

---

## Étude de l'activation stérile des cellules invariant Natural Killer T (iNKT) après co-culture avec des monocytes cultivés dans un milieu enrichi en lipides

**Auteur :** Parla, Wiktorja

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

**Faculté :** Faculté des Sciences

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

**Année académique :** 2024-2025

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/22941>

---

### *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

---

**Étude de l'activation stérile des cellules *invariant Natural Killer T* (iNKT) après co-culture avec des monocytes cultivés dans un milieu enrichi en lipides.**

---

**Wiktoria Parla**

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

**Promotrice : Sylvie Legrand**

Laboratoire d'immuno-métabolisme et nutrition

Année académique 2024 - 2025

# Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire. Je leur suis sincèrement reconnaissante.

Tout d'abord, je souhaite remercier grandement ma promotrice, Sylvie Legrand, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci pour sa disponibilité, ses nombreux conseils, sa bienveillance et sa relecture attentive de ce mémoire. C'était un plaisir de pouvoir évoluer à ses côtés dans ce cadre stimulant pendant ces quelques mois.

J'adresse ensuite mes remerciements à mon encadrante, Marion Bruneteaux, qui m'a accompagnée du début à la fin avec une patience et bienveillance remarquables. Travailler à ses côtés a été une expérience particulièrement enrichissante, au cours de laquelle j'ai énormément appris. Sa rigueur, son écoute et sa pédagogie m'ont inspirée au quotidien. Je lui suis profondément reconnaissante pour tout ce qu'elle m'a transmis et pour le précieux temps qu'elle m'a accordé, notamment dans la relecture de ce mémoire. Je lui souhaite sincèrement tout le meilleur pour la suite de son parcours.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres des laboratoires de virologie et d'immunologie pour leur accueil, leur gentillesse et leurs conseils. Une pensée particulière à Cédric Lassence pour ses conseils et son aide précieuse. Mes remerciements vont également à Lola Langhendries, qui n'a pas hésité à m'apporter son aide lorsque j'en avais besoin et dont les remarques m'ont été précieuses lors de la relecture de ce mémoire. Je pense aussi à Clément de la Myre, Victoire Mouton, Manon Koumoth, Florine Pitti et Maxime Dubois et à tous les doctorants et techniciens du GIGA que j'ai eu la chance de côtoyer.

Une mention spéciale aux mémorants avec qui j'ai partagé cette expérience à savoir Noa Huc, Sophie Dantinne, Sacha Dumez et Christophe Vigneaux, et à tous ceux dans les autres laboratoires. Merci pour les échanges, l'entraide et le soutien mutuel durant ces quelques mois.

Enfin, je remercie mes proches, ma famille et mes amis, pour leur soutien tout au long de mes études. Un immense merci à mes parents pour leurs encouragements et leur soutien inconditionnel. Et pour toutes ces fois où je finissais tard, je remercie sincèrement mon frère David, qui n'hésitait pas à se déplacer pour m'éviter les longs trajets. Je remercie aussi mon petit frère, Mattéo, encore trop jeune pour comprendre mes longues heures de travail, mais qui, à sa manière, m'a soutenue par ses nombreux encouragements.

# Table des matières

<b>1. Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Obésité .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Définition et généralités .....	1
1.1.2 Indice de masse corporelle .....	1
1.1.3 Obésité et immuno-déficience .....	2
1.1.4 Obésité et stress du réticulum endoplasmique .....	3
1.1.5 Obésité et dyslipidémie .....	3
1.1.6 Obésité et lipolyse.....	4
<b>1.2 Les lipides .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Les acides gras libres.....	5
1.2.2 Les lipoprotéines .....	7
<b>1.3 Les cellules <i>Natural Killer T</i> invariantes (iNKT) .....</b>	<b>12</b>
1.3.1 CD1d et antigènes lipidiques .....	12
1.3.2 Mode d'activation des cellules iNKT.....	17
1.3.3 Rôles des cellules iNKT dans l'immunité.....	19
1.3.4 Les cellules iNKT dans l'obésité. ....	20
<b>2. Objectif du mémoire .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Matériel et méthodes .....</b>	<b>23</b>
3.1 Solutions.....	23
3.2 Culture des monocytes THP-1 et macrophages THP1-PMA.....	26
3.3 Isolation des PBMCs .....	26
3.4 Préparation des MDMs ( <i>monocyte-derived macrophages</i> ).....	26
3.5 Isolation des monocytes par sélection négative .....	27
3.5.1 Pureté des monocytes .....	27
3.6 Resting des cellules iNKT.....	28
3.7 Traitement des cellules co-cultivées avec des cellules iNKT .....	29
3.7.1 Traitements aux acides gras.....	29
3.7.2 Traitement aux ox-LDLs.....	29
3.8 Test de viabilité .....	29
3.9 Cytométrie en flux.....	30
3.9.1 Compensation .....	30
3.9.2 Titration des anticorps .....	31
3.9.3 FMO .....	32
3.9.4 Les panels .....	32
3.9.5 Marquage des cellules pour la cytométrie.....	34
3.10 Western Blot .....	35
3.10.1 Lyse des cellules .....	35

3.10.2	Dosage protéique .....	35
3.10.3	Migration .....	35
3.10.4	Transfert sur la membrane.....	35
3.10.5	Saturation au lait de la membrane .....	36
3.10.6	Marquage aux anticorps .....	36
3.10.7	Révélation.....	36
3.11	Test ELISA .....	36
3.12	RT-qPCR sur monocytes primaires .....	37
3.12.1	Extraction de l'ARN .....	37
3.12.2	Transcription inverse (RT) de l'ARN en ADNc .....	38
3.12.3	PCR quantitative .....	38
3.13	Analyses statistiques .....	38
<b>4.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>39</b>
4.1	Résultats préliminaires du laboratoire.....	39
4.2	Effet des acides gras libres sur la capacité des monocytes/macrophages d'activer les cellules iNKT.....	41
4.2.1	Les macrophages THP1+PMA et MDMs .....	41
4.2.2	Les monocytes THP1 et monocytes primaires .....	43
4.3	Impact des traitements de monocytes primaires avec des concentrations croissantes en C18:0 et C18:1 sur l'expression du CD1d et l'activation des cellules iNKT .....	46
4.4	Les acides gras insaturés inhibent l'effet négatif des acides gras saturés .....	49
4.4.1	Effet d'un traitement combiné C18:0+C18:1 des monocytes sur l'activation des cellules iNKT ..	49
4.4.2	Effet des différents traitements avec C18:0 et/ou C18:1 des monocytes sur l'expression du CD1d	52
4.5	Effet des ox-LDLs sur la capacité des monocytes primaires d'activer les cellules iNKT ....	53
4.5.1	Le traitement des monocytes aux ox-LDLs module l'expression du CD1d .....	56
<b>5.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>Références.....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>74</b>

## Abréviations

$\alpha$ GC =  $\alpha$ -galactosylcéramide

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm = Acide ribonucléique messenger

APC = Cellule présentatrice d'antigène

Apo = Apolipoprotéines

ATF4 = *Activating transcription factor 6*

ATP = Adénosine triphosphate

B<sub>2</sub>M =  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobuline

CD = *Cluster differentiation*

CM = Chylomicrons

DC = Cellule dendritique

DNTP = Désoxynucléotides triphosphates

DXA = Absorptiométrie biphotonique à rayon X.

FACS = Cytométrie en flux

FFA = *Free fatty acids*

FSC = *Forward scatter*

HDL = Lipoprotéines de haute densité

HFD = *High fat diet*

IL = Interleukine

IMC = Indice de masse corporelle

INF $\gamma$  = Interféron gamma

iNKT = Cellules invariantes « *Natural Killer* » T

IRE1 = *Inositol Requiring Enzyme 1*

LDL = Lipoprotéines de faible densité

LDL-ox = Lipoprotéines de faible densité oxydée

LDLR = Récepteur aux lipoprotéines de faible densité

LP = Lipase pancréatique

LPL = Lipoprotéine lipase

MICA/B = *MHC class I polypeptide-related sequence A/B*

NCM = Monocytes non classiques

NK = Cellules « *Natural Killer* »

NKG2D = *Natural Killer Group 2 member D*

PCR = Réaction de polymérisation en chaîne

PERK = Protein Kinase R-like ER kinase

PPAR $\gamma$  = Récepteur gamma activé par les proliférateurs des peroxysomes

PRR = *Pattern Recognition Receptors*

ROS = Espèces réactives de l'oxygène

RXR = *Retinoid X receptor*

SSC = *Side scatter*

SFA = *Saturated fatty acids*

THP1 = Monocytes THP1

TR 4X = Tampon de chargement 4X

TCR = Récepteur des lymphocytes T

TG = Triglycérides

UFA = *Unsaturated fatty acid*

UPR = *Unfolded protein response*

VLDL = Lipoprotéines de très faible densité

vNKT = Cellules variantes « *Natural Killer* » T

XBP1 = *X-Box binding protein 1*

XBP1u = *Unspliced X-Box binding protein 1*

XBP1s = *Spliced X-Box binding protein 1*

# 1. Introduction

## 1.1 Obésité

### 1.1.1 Définition et généralités

L'Organisation Mondiale de la Santé définit l'obésité comme une maladie chronique complexe, résultant d'une accumulation excessive de masse grasse. En 2021, à l'échelle mondiale, plus de deux milliards d'adultes étaient en surpoids ou obèses, avec un pic autour de 50 ans<sup>1</sup>. L'obésité infantile touche 38 millions d'enfants de moins de cinq ans et persiste souvent à l'âge adulte<sup>1</sup>. En Belgique, la prévalence a fortement augmenté ces trente dernières années, atteignant 16% des adultes belges en 2018, contre près de 6% de jeunes âgés de 2 à 17 ans<sup>2</sup>, et ne cesse de croître<sup>1</sup>. L'obésité résulte d'un déséquilibre entre l'apport calorique et les dépenses énergétiques, aggravé par un mode de vie sédentaire et des facteurs psychologiques, tels que le stress ou la dépression, et médicaux. L'obésité induit une inflammation chronique de bas grade mais également un stress oxydatif, contribuant au développement de comorbidités. Parmi les plus courantes, on retrouve le diabète de type II, des maladies cardiovasculaires, de l'hypertension, des cancers ou encore une perte de l'immuno-surveillance, altérant ainsi le rôle des cellules immunitaires, tout cela pouvant mener à la mort prématurée. On sait aujourd'hui qu'il existe treize types de cancers associés à l'obésité<sup>3</sup>. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment le cancer de l'endomètre confirmé par la méta-analyse de Zhang et al. (2014) reprenant au total 18 études<sup>4</sup>.

### 1.1.2 Indice de masse corporelle

Pour caractériser l'état de surpoids ou d'obésité d'une personne, on se base sur le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) qui est le rapport entre le poids en kilogrammes et la taille en mètre carré :

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

La valeur obtenue permet d'estimer si les individus sont compris dans une gamme de poids considérée comme normale c'est-à-dire dont l'IMC est situé entre 18.5 et 24.9 kg/m<sup>2</sup>, en état de surpoids si l'IMC se trouve entre 25 et 30kg/m<sup>2</sup> voire en état de sous-poids lorsque l'IMC est inférieur à 18.5 kg/m<sup>2</sup>. En revanche, lorsque la valeur de l'IMC est supérieure ou égale à

30 kg/m<sup>2</sup>, alors un individu est considéré comme souffrant d'obésité. Il existe également différents stades d'obésité comme illustré dans le **tableau 1**. On parle ainsi d'obésité modérée lorsque l'IMC est compris entre 30 et 34.9 kg/m<sup>2</sup>, d'obésité sévère entre 35 et 39.9 kg/m<sup>2</sup> et d'obésité morbide entre 40 et 50 kg/m<sup>2</sup>. Finalement, on parle d'obésité massive ou super-obésité quand l'IMC dépasse 50 kg/m<sup>2</sup>.

