internet]. 2020 Dec 8 [cited 2024 Aug 18];12(12):3771. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/12/3771>

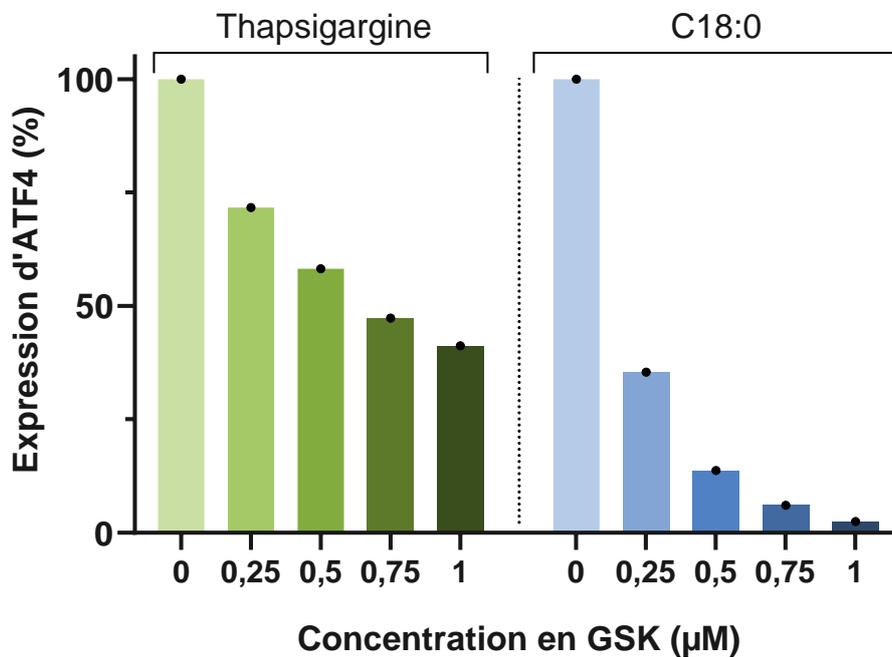
73. Gianfrancesco MA, Dehairs J, L'homme L, Herinckx G, Esser N, Jansen O, et al. Saturated fatty acids induce NLRP3 activation in human macrophages through K⁺ efflux resulting from phospholipid saturation and Na, K-ATPase disruption. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2019 Jul [cited 2024 Aug 18];1864(7):1017–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198119300484>
74. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2024 Apr 23];23(1):37–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576914003166>
75. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Markossian S, Grossman A, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [cited 2024 Apr 22]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
76. Podgórski R, Wojasiński M, Ciach T. Nanofibrous materials affect the reaction of cytotoxicity assays. *Sci Rep* [Internet]. 2022 May 31 [cited 2024 Aug 18];12(1):9047. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-13002-w>
77. 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* [Internet]. 2004 Oct [cited 2024 Aug 14];293(1–2):127–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175904002571>
78. Peng Y, Tao Y, Zhang Y, Wang J, Yang J, Wang Y. CD25: A potential tumor therapeutic target. *Int J Cancer*. 2023 Apr 1;152(7):1290–303.
79. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017 Jun;47(6):946–53.
80. Haluck-Kangas A, Peter ME. CD95/Fas ligand induced toxicity. *Biochem Soc Trans*. 2023 Feb 27;51(1):21–9.
81. Suárez-Álvarez K, Solís-Lozano L, Leon-Cabrera S, González-Chávez A, Gómez-Hernández G, Quiñones-Álvarez MS, et al. Serum IL-12 Is Increased in Mexican Obese Subjects and Associated with Low-Grade Inflammation and Obesity-Related Parameters. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 [cited 2024 Aug 14];2013:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2013/967067/>
82. Valitutti S, Müller S, Salio M, Lanzavecchia A. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med*. 1997 May 19;185(10):1859–64.
83. Alcover A, Alarcón B. Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol*. 2000;20(4):325–46.
84. Balreira A, Cavallari M, Miranda MCS, Arosa FA. Uncoupling between CD1d upregulation induced by retinoic acid and conduritol-B-epoxide and iNKT cell responsiveness. *Immunobiology* [Internet]. 2010 Jun [cited 2024 Aug 14];215(6):505–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298509001302>

85. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2014 Jan [cited 2024 Aug 18];53:124–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782713000696>
86. Leslie DS, Dascher CC, Cembrola K, Townes MA, Hava DL, Hugendubler LC, et al. Serum lipids regulate dendritic cell CD1 expression and function. *Immunology* [Internet]. 2008 Nov [cited 2024 Aug 18];125(3):289–301. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2567.2008.02842.x>
87. Allan LL, Stax AM, Zheng DJ, Chung BK, Kozak FK, Tan R, et al. CD1d and CD1c Expression in Human B Cells Is Regulated by Activation and Retinoic Acid Receptor Signaling. *J Immunol* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2024 Aug 14];186(9):5261–72. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/186/9/5261/85050/CD1d-and-CD1c-Expression-in-Human-B-Cells-Is>
88. Szatmari I, Pap A, Rühl R, Ma JX, Illarionov PA, Besra GS, et al. PPAR γ controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med* [Internet]. 2006 Oct 2 [cited 2024 Aug 18];203(10):2351–62. Available from: <https://rupress.org/jem/article/203/10/2351/46306/PPAR-controls-CD1d-expression-by-turning-on>
89. Olsen T, Blomhoff R. Retinol, Retinoic Acid, and Retinol-Binding Protein 4 are Differentially Associated with Cardiovascular Disease, Type 2 Diabetes, and Obesity: An Overview of Human Studies. *Adv Nutr* [Internet]. 2020 May [cited 2024 Aug 14];11(3):644–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2161831322002903>
90. Erridge C, Samani NJ. Saturated Fatty Acids Do Not Directly Stimulate Toll-Like Receptor Signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2024 Aug 13];29(11):1944–9. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.109.194050>
91. Kuylenstierna C, Björkström NK, Andersson SK, Sahlström P, Bosnjak L, Paquin-Proulx D, et al. 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.
92. LaMarche NM, Kane H, Kohlgruber AC, Dong H, Lynch L, Brenner MB. Distinct iNKT Cell Populations Use IFN γ or ER Stress-Induced IL-10 to Control Adipose Tissue Homeostasis. *Cell Metab* [Internet]. 2020 Aug [cited 2024 Aug 18];32(2):243–258.e6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413120302564>

7 ANNEXES



Annexe 1 : Production d'IFN- γ par les cellules THP1-CD1d suite à 8h de traitement à l' α -GalCer (100 ng/mL), à la thapsigargine (50 nM), au C18:0 (200 μ M) ou leur contrôle respectif. Les données sont représentées sous forme de la moyenne \pm SD. N=2. Thapsi : Thapsigargine.



Annexe 2 : Impact de l'inhibiteur GSK2606414 sur le potentiel activant des macrophages THP1-CD1d traités avec la thapsigargine ou le C18:0. Les cellules THP1-CD1d ont été pré-traitées (1h) avec l'inhibiteur GSK2606414 (0,25-1 μ M) ou le véhicule (DMSO) avant l'ajout pendant 8h de la thapsigargine (100 nM, du C18:0 (200 μ M) ou leur contrôle respectif (DMSO et BSA). Quantification des western blot pour (ATF4/HSP90) N=1. Les données sont représentées sous forme de la moyenne.

Activation stérile des cellules T non-conventionnelles, *invariant Natural Killer T-cells* (iNKT), par des macrophages cultivés dans un milieu enrichi en lipides

Les lipides et particulièrement les acides gras sont des macromolécules essentielles au développement et à l'homéostasie d'un individu. Leur intérêt en recherche n'a pas cessé de croître. Une des raisons de cet engouement réside notamment dans le rôle primordial qu'ils jouent dans la régulation de nombreuses voies métaboliques. Un sujet d'étude important lie les acides gras et l'obésité. Effectivement, l'obésité est connue pour induire chez près de 70% des personnes obèses une dyslipidémie modifiant notamment le taux d'acides gras libres dans le sang et les tissus. L'environnement riche en lipides issu de l'obésité a pour conséquence de perturber certaines cellules immunes comme les « *invariant Natural Killer T-cells* » (iNKT). Celles-ci sont des cellules T non-conventionnelles qui ont la particularité de reconnaître via leur TCR des antigènes lipidiques présentés par le CD1d sur des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette activation conduit à la libération rapide de quantités importantes de cytokines. Elles jouent un rôle aussi bien dans l'homéostasie de certains tissus que dans l'immuno-surveillance d'infections microbiennes et de tumeurs. Mon laboratoire d'accueil a démontré une hausse de l'apoptose des cellules iNKT du sang périphérique chez les patients obèses. Les cellules iNKT restantes ont un profil activé et montrant une diminution de l'expression de leur TCR suggérant qu'elles sont chroniquement activées par la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d de CPAs. Ces résultats nous permettent de penser qu'il existe un lien entre l'augmentation du taux de lipides dans le sang des patients obèses et l'activation chronique ainsi que la mort des cellules iNKT chez ces personnes.

Les objectifs ont été de confirmer que les macrophages traités avec les acides gras saturés leur confèrent la capacité d'activer les cellules iNKT et d'entamer une étude des mécanismes sous-jacents. Nous avons d'abord confirmé l'activation des cellules iNKT après leur coculture avec des macrophages traités par une augmentation de la production d'IFN- γ dans les milieux de coculture et de l'expression du marqueur d'activation CD25 ainsi qu'une diminution de la présence du TCR à la membrane. La suite a été de déterminer l'importance du CD1d et l'implication de deux voies de la réponse au stress du réticulum endoplasmique au sein des macrophages traités dans l'activation indirecte des cellules iNKT.

L'absence d'activation des cellules iNKT cultivées dans les milieux conditionnés des macrophages traités nous a permis de valider que les contacts cellulaires entre macrophages et cellules iNKT sont essentiels à l'activation de ces dernières, éliminant la possibilité que leur action ne dépende que de facteurs solubles comme des cytokines. L'utilisation d'anticorps bloquant le CD1d nous a permis de suggérer que le CD1d participe à cette activation en présentant des antigènes lipidiques aux cellules iNKT. Finalement, des résultats préliminaires utilisant des inhibiteurs d'IRE1 et de PERK ont été générés permettant de penser que la voie d'IRE1 ne serait pas impliquée dans l'activation indirecte des cellules iNKT par des macrophages traités aux acides gras saturés tandis que la voie de PERK le serait.