**Tableau 1.** Les différents stades de l'obésité en fonction du calcul de l'IMC.

État	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Sous-poids	< 18.5
Poids normal	18.5-24.9
Surpoids	25-30
Obésité	>30
Obésité modérée	30-34.9
Obésité sévère	35-39.9
Obésité morbide	40-50
Super-obésité	> 50

*Tableau adapté de Wilkin C. et al. (2024) (manuscrit soumis).*

L'IMC constitue un moyen simple et rapide largement utilisé pour estimer l'état corporel et est fréquemment utilisé comme référence dans les statistiques épidémiologiques. Néanmoins, il présente des inconvénients puisque ses références sont réalisées sur base d'hommes blancs. Il n'est donc pas adapté aux femmes, ni à d'autres ethnicités, ou encore aux athlètes. Il existe d'autres méthodes, dont l'absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA), qui est plus précise mais moins pratique. Elle permet en effet d'évaluer la masse grasseuse totale plutôt que le poids corporel global en faisant un scan du corps entier<sup>5</sup>. Cependant, par raison de facilité, l'IMC est tout de même utilisé et présente une corrélation positive avec la DXA.

### 1.1.3 Obésité et immuno-déficience

Actuellement, il est admis que jusqu'à 49% de certains cancers sont liés à l'obésité<sup>6</sup>. De plus en plus d'études montrent la corrélation qui existe entre le développement de certains cancers et l'obésité<sup>7,8</sup>. Le mécanisme par lequel le système immunitaire est capable de détecter et d'éliminer les cellules tumorales est appelé immuno-surveillance. L'étude de Michelet et al. a démontré le lien qui existait entre l'obésité et la perte de l'immuno-surveillance<sup>6</sup>. En effet, l'environnement riche en lipides chez les personnes obèses induit leur accumulation au sein des cellules « *Natural Killer* » (NK) ce qui altère leur fonction. Puisqu'elles jouent un large rôle dans

la protection des tumeurs en libérant des perforines et des granzymes, leur déplétion et perte de fonction impactent directement le développement des tumeurs<sup>6</sup>.

Par ailleurs, l'obésité est également associée à un risque d'infection plus sévères, notamment avec le COVID-19. Il a été montré que les personnes obèses présentent une probabilité plus élevée d'infection malgré la vaccination<sup>9</sup>. Ce phénomène a également été observé avec d'autres vaccins comme celui contre la grippe<sup>10</sup>. De plus, la réponse aux immunothérapies serait diminuée du fait de l'état d'inflammation chronique présente chez les patients obèses<sup>11</sup> et l'immunosuppression qui en découle<sup>12</sup>. Un lien a déjà été démontré entre l'obésité et l'altération des cellules dendritiques (DCs) menant à l'inefficacité des immunothérapies qui se basent sur ces cellules<sup>13</sup>. En effet, l'inefficacité des immunothérapies a été démontrée notamment dans le cas du cancer du rein<sup>14</sup>.

#### 1.1.4 Obésité et stress du réticulum endoplasmique

En plus de l'état inflammatoire de bas grade chez les patients obèses, il y a également un stress du réticulum endoplasmique (RE) est observé dans les tissus métaboliques comme le foie, le pancréas et le tissu adipeux<sup>15</sup>. Le RE fait partie du système endomembranaire de la cellule eucaryote et participe à la synthèse protéique, au stockage de calcium et à la synthèse de lipides. L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE est perçue par trois récepteurs de la membrane du RE qui induisent une réponse adaptée appelée « *unfolded protein response* » (UPR)<sup>16,17</sup>. Ces trois récepteurs membranaires sont « *inositol requiring enzyme 1* » (IRE1), l'« *activating transcription factor 6* » (ATF6) et le « *double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR)-like ER kinase* » (PERK)<sup>17</sup>. IRE1 est une endoribonucléase et clive de nombreux ARN (ARNm, miRNA) pour diminuer l'accumulation de protéines mal repliées mais clive aussi spécifiquement l'ARNm non-épissé, *XBP1U*, en ARNm épissé, *XBP1s*<sup>18</sup>. Celui-ci code pour un facteur de transcription qui participe au maintien de l'homéostasie du RE. Ainsi, une expression accrue de la protéine *XBP1s* signale la présence d'un stress du RE.

#### 1.1.5 Obésité et dyslipidémie

L'obésité ne se résume pas uniquement à une accumulation de tissu adipeux, elle s'accompagne également de déséquilibres importants notamment dans le métabolisme lipidique menant à des perturbations des taux lipidiques sanguins. C'est ce qu'on appelle la dyslipidémie. Celle-ci se caractérise par des concentrations élevées en lipides, dont les triglycérides et le cholestérol,

qui sont transportés par les lipoprotéines du sang (détaillées dans le paragraphe 3.2)<sup>19,20</sup>. Ceci constitue le lien majeur entre l'obésité et le développement des maladies comme l'athérosclérose<sup>19</sup>. L'athérosclérose se caractérise par la formation de plaques au niveau de la paroi interne des artères<sup>21,22</sup>. Ces plaques sont formées par l'accumulation de lipides dans les cellules, ce qui mène à la formation de cellules spumeuses au niveau des parois artérielles, menant finalement à l'obstruction des artères. Il est donc important de s'intéresser à ces classes de lipides et d'où ils proviennent pour mieux comprendre le dysfonctionnement tout juste décrit.

### 1.1.6 Obésité et lipolyse

L'augmentation des acides gras libres dans le sang du patient obèse provient essentiellement de la lipolyse des triglycérides stockés dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes hypertrophiés du tissu adipeux<sup>23</sup>. Des études, dont celles du laboratoire (Wilkin C. et al. Thèse 2024), ont déjà démontré l'augmentation des acides gras libres dans le sang chez les personnes obèses<sup>24</sup>. En effet, la lipolyse est inhibée par l'insuline en temps normal<sup>23</sup>. Ainsi, une diminution de la concentration en acides gras libres a été démontrée par l'étude de Liu et al. lors de l'injection d'insuline<sup>25</sup>. Comme l'obésité s'accompagne rapidement d'une résistance à l'insuline, les adipocytes ne répondent plus efficacement à l'insuline et la lipolyse n'est plus inhibée, augmentant ainsi de manière excessive les concentrations en acides gras libres dans le sang<sup>26</sup>.

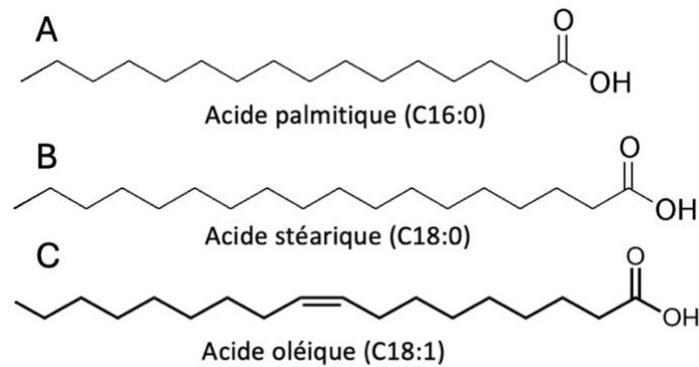
## 1.2 Les lipides

Afin de mieux comprendre l'importance de l'équilibre lipidique, il est indispensable de s'intéresser aux lipides, à leur composition, leur diversité et leurs rôles au sein de l'organisme. Plusieurs classes de lipides existent : les glycérolipides, les sphingolipides et les stérols. Les glycérolipides sont constitués d'un squelette glycérol. Si les 3 groupes -OH sont estérifiés avec une chaîne acyle, on parle de triglycéride (TG), des lipides neutres contenus dans des gouttelettes lipidiques au sein des cellules ou dans les lipoprotéines du sang. Les triglycérides sont les lipides de stockage et leur lipolyse libère des acides gras libres, source d'énergie. Les glycérolipides avec 2 chaînes acyle et un groupe phosphate sont plus communément appelés phospholipides. Ce sont des molécules hydrophobes amphiphiles, c'est-à-dire constituées de deux chaînes hydrocarbonées plus ou moins longues n'interagissant pas avec l'eau, et d'une tête polaire. Les phospholipides sont les blocs de construction des membranes cellulaires<sup>27</sup>. Les

sphingolipides jouent également un rôle structural dans les membranes biologiques<sup>27</sup>. Le cholestérol, quant à lui, est un stérol composé de quatre cycles hydrocarbonés et un groupe hydroxyle, molécule amphiphile capable d'impacter la fluidité des membranes cellulaires. Donc, bien qu'ils soient perçus négativement dans le cadre de l'obésité, les lipides ne sont pas intrinsèquement néfastes et sont même nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Toutefois, un excès de graisses perturbe l'homéostasie, favorise la prise de poids et engendre un déséquilibre lipidique, contribuant ainsi au développement de diverses pathologies.

### 1.2.1 Les acides gras libres

Les acides gras sont des molécules organiques constituées d'une chaîne hydrocarbonée de longueur variable terminée par une fonction carboxylique (**Figure 1**). On parle d'acides gras libres (« *Free fatty acids* », FFAs) lorsque leur fonction carboxylique n'est pas estérifiée au sein de lipides. Ils sont alors conjugués à des protéines, pour leur solubilité et transport dans les liquides biologiques, comme l'albumine dans le sang<sup>28</sup>. Ils peuvent être classés selon la longueur de leur chaîne aliphatique et être plus ou moins longs, allant jusqu'à 26 atomes de carbone dans le cas de l'acide hexacosanoïque. Ils peuvent également être classés selon leur degré d'insaturation. Ainsi, ils sont saturés (*saturated fatty acids*, SFA) s'ils ne possèdent aucune double liaison dans leur chaîne aliphatique, ou insaturés à partir du moment où ils possèdent une double liaison (*mono unsaturated fatty acids*, MUFA) ou plusieurs (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA). La nomenclature des acides gras repose sur le nombre d'atomes de carbone (n) et de doubles liaisons (x) et s'écrit sous la forme Cn:x. Les acides gras sont issus de l'alimentation, qu'elle soit d'origine animale, comme les viandes rouges, les fromages ou les œufs, sources majoritaires de SFAs, ou végétale, à travers les huiles, les graines ou les fruits oléagineux, riches en acides gras insaturés (*unsaturated fatty acids*, UFA). Ils peuvent également être synthétisés *de novo* lors de la lipogenèse. Les acides gras sont une source énergétique importante, représentant jusqu'à 30% de l'apport énergétique total<sup>29</sup>.



**Figure 1.** Représentation schématique des trois acides gras utilisés au cours de ce mémoire. A) l'acide palmitique C16:0, B) l'acide stéarique C18:0 et C) l'acide oléique C18:1.

L'équilibre entre les différents types d'acides gras est essentiel pour la santé. Une consommation excessive de SFAs, notamment l'acide stéarique (C18:0) et l'acide palmitique (C16:0) (**Figure 1**), est reconnue pour favoriser le développement de troubles métaboliques. En effet, ils sont liés à un état inflammatoire, à travers une production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages<sup>30</sup>, et impactent la fluidité membranaire des cellules, provoquant des problèmes au niveau de la signalisation cellulaire<sup>27</sup>. En revanche, les UFAs, tel que l'acide oléique (C18:1), ont plutôt l'effet contraire et atténuent la réponse inflammatoire<sup>30</sup>.

La  $\beta$ -oxydation des acides gras a lieu dans les mitochondries où ceux-ci sont convertis en acétyl-CoA qui entre finalement dans le cycle de Krebs et est oxydé. Cela mène à la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), utilisable par les cellules<sup>31</sup>.

En plus de leur rôle dans la constitution des lipides et dans l'apport énergétique, certains acides gras se comportent comme des molécules de signalisation. En temps normal, les acides gras sont notamment impliqués dans les cascades moléculaires de l'inflammasome NLRP3 ainsi que NF- $\kappa$ B. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B contrôle l'expression de cytokines pro-inflammatoires et permet également d'initier et up-réguler l'activation de NLRP3<sup>32</sup>. Ce dernier fait partie de la réponse immunitaire innée et active la réponse inflammatoire<sup>33</sup>. Il a également été démontré par l'équipe de Xing et al. que l'acide palmitique agissait comme activateur secondaire du NLRP3<sup>34</sup>. Les résultats antérieurs du laboratoire ont également montré que, contrairement aux SFAs, les UFAs n'activaient pas NLRP3 et n'entraînaient donc pas une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles qu'IL-1 $\beta$ <sup>35</sup>. Cela s'explique par le fait qu'il existe une différence entre les SFAs et UFAs. Les premiers engendrent une rigidification de toutes les membranes dont celle du RE tandis que les seconds ont le rôle inverse<sup>36</sup>. Ainsi, la résultante d'une concentration élevée en SFAs est la cytotoxicité qui se manifeste par

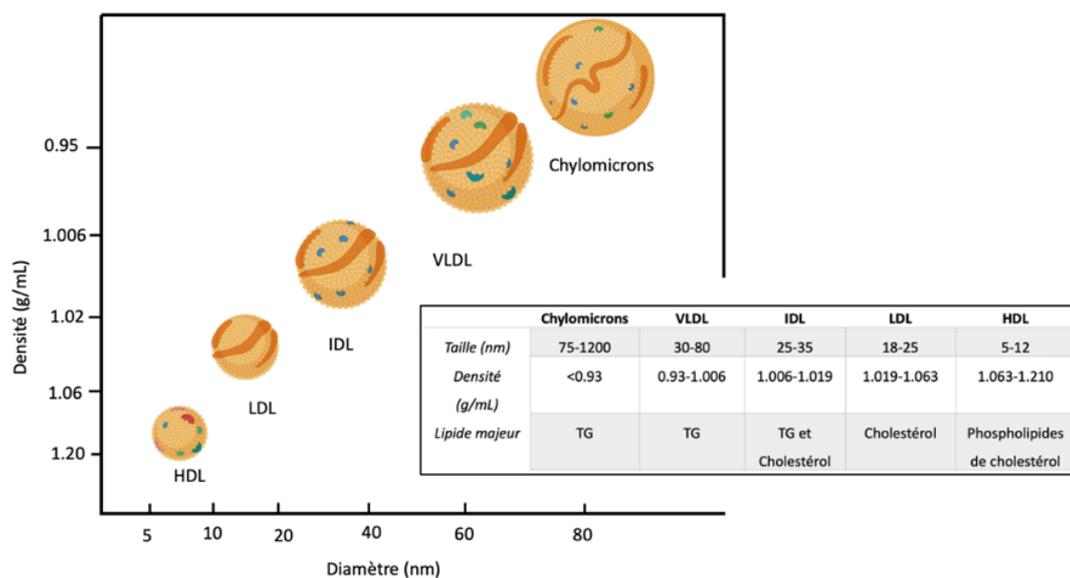
l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), un stress du RE provoqué notamment par la rigidification des membranes, un état inflammatoire et l'apoptose des cellules<sup>36</sup>.

Après avoir décrit les lipides et expliqué comment étaient produite l'énergie dont ils sont à l'origine, il est intéressant de comprendre comment se fait leur transport dans l'organisme. En raison de l'insolubilité des corps gras dans l'eau de par leurs propriétés hydrophobes, leur transport dans le sang est régi par des particules complexes appelées lipoprotéines<sup>37</sup>.

## 1.2.2 Les lipoprotéines

### 1.2.2.1 Composition et fonctions des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont nécessaires au transport des lipides dans le sang et autres fluides extracellulaires. Ce sont des structures sphériques, composées de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Apo) en surface et de TG et d'ester de cholestérol dans leur cœur hydrophobe<sup>38,39</sup>. Les Apos servent de ligands pour des récepteurs membranaires<sup>19</sup> tout en jouant un rôle structural<sup>39</sup>. La composition des lipoprotéines varie et détermine ainsi des classes de lipoprotéines avec une structure et un rôle qui leur sont propres. La composition en Apo, le contenu en lipides, la taille et la densité de la particule permettent de classer les lipoprotéines dans différentes catégories que sont les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité, les lipoprotéines de faible densité et les lipoprotéines de haute densité, le tout déterminant leur rôle fonctionnel<sup>19</sup> (**Figure 2**).



**Figure 2.** Classification des lipoprotéines. Figure reprise et adaptée de Feingold KR. (2000)<sup>37</sup>

#### 1.2.2.1.1 Les chylomicrons

Les chylomicrons (CM) permettent de transporter principalement des TG, mais peuvent également transporter du cholestérol estérifié<sup>40</sup>. Ils ont une densité inférieure à 0.930 g/mL<sup>37</sup>, ce qui s'explique par la faible proportion en protéines entrant dans leur composition<sup>40</sup>. Ils sont constitués de plusieurs apolipoprotéines, dont l'ApoB-48, qui est leur principale protéine structurale<sup>37</sup>. La quantité de graisses ingérée influence la taille du CM, variant de 75 à 1200 nm<sup>37</sup>.

#### 1.2.2.1.2 Les lipoprotéines de très faible densité

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sont produites par le foie<sup>37</sup> et transportent principalement des TG. Ceux-ci représentent environ 50 à 70 % de la masse totale des VLDL<sup>41</sup>. Elles ont une taille comprise entre 30 et 80 nm avec une densité allant de 0.930 à 1.006 g/ml<sup>37</sup>. Les VLDLs jouent un rôle clé car leur production et sécrétion influencent directement la teneur en lipides du foie, contribuant ainsi au développement des maladies hépatiques et cardiovasculaires<sup>42</sup>. Leur principale apolipoprotéine structurale est l'ApoB-100, présente en un seul exemplaire sur chaque VLDL<sup>37</sup>. Lorsque les triglycérides sont éliminés des VLDLs, elles passent à une forme intermédiaire qu'on appelle les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), contenant principalement du cholestérol.

#### 1.2.2.1.3 Les lipoprotéines de faible densité

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) proviennent des IDL et sont responsables du transport du cholestérol vers les cellules<sup>37</sup>. Elles sont souvent qualifiées de « mauvais cholestérol » car une trop haute proportion entraîne leur accumulation dans la paroi des vaisseaux sanguins, augmentant le risque de maladies cardiovasculaires<sup>43</sup>. Elles ont une forme sphérique d'une taille de 18 à 25 nm et une densité comprise entre 1.019 et 1.063 g/mL<sup>37</sup>, due à l'unique apolipoprotéine B-100 qui la compose<sup>22</sup>.

Les LDLs assurent le transport du cholestérol, lui-même essentiel à la production d'hormones et à la structure des membranes cellulaires. Cependant, lorsque leur nombre est trop élevé, elles sont associées au risque de développer des maladies cardiovasculaires<sup>22</sup>. Ceci sera détaillé dans le paragraphe 1.2.2.3 expliquant l'oxydation des LDLs.

#### 1.2.2.1.4 Les lipoprotéines de haute densité

Contrairement aux LDLs, les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont qualifiées de « bon cholestérol ». En effet, elles permettent le transport inverse de cholestérol, c'est-à-dire son

retour vers le foie à partir des tissus périphériques<sup>37</sup>. Ceci est particulièrement important car elles permettent d'éliminer l'excès de cholestérol dans les macrophages présents dans la paroi artérielle<sup>44</sup>. Elles ont d'autres rôles notamment en freinant l'oxydation des LDLs ou encore en réduisant l'inflammation vasculaire<sup>44</sup>. Leur composition est riche en protéines<sup>37</sup> avec un diamètre compris entre 5 et 12 nm et une densité comprise entre 1.063 et 1.21 g/mL<sup>45</sup>. Au niveau du foie, le cholestérol peut y être stocké pour former les acides biliaires et se retrouver dans la bile<sup>46</sup>.

### *1.2.2.2 Le métabolisme des lipides*

Le métabolisme des lipides fait référence au transport des lipides, principalement triglycérides et cholestérol, dans la circulation sanguine<sup>19</sup>. Le foie est l'organe clé dans le maintien de l'équilibre lipidique, de leur stockage et synthèse<sup>47</sup>. Lorsqu'il y a un déséquilibre dans le métabolisme lipidique, cela engendre des quantités élevées de lipides donnant naissance aux dyslipidémies. Les lipides proviennent de deux voies : la voie exogène qui fait référence aux lipides ingérés et leur transport via les chylomicrons jusqu'au foie et tissus périphériques et la voie endogène dont la synthèse des lipides débute dans le foie<sup>48</sup> (**Figure 3**).

#### *1.2.2.2.1 La voie exogène*

L'absorption des lipides alimentaires se fait par les entérocytes du petit intestin où ils sont englobés dans des micelles avant de devenir des chylomicrons qui permettent leur transport jusqu'aux tissus périphériques<sup>49,50,37</sup>. Dans les cellules hépatiques, les acides gras s'associent avec le glycérol pour former des TG au niveau du réticulum endoplasmique lisse. D'autre part, le réticulum endoplasmique rugueux permet la synthèse de la protéine APoB-48 qui s'associe aux triglycérides et au cholestérol libre pour permettre à la micelle de devenir un chylomicron. Ce dernier acquiert dans la circulation d'autres protéines de la famille des Apo, tels que Apo-E et Apo-CII, grâce aux HDL. Ce n'est que sous cette forme, que l'entrée des acides gras dans les adipocytes peut se faire grâce à la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme présente sur les cellules endothéliales des vaisseaux capable de couper les triglycérides en acides gras libres. Ces derniers peuvent alors traverser les capillaires et rejoindre les adipocytes ou les muscles squelettiques. Là, ils peuvent être stockés ou oxydés pour produire de l'énergie<sup>47</sup>. Les chylomicrons qui ont ainsi relargué des triglycérides et sont riches en cholestérol sont reconnus par les récepteurs LDL (LDLR) du foie. Là le cholestérol peut y être stocké.

### 1.2.2.2 La voie endogène

La voie endogène débute dans le foie avec la synthèse des TG à partir des acides gras libres ainsi que des esters de cholestérol pour former les VLDL grâce à leur association avec la protéine ApoB-100<sup>47</sup>. D'autres Apo sont présentes à leur surface dont ApoC-II et Apo-E<sup>47</sup>. Ces VLDL sont ensuite relarguées dans la circulation sanguine où la quantité de TG s'amointrit grâce à la LPL qui clive les TG en acides gras. Le ratio cholestérol/TG augmente formant ainsi séquentiellement les IDL qui acquièrent davantage de cholestérol à partir des HDLs ce qui mène à la formation des LDLs. Ceux-ci permettent au cholestérol d'atteindre les tissus périphériques. A contrario, les HDL permettent le transport inverse du cholestérol depuis les tissus périphériques vers le foie<sup>47</sup>, ce qui leur a valu le nom de « bon cholestérol ».

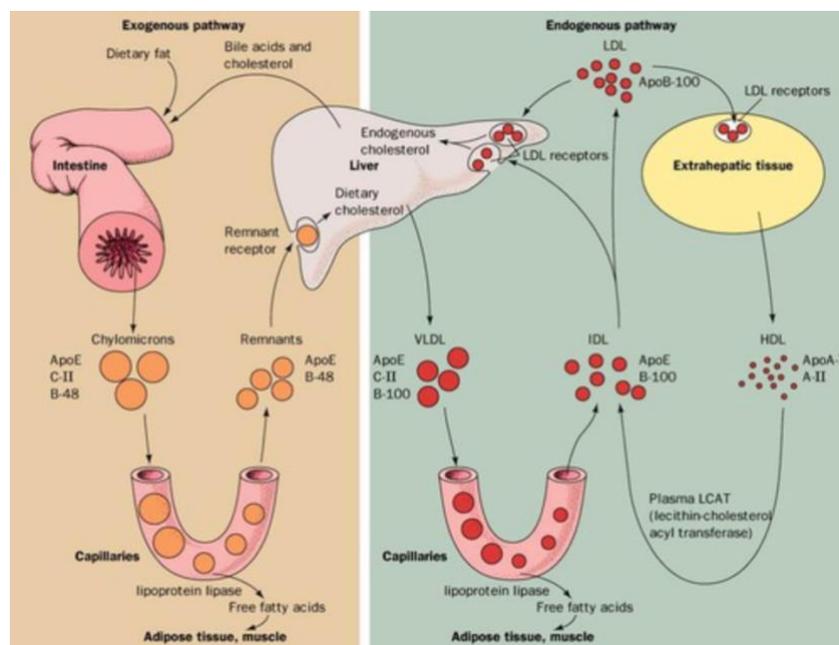
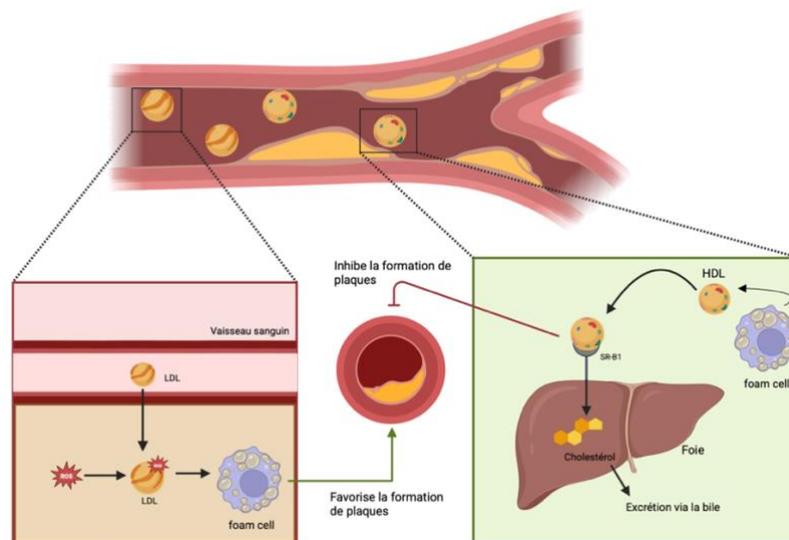


Figure 3. Voie exogène et endogène du métabolisme lipidique. Figure reprise de <https://o.quizlet.com/CJdVjt0kN88ai4pruw.yFw.jpg>.

### 1.2.2.3 L'oxydation des LDLs

Les LDL oxydés (ox-LDL) sont des marqueurs d'un stress oxydatif systémique ainsi que des marqueurs de changements métaboliques, et peuvent présenter un risque lorsqu'elles apparaissent dans la circulation sanguine. En effet, elles sont capables de quitter le flux sanguin et de s'accumuler sous forme de gouttelettes lipidiques dans certaines cellules, dont les macrophages, qui deviennent des cellules spumeuses (ou *foam cells*) adhérant à la paroi endothéliale des artères. Ces dépôts conduisent à la formation de plaques rétrécissant progressivement le diamètre artériel, pouvant aller jusqu'à une obstruction complète (Figure 4).

C'est ce phénomène qui mène au développement de l'athérosclérose<sup>22</sup>. En effet, une absorption importante de ox-LDLs génère des espèces réactives de l'oxygènes (ROS) qui sont la cause de l'inflammation et du dysfonctionnement endothélial<sup>22</sup>. L'étude de Njajou et al. avait déjà démontré que l'oxydation des LDLs était corrélée à l'inflammation et l'IMC des patients, et que chez ces derniers, l'effet du stress oxydatif était d'autant plus marqué chez les personnes souffrant d'obésité<sup>51</sup>. Une autre étude, sur des enfants, a également montré que la concentration en ox-LDLs était significativement plus élevée chez les enfants obèses et en surpoids contrairement aux enfants de poids normal<sup>52</sup>.



**Figure 4.** Comparaison du rôle antagoniste entre les LDL et les HDL dans le développement des plaques dans le cas de l'athérosclérose. Figure adaptée de <https://biologielessen.nl/aderverkalking-2-2/> via Biorender.com.

#### 1.2.2.4 Les récepteurs scavengers

Tous les composants des LDLs (stérols, TG, phospholipides et l'apolipoprotéine B-100) sont susceptibles d'être oxydés. Ces oxydations modifient les propriétés des LDLs qui peuvent alors être reconnues et internalisées par des récepteurs dits « scavenger » (SRs) qui participent aux réponses inflammatoires. Les SRs forment une grande famille contenant douze classes de récepteurs membranaires impliqués dans des réponses cellulaires comme la phagocytose et la libération de cytokines. La nomenclature utilisée est SR suivie par la classe représentée par des lettres majuscules (A-L)<sup>53</sup>. Parmi les SRs on retrouve notamment le « *Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1* » (LOX-1). Il s'agit d'une protéine membranaire appartenant à la famille des lectines de type C qui est présente sur de nombreuses cellules dont les macrophages, les DCs, les lymphocytes et les cellules endothéliales<sup>22</sup>. Celles-ci sont capables d'internaliser les ox-LDLs. L'activation de LOX-1 par les ox-LDLs favorise l'inflammation, le stress oxydatif et la

formation de cellules spumeuses, faisant de lui une cible thérapeutique pour freiner la progression de l'athérosclérose.

Lorsque des Ox-LDLs sont ajoutés aux PBMCs ou sang complet humain ou injectés par voie intraveineuse dans des souris, ils sont principalement internalisés par les monocytes comme démontré par l'accumulation de gouttelettes lipidiques<sup>54</sup>. Il semblerait que ce soient surtout les monocytes non classiques (NCM, CD16+) qui en soient responsables. Le rôle principal des NCMs est de contrôler l'homéostasie vasculaire en « patrouillant » le long de l'endothélium<sup>55</sup>. Les NCMs internalisent les Ox-LDLs via le CD36 chez la souris. En revanche, d'autres SR seraient impliqués pour les NCM humains (CD68, CD163 et CD204)<sup>54</sup>. La reconnaissance des ox-LDLs par le CD36 permettrait l'internalisation et leur accumulation au sein des cellules formant des cellules spumeuses, caractéristiques de l'athérosclérose ou encore dans l'obésité.

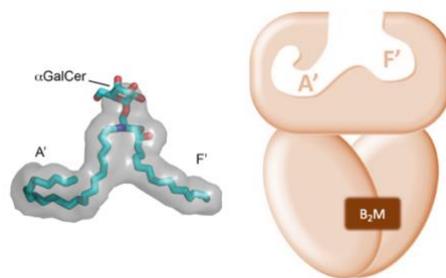
### 1.3 Les cellules *Natural Killer T* invariantes (iNKT)

Les cellules Natural Killer T invariantes (iNKT) sont considérées comme des lymphocytes T non conventionnels qui possèdent à la fois des caractéristiques de cellules T et de cellules NK<sup>56</sup>. Le TCR des cellules iNKT humaines est semi-invariant, avec une chaîne unique  $\alpha$ , V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 associée à une chaîne unique V $\beta$ 11<sup>56,57</sup>. Il reconnaît spécifiquement des antigènes lipidiques présentés via le CD1d de cellules présentatrices d'antigènes (APCs). Les cellules iNKT se développent dans le thymus à partir d'un progéniteur lymphoïde commun et la sélection positive est réalisée par les thymocytes. Elles gagnent ensuite différents tissus dont la rate, le foie, le tissu adipeux, les poumons et les intestins. Un nombre faible d'entre elles circulent dans le sang périphérique (0.01 à 0.2% des lymphocytes T totaux chez l'homme)<sup>57</sup>.

#### 1.3.1 CD1d et antigènes lipidiques

Le CD1d fait partie de la famille des glycoprotéines CD1, similaires au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type 1. Ce groupe comprend cinq isotypes (CD1a-e) chez l'homme pouvant être séparés en trois groupes, le premier regroupant CD1a-b-c, le deuxième contenant uniquement le CD1d, et un groupe intermédiaire composé de CD1e. Contrairement au CMH qui présente des antigènes peptidiques<sup>58</sup>, ces glycoprotéines CD1 sont spécialisées dans la présentation d'antigènes lipidiques aux cellules capables de les reconnaître, dont les cellules iNKT via leur TCR<sup>59</sup> sans intervention du complexe CMH<sup>60</sup>. Le CD1d est un hétérodimère composé de 2 hélices alpha liées de manière non covalente à la sous-unité  $\beta_2$ -microglobuline

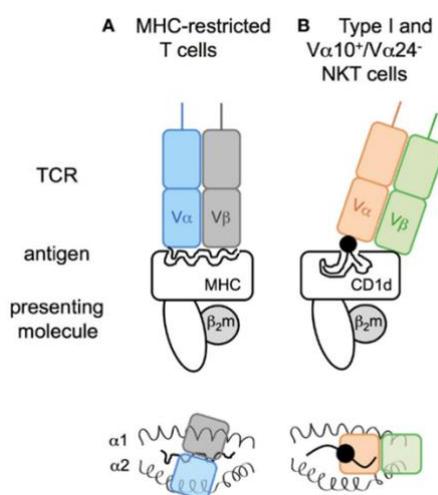
(B<sub>2</sub>M)<sup>58,61</sup>. Cette protéine transmembranaire contient 2 poches très hydrophobes<sup>62</sup> : une poche A' qui permet l'insertion des chaînes alkyles ayant une taille définie, et une poche F', plus restrictive, qui limite l'accès aux chaînes lipidiques plus longues<sup>62</sup> (**Figure 5**). Un exemple connu d'antigène lipidique puissant est l'alpha-galactosylcéramide ( $\alpha$ GC), un glycolipide capable de se lier au CD1d, dont la conformation s'intègre parfaitement aux poches A' et F' (**Figure 5**). Il s'agit du premier ligand pour les cellules iNKT découvert à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle lors de recherches de traitement anticancéreux et isolé à partir de l'éponge *Agelas mauritanus*<sup>63</sup>. Sa structure moléculaire se compose d'une tête galactose liée à une chaîne de sphingosine, elle-même reliée à une chaîne acyl<sup>63</sup>. Cette configuration lui permet de se loger dans les deux poches du CD1d tandis que la tête saillante de l' $\alpha$ GC permet d'être reconnue par le TCR présent à la surface des cellules iNKT. Lors de cette liaison, un complexe ternaire se forme et active fortement les cellules iNKT (voir paragraphe 5.1.2.2).



**Figure 5.** CD1d et son ligand lipidique, l'alpha-galactosylcéramide. La conformation tridimensionnelle de l' $\alpha$ -GC permet de s'insérer dans les deux poches, A' et F', du CD1d. Figures reprises et adaptées de <sup>58,62</sup>.

Depuis la découverte de l' $\alpha$ GC comme antigène lipidique pour l'activation des cellules iNKT en 1997<sup>64</sup>, un grand nombre de lipides de structure différente (phospholipides, glycolipides) capables d'être chargés sur le CD1d ont été identifiés mais ceux-ci n'ont pas tous une activité antigénique. Le chargement du lipide sur le CD1d doit induire une modification conformationnelle du CD1d et la formation d'un complexe stable. Alors que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR des cellules iNKT est en contact avec le peptide et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), seule la chaîne  $\alpha$  du TCR est en contact avec le groupe de tête des glycolipides  $\alpha$ -liés tels que l' $\alpha$ -GalCer, et joue donc un rôle important dans la spécificité et la reconnaissance des glycolipides. La chaîne beta stabilise le complexe en interagissant avec la molécule CD1d<sup>65</sup> (**Figure 6**).

Les antigènes lipidiques peuvent être exogènes, d'origine bactérienne par exemple, ou endogènes. Les cellules de mammifère ne possèdent pas l'enzyme nécessaire à la synthèse des alpha-glycosphingolipides mais peuvent synthétiser les isomères beta qui sont des lipides de faible antigénicité<sup>66</sup>. Cependant, on trouve des concentrations faibles en alpha-galactosylcéramide dans le FBS et des variants de l' $\alpha$ GC dans le sérum et les tissus humains capables d'activer les cellules iNKT après leur chargement sur le CD1d<sup>66</sup>. Ceux-ci sont probablement synthétisés par le microbiote.

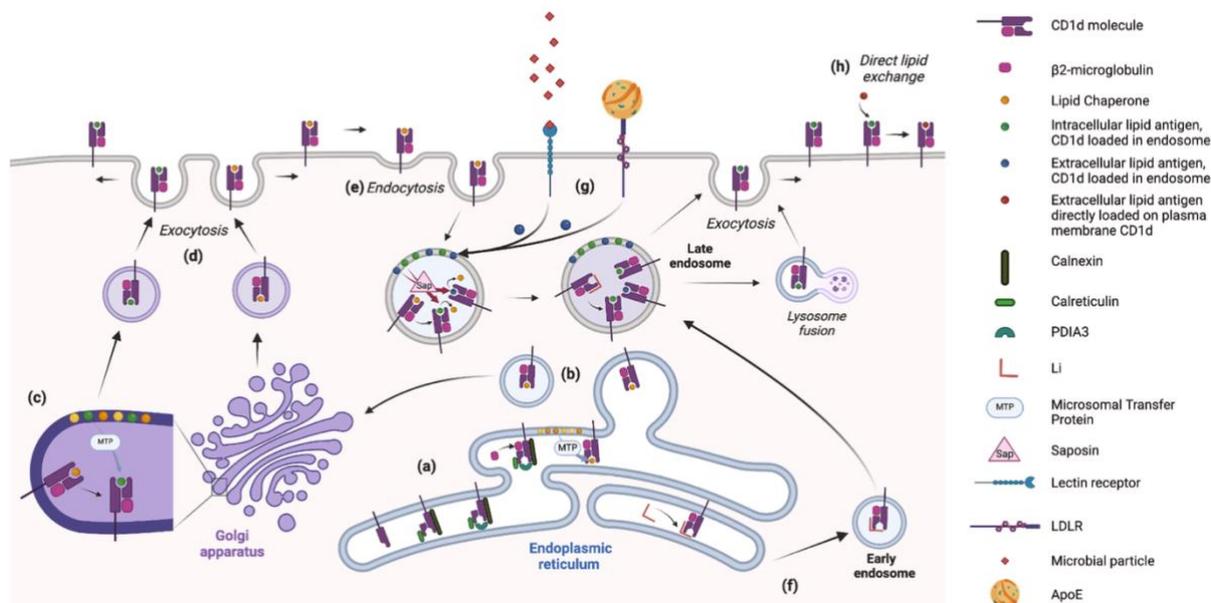


**Figure 6.** Reconnaissance des antigènes lipidiques par le TCR dans un contexte CMH ou CD1d dépendant. A) Dans le cas du CMH, les chaînes alpha et beta du TCR interagissent avec l'antigène peptidique. B) Dans le cas du CD1d, la chaîne alpha interagit avec l'antigène lipidique tandis que la chaîne beta interagit directement avec le CD1d, stabilisant de cette manière le complexe formé. Figure reprise de <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00362>.

### 1.3.1.1 Chargement des lipides sur le CD1d

La synthèse du CD1d, son repliement et son assemblage avec B2m se fait dans la lumière du RE grâce à différentes protéines chaperonnes, telles que la calnexine ou la calréticuline<sup>56,67</sup>. Avant d'être chargés sur le CD1d, certains lipides doivent subir des modifications après avoir été capturés par des protéines à la surface de la cellule, telle que ApoE. Il existe deux voies principales de chargement des lipides sur le CD1d<sup>68</sup> : la première est le chargement directement après la synthèse du CD1d dans le RE et le golgi, tandis que la deuxième survient après le recyclage du CD1d dans l'endosome, facilité par le faible pH qui y règne<sup>56</sup>. Le chargement lipidique sur le CD1d est notamment facilité par une chaperonne clé, la « *Microsomal Transfer Protein* » (MTP)<sup>56,67</sup>. En parallèle, certains lipides peuvent également être chargés directement à la surface de la cellule<sup>69</sup>. Une fois que les antigènes lipidiques sont chargés sur le CD1d, cela

induit un changement conformationnel de ce dernier, nécessaire à l'interaction avec le TCR des cellules iNKT<sup>68</sup> (Figure 7).



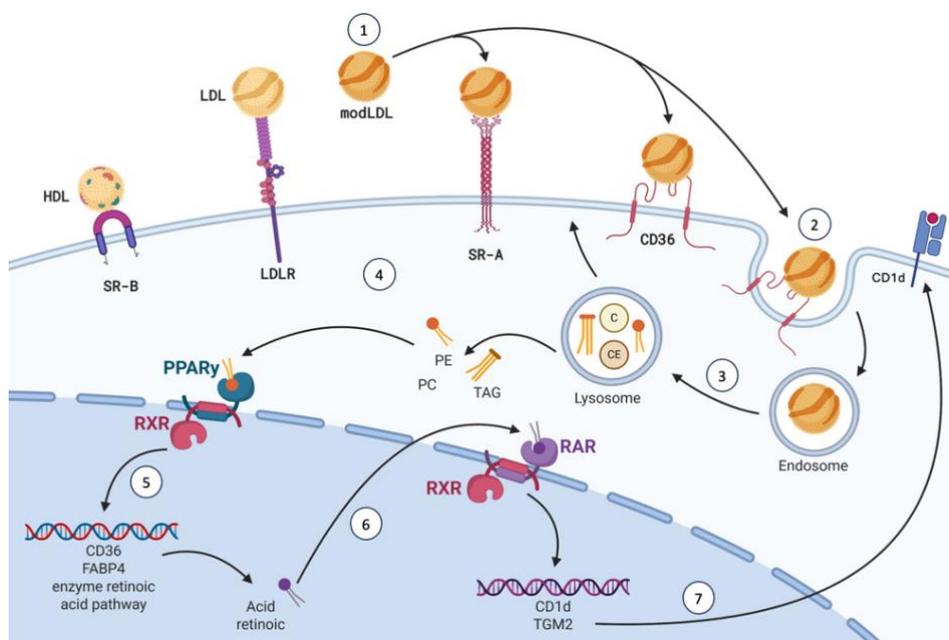
**Figure 7.** Synthèse et voies de chargement des lipides sur le CD1d. (a) Le CD1d est synthétisé dans le RE où il s'associe à la B2m et lie des lipides endogènes grâce aux chaperonnes telles que la calnexine, la calréticuline et le PDIA3. (b) La MTP facilite l'incorporation des lipides dans la poche du CD1d. (c) Le complexe formé par le CD1d-lipide passe par l'appareil de golgi. (d) Le CD1d est acheminé à la membrane plasmique par exocytose. (e) Internalisation du CD1d par endocytose et entre dans le compartiment endosomal (f) où des protéines comme la saposine facilitent le chargement d'antigènes lipidiques intracellulaires. (g) Des antigènes lipidiques extracellulaires peuvent être internalisés par des récepteurs aux lectines ou LDLR permettant leur chargement sur le CD1d dans les endosomes. (h) Chargement de lipides sur le CD1d directement à la membrane plasmique. Figure reprise de <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116436>.

### 1.3.1.2 Expression du CD1d

Comme les CMH de classe I et de classe II, CD1d est exprimé de manière constitutive sur les APCs (monocytes, macrophages, DCs, lymphocytes B, thymocytes) et est soumis à une régulation supplémentaire par les cytokines (IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) ou des produits microbiens<sup>70</sup>. Il est intéressant de noter qu'une régulation de la transcription de CD1d peut également être induite en conditions stériles, notamment par des lipides. En effet, des lipides spécifiques présents dans le sérum humain activent l'expression du CD1d sur les DCs via le « Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )<sup>71</sup>.

PPAR $\gamma$  est un récepteur nucléaire principalement présent dans les adipocytes mais également les entérocytes ou encore les macrophages. Ces récepteurs agissent en tant que facteur de transcription après la reconnaissance et la liaison de ligands variés allant de métabolites endogènes tels que les acides gras<sup>72</sup>, des composés alimentaires et même des médicaments<sup>73</sup>.

Son rôle est de gérer le stockage des lipides et du glucose. Il existe trois types de PPAR :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>73,72</sup>. Le premier étant principalement présent dans le foie,  $\beta$  est ubiquitaire et  $\gamma$  surtout présent dans le tissu adipeux. L'intérêt grandissant sur l'étude de la voie PPAR $\gamma$  découle de son implication dans les maladies telles que l'obésité ou l'athérosclérose. La structure de ces récepteurs, qui sont des facteurs de transcription, leur permet d'une part de lier l'ADN et d'autre part de lier le ligand qui leur est spécifique. Lorsque le PPAR $\gamma$  est activé, à la suite de la liaison d'un ligand<sup>71</sup>, il dimérise avec le récepteur « *Retinoid X receptor* » (RXR) et peut aller reconnaître la séquence régulatrice d'un gène spécifique et l'activer (Chen et al., 2023) (**Figure 8**). L'effet de PPAR $\gamma$  sur la transcription du gène *CD1D* ne serait pas direct. En effet, l'activation de PPAR $\gamma$  par ses ligands synthétiques induit l'expression d'enzymes capables de synthétiser l'acide rétinoïque « *All-Trans Retinoic Acid* » (ATRA) dans les DCs humains. Celui-ci se lie à son tour au récepteur nucléaire « *Retinoic Acid Receptor  $\alpha$*  » (RAR $\alpha$ ) qui, sous forme d'hétérodimère RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ , stimule la transcription de *CD1D*, ce qui confère aux DCs la capacité d'activer les cellules iNKT. Des ox-LDLs peuvent aussi initier la signalisation PPAR $\gamma$ -RAR $\alpha$  conduisant à l'expression du CD1D sur les DCs humains<sup>74</sup>. L'activation de la voie PPAR $\gamma$  par les ox-LDLs exige leur internalisation via des SRs. Des lipides oxydés seraient alors libérés et pourraient jouer le rôle de ligand et activateur de PPAR $\gamma$ <sup>75</sup>.

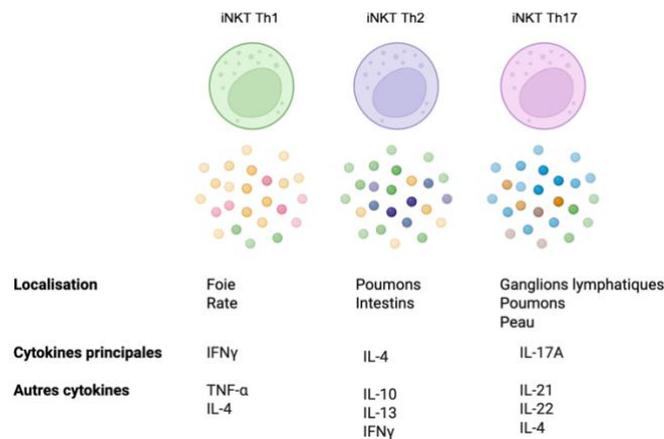


**Figure 8.** Représentation de la voie PPAR $\gamma$  et de la régulation indirecte du CD1d. (1) Les ox-LDLs sont reconnus par les récepteurs scavengers et (2) sont internalisés dans les DCs par endocytose. (3) La fusion avec le lysosome permet de séparer les constituants qui à leur tour (4) reconnaissent les récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  auxquels ils se lient et qui dimérisent avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR). (5) Le complexe formé est capable de reconnaître une séquence régulatrice au niveau de l'ADN ce qui mène à l'activation de gènes tels que CD36, FABP4 et des enzymes de la voie de l'acide rétinoïque. (6) L'acide

rétinoïque se lie à un autre récepteur nucléaire (RARA) capable de dimériser avec RXR. Le complexe reconnaît des séquences régulatrices permettant la transcription de gènes tels que CD1d et TGM2. (7) La protéine CD1d s'insère à la membrane des DCs. Figure réalisée via Biorender.com.

### 1.3.2 Mode d'activation des cellules iNKT

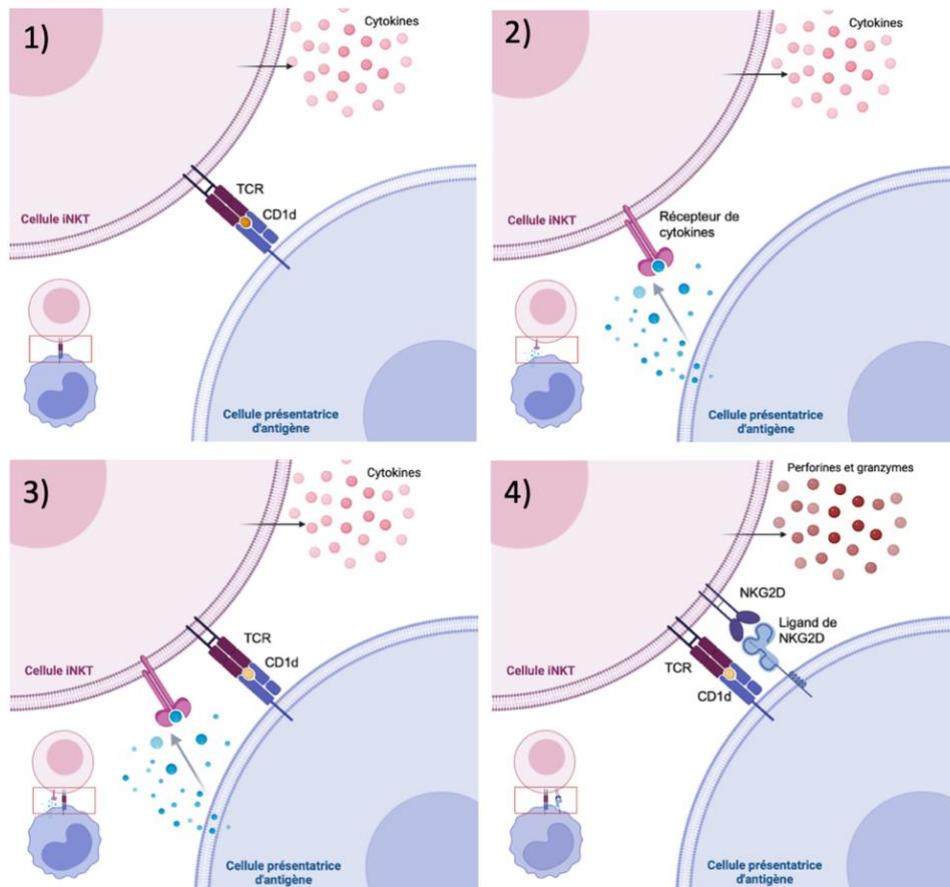
L'activation des cellules iNKT conduit à une libération très rapide de grosses quantités de cytokines de type Th-1, Th-2 ou Th17 selon l'environnement, la nature des APCs et de l'antigène lipidique présenté<sup>56</sup>. (Figure 9). Elle peut également conduire à une cytotoxicité via la libération de perforine et de granzymes. La réponse rapide des cellules iNKT s'explique notamment par l'expression d'ARN messagers (ARNm) préformés de l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et l'interleukine-4 (IL-4)<sup>76,57</sup>. Cette réactivité leur permet d'agir dans la surveillance et l'élimination des cellules tumorales, via des mécanismes directs ou indirects.



**Figure 9.** Sous-populations des cellules iNKT sur base du type de cytokines sécrétées. Figure réalisée via Biorender.com, adaptée de <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116436>

Puisque les cellules iNKT font partie de l'immunité innée, leur réaction rapide de première ligne permet de gérer l'état d'inflammation en relarguant différentes cytokines déclenchant la réponse adaptative, via l'activation d'autres cellules immunitaires. L'activation des cellules iNKT peut être réalisée de quatre manières différentes, indépendamment ou non du TCR, et la réponse produite dépend du contexte dans lequel elle intervient. En effet, de nombreux facteurs influencent la réponse des iNKT, dont l'antigène lipidique et la cellule qui le présente, l'intensité du signal par le TCR si celui-ci est impliqué, l'influence des cytokines mais également le tissu<sup>56</sup>. Pris tous ensemble, ces facteurs influencent la manière dont les iNKT vont réagir puisqu'elles peuvent avoir un phénotype tant anti- que pro-inflammatoire<sup>56</sup>.

1. L'activation peut uniquement découler d'un signal TCR important par la présentation d'un antigène lipidique de forte affinité de liaison. Lorsque le TCR présent à la surface des cellules iNKT reconnaît l'antigène lipidique présenté par le CD1d des APCs, tel que l'antigène fort  $\alpha$ -GC, cela entraîne l'activation des cellules iNKT et l'internalisation du TCR. La diminution de l'expression du TCR est détectable après 1h et est maximale entre 8 et 12h<sup>77</sup>. L'activation mène à la production de différentes cytokines, dont l'interféron gamma. Il s'agit d'une cytokine pro-inflammatoire induisant l'activation des différentes cellules immunitaires (**Figure 10.1**).
2. Dans un contexte d'infection, les APCs activés via la reconnaissance de *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) produisent des cytokines telles que l'IL-12 et IL-18 capables d'activer les cellules iNKT sans l'intervention du TCR<sup>78</sup>. Cette caractéristique leur permet d'être activées même en l'absence d'antigènes lipidiques<sup>76</sup>. Lorsque ce dernier n'intervient pas dans l'activation des cellules iNKT, elles ne produisent que l'INF- $\gamma$ <sup>56</sup>. (**Figure 10.2**)
3. Cependant, l'activation peut résulter à la fois de l'action de cytokines et d'un faible signal TCR découlant d'un antigène lipidique endogène de faible affinité. (**Figure 10.3**)
4. Finalement, l'activation peut également impliquer les récepteurs NK présents à la surface des cellules iNKT tel que le « *Natural Killer Group 2 member D* » (NKG2D). Dans le cas d'un stress cellulaire ou à la suite d'une infection, les cellules stressées peuvent exprimer des ligands du NKG2D tels que le « *MHC class I polypeptide-related sequence A/B* » (MICA/B). La reconnaissance de ces ligands par les cellules iNKT induit la libération de perforine et de granzymes qui mènent à la mort des cellules anormales, dont les cellules tumorales. (**Figure 10.4**).



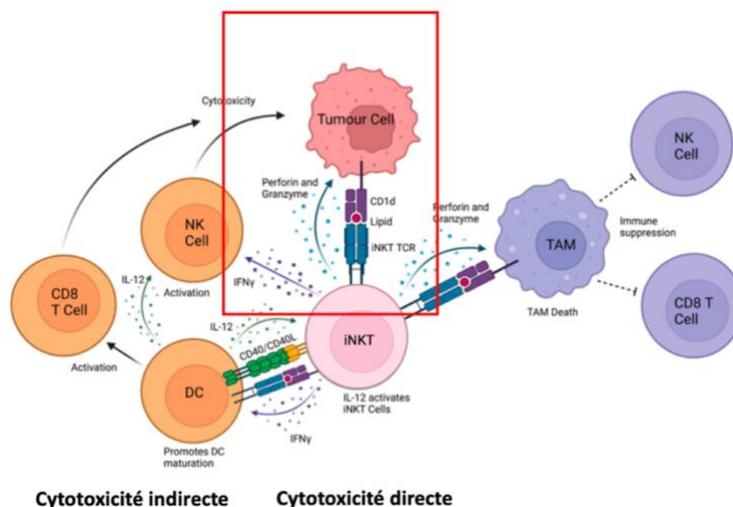
**Figure 10.** Les quatre modes d'activation des cellules iNKT. 1) Activation spécifique via le TCR en réponse à un antigène lipidique fort. 2) Activation unique par des cytokines 3) Activation conjointe via le TCR avec un antigène lipidique faible et par les cytokines de la cellule présentatrice d'antigène. La réponse de ces trois modes d'activation conduit à la production de cytokines. 4) Activation via le TCR et le récepteur NKG2D induisant la production de perforines et de granzymes. Figure réalisée par Biorender.com et adaptée de <https://doi.org/10/1016/j.bcp.2024.116436>.

Un autre mécanisme d'activation des cellules iNKT en conditions stériles a été décrit et impliquerait la présentation d'antigènes lipidiques par des DCs ou macrophages en situation de stress du RE. En effet, les travaux de Bedard et al.<sup>79</sup> et Govindarajan et al.<sup>67</sup> ont démontré que le traitement de ces cellules avec les inducteurs classiques du stress du RE (thapsigargine et tunamycine) leur confère la capacité d'activer les cellules iNKT.

### 1.3.3 Rôles des cellules iNKT dans l'immunité.

Les cellules iNKT jouent un rôle important dans les réponses immunitaires locales et systémiques et sont essentielles au contrôle du développement tumoral et aux réponses immunitaires antimicrobiennes. Elles peuvent également exercer des effets néfastes sur la pathogenèse des maladies autoimmunes<sup>81</sup> et allergiques<sup>80</sup> ou être indispensables à l'homéostasie de certains tissus comme le tissu adipeux<sup>82</sup>.

Les cellules iNKT occupent une position centrale dans la réponse immunitaire antitumorale en ciblant les cellules tumorales de manière directe et indirecte<sup>83</sup>. Lors d'une cytotoxicité directe, les cellules tumorales peuvent présenter des antigènes lipidiques de la tumeur via le CD1d et déclencher une réponse cytotoxique dirigée contre elles<sup>57</sup> impliquant le relargage de cytokines ainsi que de perforine et de granzymes. Dans le second cas, les cellules iNKT sont activées via la présentation d'antigène lipidique sur les DCs et libèrent des cytokines telle que l'INF- $\gamma$  qui stimule à son tour les DCs. Ceux-ci induisent à leur tour l'activation d'autres cellules dont les cellules NK, impliquées dans la destruction des cellules tumorales (**Figure 11**). Grâce à leur position centrale et leur implication tant dans l'immunité innée que adaptative, les cellules iNKT ont de nombreux avantages, tels que leur spécificité universelle, leur prolifération rapide in vitro ou encore leur auto-renouvellement périphérique qui en font des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes<sup>84</sup>.



**Figure 11.** Réseau d'interactions des cellules iNKT dans la réponse cytotoxique tumorale. Les cellules iNKT peuvent agir de manière directe ou indirecte tout en régulant le micro-environnement tumoral. La cytotoxicité directe est exercée via la reconnaissance d'antigènes lipidiques présentés par le CD1d de la cellule tumorale par le TCR de la cellule iNKT. La cytotoxicité indirecte découle de l'activation d'autres cellules immunes (DCs ou NK) via la production d'IFN $\gamma$ . Figure reprise et adaptée de <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1176724>.

### 1.3.4 Les cellules iNKT dans l'obésité.

Les cellules iNKT font partie des cellules impactées par l'obésité. En effet, plusieurs études ont rapporté que leur nombre était diminué dans le sang périphérique de patients obèses ainsi que dans le tissu adipeux, le foie et la rate du modèle de souris obèse induit par un régime riche en graisse (High fat diet (HFD)-fed mice)<sup>85,86,87,88,57</sup>. Les cellules iNKT du tissu adipeux présentent un phénotype régulateur spécifique avec production de cytokine anti-inflammatoire IL-10 et

jouent un rôle important dans l'homéostasie de ce tissu<sup>89</sup>. Chez les souris obèses (HFD), le nombre de cellules iNKT du tissu adipeux diminue par un mécanisme encore inconnu, ce qui favorise le développement de l'inflammation et des perturbations métaboliques.

Mon laboratoire d'accueil a entrepris une étude visant à caractériser les cellules iNKT du sang périphérique chez le patient obèse et élucider l'origine de leur déplétion. Ils ont démontré une activation chronique des cellules iNKT du sang périphérique chez les patients obèses associée à la fois à une apoptose accrue et à un dysfonctionnement. Cette perturbation affecte principalement la sous-population CD4-, plus spécialisée dans la libération de cytokines pro-inflammatoires et dans la cytotoxicité et pourrait donc être impliquée dans la perte d'immuno-surveillance des patients obèses. Il est intéressant de noter que le CD1d est régulé à la hausse sur les monocytes intermédiaires (IM) et non classiques (NCM) des patients obèses mais pas sur les lymphocytes B et les DCs du sang périphérique. De plus, l'expression du CD1d sur les IM et NCM est corrélée au dysfonctionnement des cellules iNKT. L'activation chronique et le dysfonctionnement des cellules iNKT, ainsi que la modulation de CD1d sur les monocytes, sont significativement inversées après chirurgie bariatrique. L'ensemble de ces données (Wilkin C et al., manuscrit soumis) suggère un rôle des monocytes dans la présentation chronique d'antigènes lipidiques par le CD1d, conduisant à l'activation chronique, à l'apoptose et au dysfonctionnement des cellules iNKT dans l'obésité.

## 2. Objectif du mémoire

Ce mémoire constitue la continuité du projet mené par mon laboratoire d'accueil sur l'activation stérile des cellules iNKT du sang périphérique d'individus avec obésité (voir introduction 2.3.4). La corrélation observée entre la surexpression du CD1d sur les monocytes et l'activation et le dysfonctionnement des cellules iNKT suggère une présentation accrue d'antigènes lipidiques endogènes par les monocytes de patients avec obésité. Plusieurs voies pourraient y contribuer telles qu'un stress du RE, une stimulation transcriptionnelle du gène *CD1d* ou encore des modulations des antigènes lipidiques endogènes dans le plasma d'individus avec obésité. Le laboratoire a d'abord testé l'hypothèse du stress du RE. En effet, des macrophages et DCs traités par les 2 inducteurs classiques du stress du RE (thapsigargine et tunamycine) sont capables d'activer les cellules iNKT par un mécanisme impliquant le CD1d<sup>67,79</sup>. Un stress métabolique conduisant à un stress du RE a été décrit dans l'obésité<sup>90</sup>. Parmi les métabolites augmentés dans le sang des patients obèses et capables d'induire un stress du RE se trouvent les FFAs<sup>36</sup>, (Wilkin C. et al. Thèse, 2024). Le laboratoire a confirmé que le traitement avec des acides gras saturés des monocytes THP1 exprimant le transgène CD1d (THP1-CD1d) et différenciés en macrophages avec le PMA induit un stress du RE. De manière intéressante, ce traitement leur confère la capacité d'activer les cellules iNKT par un mécanisme dépendant du CD1d. Le premier objectif de ce mémoire a été (1) de confirmer ces résultats ou non dans les monocytes THP1 différenciés ou non en macrophages ainsi que dans des monocytes et macrophages (MDMs) primaires humains et (2) de tester l'impact de traitements combinant des acides gras saturés et mono-insaturés. La seconde partie du mémoire s'est focalisée sur l'effet des ox-LDLs, fortement étudiés au vu de leur lien avec le développement de l'athérosclérose, maladie cardiovasculaire la plus répandue. Ceux-ci sont également augmentés dans le sang d'individus avec obésité et leurs concentrations sont significativement diminuées après perte de poids associée à une chirurgie bariatrique. Cette partie a été réalisée exclusivement sur monocytes primaires. La stratégie a consisté à traiter ou non les monocytes et/ou macrophages avec un contrôle positif ( $\alpha$ GC), les FFAs ou les ox-LDLs pendant un temps déterminé et, après lavages, de les cultiver avec des cellules iNKT saines pendant 24h. L'activation des cellules iNKT a été évaluée par mesure des cytokines IFN $\gamma$  et IL-4 dans les surnageants de culture par ELISA et des marqueurs d'activation sur les cellules iNKT par cytométrie. La viabilité, le stress du RE et l'expression du CD1d (cytométrie et RT-qPCR) ont été investigués sur les monocytes et/ou macrophages traités.

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1 Solutions

**Solution d'αGC :** l'αGC est un antigène lipidique fort capable d'activer les cellules iNKT via le CD1d . La reconstitution de l'αGC s'est faite par l'ajout de diméthylsulfoxyde (DMSO) (PanReac AppliChem, Darmstadt, Allemagne) à la poudre d'α-GalCer pour atteindre 1 mg/mL. La solution est ensuite chauffée à 80°C et subit une sonication pendant 10 minutes et est stockée à -20 °C jusqu'à utilisation. Avant utilisation, la solution est vortexée pendant 1 minute et chauffée à 80°C pendant 2 minutes avant d'être à nouveau vortexée pendant 1 minute. L'αGC est ensuite dilué à une concentration 2000 ng/mL dans du milieu RPMI-1640 vierge. La solution est à nouveau vortexée une minute, chauffée à 80 °C pendant 2 minutes et finalement vortexée 1 minute. Elle se conserve deux semaines maximum à 4 °C.

**Milieu de culture RPMI :** « *Roswell Park Memorial Institute medium* » 1640 (RPMI). Le milieu complet contient également 10 % de « *Fetal Bovine serum* » (FBS) (Gibco™, MA USA) et 10.000 U/mL de streptomycine-pénicilline (BioWest®, France). Le milieu est ensuite conservé jusqu'à 2 mois à 4 °C.

**Milieu de culture iNKT :** RPMI enrichis de 10 % de FBS (Gibco™, MA USA), de 25 mM de HEPES (Acide 4 -(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique) (Gibco™, MA USA) (#15630-056), de 1mM d'acides aminés essentiels (Gibco™, MA USA) (#11130-036), de 1 mM d'acides aminés non essentiels (Gibco™, MA USA) (#11140-050), de 1 mM de purvate de sodium (Biowest®, France) (#L0642), de 50 µM de 2-mercaptoéthanol (Gibco™, MA USA) (#31350-010), de 10.000 U/mL de streptomycine-pénicilline (Biowest,France) et 2.5 µg/mL d'amphotericin B-funzione (Gibco™, MA USA). Le milieu de culture iNKT est conservé durant 1 mois maximum à 4 °C. Il doit ensuite être supplémenté en rIL-2 humaine (PeproTech®, NJ USA) pour la culture des cellules iNKT. Une fois l'rIL-2 ajouté, le milieu se conserve maximum 2 semaines à 4 °C.

**PBS :** « *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* » (BioWest, France) (#LO615-500).

**Solution de phorbol 12-myristate-13 acétate (PMA) :** Pour reconstituer le PMA à 0.1 mg/mL, la poudre de PMA a été resuspendue dans du DMSO (PanReac AppliChem, Darmstadt, Allemagne), après quoi la solution est vortexée et stockée à -20 °C jusqu'à utilisation. Il a été

utilisé à une concentration de 0.1 µg/mL pour traiter les monocytes THP1 pendant 24h et induire leur différenciation en macrophages (THP1+PMA).

**EDTA** : Solution d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, vwr™, PA USA) concentrée à 0.5 M dans de l'eau distillée. Le pH est ensuite ajustée à 7.4 avec du NaOH et la solution est filtrée à travers un filtre de 0.22 µm. La solution est conservée à 4 °C.

**Tampon « StemCell »** : Solution contenant du PBS (BioWest, France), 2 % de FBS (Gibco™, MA USA) et 1 mM d'EDTA. La solution est conservée à 4 °C jusqu'à utilisation.

**Solution de BSA** : La solution d'albumine de sérum bovin (BSA) (vwr™, PA USA) est concentrée à 2 mg/mL dans du PBS (BioWest, France).

**Solution d'acides gras** : Les acides gras utilisés lors de ce mémoire sont l'acide palmitique (C16:0) (Sigma-Aldrich, MO USA, #O1008), l'acide stéarique (C18:0) (Sigma-Aldrich, MO USA, #S4751) et l'acide oléique (C18:1) (Sigma-Aldrich, MO USA, #P0500). Les acides gras ont d'abord été dissous dans 0.1 M d'hydroxyde de sodium à 37 °C pour C18:1, à 65 °C pour C16:0 et à 75 °C pour C18 :0 pour obtenir des solutions stocks qui ont été gardées à -20 °C pendant un an maximum. Ces stocks à 100 mM ont été mélangés avec 5 % de BSA (Sigma-Aldrich, MO USA, #A8806) afin d'obtenir les solutions d'acides gras qui ont été filtrées par une membrane de 0.2 µm. Les aliquots réalisés sont stockés à -20 °C et décongelés maximum trois fois.

**Détergent MTT** : Solution constituée de 0.01 % de HCl, 10 % SDS et d'eau désionisée.

**Tampon FACS** : PBS (BioWest, France) enrichi avec 3 % de FBS (Gibco™, MA USA).

**Marqueur de viabilité (Zombie NIR™)** : Le zombie NIR™ (Biolegend, CA USA) a été utilisé pour marquer les cellules mortes. Les cellules vivantes, négatives à ce marquage, ont été sélectionnées par FACS.

**Tampon de lyse western blot** : Solution constituée de 50 mM de TRIS HCL (vwr™, PA USA), 150 mM de NaCl (vwr™, PA USA), 1 % d'octylphénoxyéthoxyéthanol (IGEPAL) (Sigma-Aldrich, MO USA), 5 mM d'EDTA (vwr™, PA USA) et 0,1 % de dodécylsulfate de sodium (SDS) (Carl Roth, Allemagne) et 0,5 % de désoxycholate de sodium (NaDC) (Carl Roth, Allemagne). 1 %

de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) (Carl Roth, Allemagne) a été ajouté et 2 % de solution *complete* 50x (Roche, Suisse).

**Gel de concentration western blot (4%) :** Gel composé de 10 % de la solution stock d'acryl/bisacrylamide (40 %, 37,5 :1, Carl Roth Allemagne), 25 % de Tris 1.5 M, pH 8.8 (Fisher bioreagents, KS USA), d'eau, 1 % de SDS (10 %, Carl Roth, Allemagne), 0.75 % de persulfate d'ammonium (APS, Carl Roth, Allemagne) et 0.0375 % de Temed (Fisher bioreagents KS USA).

**Gel de séparation western blot (10%) :** Gel composé de 4 % de la solution stock d'acryl/bisacrylamide (40 %, 37,5 :1, Carl Roth Allemagne), 25 % de Tris 0.5 M, pH 6.8 (Fisher bioreagents, KS USA), d'eau, 1 % de SDS (10 %, Carl Roth, Allemagne), 1 % d'APS (Carl Roth Allemagne) et 0.0375 % de Temed (Fisher bioreagents KS USA).

**Tampon de migration western blot (5X) :** Tampon contenant 2,5 % de SDS (Carl Roth, Allemagne), 15 % de Tris, 36 % de glycine. Le volume est ajusté avec de l'eau distillée.

**Tampon de transfert western blot :** Tampon contenant 1,52 % de Tris, 7,2 % de glycine, 0,05 % de SDS (Carl Roth, Allemagne), 63,2 % de méthanol. Le volume est ajusté avec de l'eau distillée.

**TBS-Tween western blot :** Tampon contenant 0,24 % de Tris, 0,8 % de chlorure de sodium (NaCl), 0,14 % de HCl pour ajuster le pH à 7, 0,11 % de Tween (vwr<sup>TM</sup>, PA USA). Le volume est ajusté avec de l'eau distillée.

**Tampon de chargement 4X (TR 4X) :** Tampon contenant 125 mM à pH 6.8 de TRIS-HCL (vwr<sup>TM</sup>, PA USA), 20 % de glycérol (Fisher bioreagents, KS USA), 4 % de SDS (Carl Roth, Allemagne), 6 % de β-mercaptoéthanol (Carl Roth, Allemagne) et du bleu de bromophénol (Carl Roth, Allemagne).

**Solution de révélation :** Solution contenant du luminol (Carl Roth, Allemagne), de l'acide coumarique (Fisher bioreagents, KS USA) et de peroxyde d'hydrogène (Fisher bioreagents, KS USA).

**Solution STOP ELISA :** Solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Carl Roth, Allemagne) diluée dans de l'eau désionisée à 1 M. La solution est conservée à 4 °C jusqu'à utilisation.

**Tampon WASH ELISA** : Tampon de lavage composé PBS (BioWest, France) et 0.05 % de Tween 20 (vwr™, PA USA) (#23G1856630). La solution est conservée à 4 °C jusqu'à utilisation.

### 3.2 Culture des monocytes THP-1 et macrophages THP1-PMA

Les cellules THP1 sont une lignée de monocytes isolés du sang d'un patient atteint de leucémie monocyttaire aigue. La lignée de THP1 a été cultivée dans du milieu RPMI dans des flasques T75 (Thermofisher, MA USA). Dans la suite du mémoire, le terme RPMI désignera le milieu supplémenté de FBS et antibiotiques. Les cellules ont été maintenues à 37 °C en incubateur humidifié à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été gardées à une concentration comprise entre 0,5x10<sup>6</sup> et 1x10<sup>6</sup> cellules/mL et leur comptage, manuel ou automatique, a été réalisé avec des lames de comptage de Thoma ou avec des lames de comptage automatiques Biorad® respectivement. La différenciation des THP1 en macrophages a été réalisée avec du PMA à 0.1µg/mL pendant 24h. Les puits ont ensuite été lavés avec du PBS et remplis par du milieu frais RPMI. Les cellules étaient prêtes à être utilisées pour les différentes manipulations.

### 3.3 Isolation des PBMCs

À partir d'une prise de sang, le sang récupéré a été dilué 2 fois dans du PBS. Les tubes ont été centrifugés 20 minutes à 1500rpm à température ambiante (RT) avec frein sur 1. À partir d'un buffy coat, le sang récupéré a également été dilué 2 fois. Dans un nouveau tube de 50mL, 25mL de sang dilué ont été ajoutés à 15mL de lymphoprep, de manière à ce que les deux liquides ne se mélangent pas. Les tubes ont été centrifugés 30 minutes à 1200rpm à RT sans frein. La suite est la même dans les deux cas. Le surnageant a été éliminé et l'anneau de PBMCs a été récolté dans un nouveau tube. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et centrifugées dans les mêmes conditions entre les deux lavages. Les cellules ont été resuspendues dans du PBS et comptées afin de les resuspendre dans du milieu RPMI ou du PBS suivant la finalité de la manipulation.

### 3.4 Préparation des MDMs (*monocyte-derived macrophages*)

Les macrophages dérivés de monocytes (MDMs) ont été obtenus à partir de la culture de monocytes isolés des PBMCs par sélection immuno-magnétique positive (StemCell) et cultivés dans du milieu RPM-1640 enrichi à 20% avec du FBS, 100IU/mL de streptomycine (BioWest®),

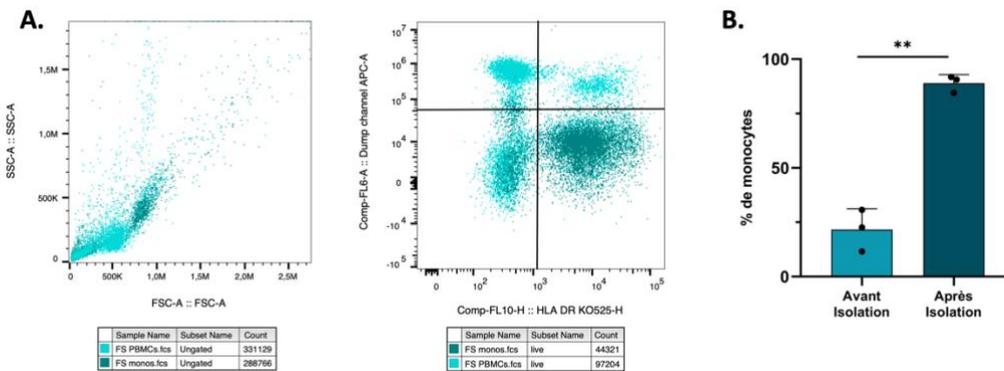
France) et 100ng/mL de M-CSF humain (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) durant 7 jours à 37°C en incubateur humidifié à 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.5 Isolation des monocytes par sélection négative

L'isolation négative des monocytes à partir des PBMCs précédemment obtenus a été réalisée à l'aide du kit *EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 Depletion* (#19058, StemCell) selon les instructions du fabricant. Les PBMCs ont été resuspendus à une concentration de  $5 \times 10^7$  cellules/mL dans du tampon « *StemCell* ». Ensuite, 50 µL d'un cocktail d'anticorps d'enrichissement a été ajouté par mL de suspension cellulaire avant d'incuber 10 min à 4 °C. 50 µL de billes magnétiques ont été ajoutées par mL de suspension cellulaire et le mélange a été incubé 5 min à 4 °C. Le volume a été égalé à 2,5mL avec du tampon « *StemCell* » avant que le tube ne soit positionné dans l'aimant à température ambiante durant 2,5minutes. Finalement, le contenu du tube, toujours dans l'aimant, a été récupéré. Pour augmenter la pureté, deux lavages ont été réalisés en repassant le tube dans l'aimant de la même manière que décrit précédemment. Finalement, 200 µL de monocytes concentrés  $1,25 \times 10^6$  cellules/mL dans du milieu RPMI ont été mis sur une plaque suspension 96 puits à fond rond (Greiner Bio-One, #650185, Autriche) et incubés toute la nuit à 37 °C. Les cellules ont ensuite été traitées comme détaillé ci-dessous.

#### 3.5.1 Pureté des monocytes

La pureté des monocytes a été évaluée par cytométrie en flux directement après leur isolation. Deux échantillons ont été analysés : 1) les PBMCs et 2) les monocytes fraîchement isolés. Afin d'évaluer l'efficacité de l'enrichissement, les cellules ont été marquées aux anticorps permettant d'exclure les lymphocytes T, B et les cellules NK (Dump channel APC, voir marquage des monocytes plus bas) et de sélectionner les cellules positives au marqueur HLA-DR, molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Un contrôle négatif constitué de PBMCs non marqués a été utilisé. Les monocytes ont été défini comme les cellules vivantes (exclusion des cellules mortes et des doublets) positives au HLA-DR (HLA-DR+) et négatives pour le dump channel (APC-). La proportion de monocytes a été déterminée avant et après isolation et exprimée en pourcentage de monocytes vivants (**Figure 12**).

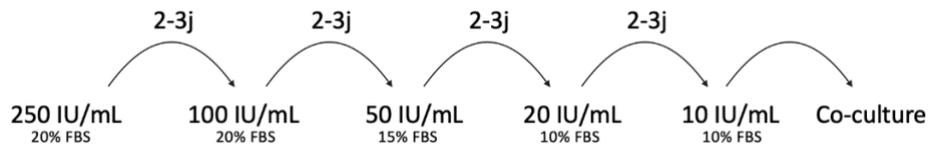


**Figure 12.** Enrichissement des monocytes par sélection négative à partir de PBMCs. Les PBMCs et monocytes isolés ont été marqués aux anticorps dirigés contre le dump channel (APC), HLA-DR et le marqueur de viabilité zombie. **A)** Dot plot de la distribution des PBMCs et des monocytes isolés selon leur taille et leur granulosité. L'analyse des cellules vivantes (exclusion des cellules mortes et des doublets) montre un enrichissement des monocytes après isolation (population APC-/HLA-DR+). L'enrichissement a été quantifié par cytométrie en flux et analysé sur FlowJo™. **B)** Pourcentage de monocytes avant et après isolation. Un t-test a été réalisé. \*\*p<0.01. N=3.

### 3.6 Resting des cellules iNKT

Les cellules iNKT primaires humaines utilisées dans ce mémoire sont issues du même donneur. Elles ont été isolées à partir d'un buffy coat par sélection positive immuno-magnétique puis stimulées par des feeder cells (PBMCs hétérologues irradiés) en présence d'antigène lipidique  $\alpha$ GC avant d'être cultivées en présence d'IL-2 pour induire leur prolifération pendant environ 1 mois. Elles ont ensuite été analysées par FACS pour vérifier leur pureté, comptées et puis congelées.

Avant chaque expérience de co-culture, le nombre requis de cellules iNKT a été décongelé au bain-marie à 37 °C durant une minute puis transféré dans du PBS préalablement chauffé à 37°C. Une fois homogénéisées, elles ont été centrifugées à 1200rpm pendant 5 minutes, avec le frein au minimum, à température ambiante. Le surnageant a été éliminée et les cellules ont été lavées une deuxième fois de la même manière. Après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans du milieu iNKT supplémenté en rIL-2 (250 IU/mL) et FBS pour atteindre une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules/200  $\mu$ L. Finalement,  $2 \times 10^5$  de cellules ont été ajouté dans les puits d'une plaque 96 puits à fond rond. Pour réaliser le « resting », le milieu est changé tous les 2-3 jours pour diminuer progressivement la concentration en rIL-2 tout comme la concentration en FBS (Gibco™, MA USA) (**Figure 13**).



**Figure 13.** Représentation schématique du plan du resting des cellules iNKT depuis leur décongélation jusqu'à la co-culture.

### 3.7 Traitement des cellules co-cultivées avec des cellules iNKT

#### 3.7.1 Traitements aux acides gras

Les cellules (monocytes ou macrophages) ont été traitées pendant 8h avec les acides gras C18:0 (25-50-100-150-200  $\mu$ M), C18:1 (25-50-100-150-200  $\mu$ M), le mix des acides gras C18:0 (50  $\mu$ M) avec C18:1 (25-50-100  $\mu$ M) ou leur véhicule la BSA (25-50-100-150-200 $\mu$ M). À la fin des traitements, les cellules ont été lavées 4 fois au PBS, en éliminant le surnageant suite à une centrifugation de 5 minutes 4° C à 500 g. Les cellules iNKT ont été ajoutées en proportion 1:5 par rapport aux monocytes dans un milieu enrichi en rIL-2 à 10 IU/mL pour une co-culture de 24 h à 37 °C.

#### 3.7.2 Traitement aux ox-LDLs

Les cellules ont été traitées par des ox-LDLs à des concentrations croissantes (0-25-50-100-200  $\mu$ M) pendant 16 h de traitement. À la fin du traitement, les plaques ont été centrifugées (5 minutes à 4 °C à 500 g) et lavés 4 fois avec du PBS avant d'ajouter les iNKT, en proportion 1:5 par rapport aux monocytes, dans un milieu enrichi en rIL-2 à 10 IU/mL . De plus, de l' $\alpha$ -GC (50 ng/mL) a été ajouté dans les puits avant d'incuber à 37 °C pendant 24 h.

Les monocytes ont été récupérés directement après le traitement pour le marquage du FACS, que ce soit dans le cas du traitement aux acides gras ou aux ox-LDLs. Après les 24h de co-culture, les surnageants ont été récupérés pour réaliser l'ELISA et les cellules ont été récupérées pour le FACS. Les cellules iNKT sont gardées dans des Eppendorfs à 4 °C jusqu'au marquage le lendemain tandis que les surnageants sont congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation pour l'ELISA.

### 3.8 Test de viabilité

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test au 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Le MTT est converti en cristaux de formazan, de couleur violette, par la mitochondrie chez les cellules vivantes. Le milieu est enlevé et remplacé par 100  $\mu$ L de

milieu frais et 20 µL de MTT. La plaque est incubée 4h à 37°C. Ensuite, 100 µL de détergent MTT ont été ajoutés dans chaque puit, afin de permettre la dissolution des cristaux. Finalement, la plaque a été incubée une nuit à 37°C. La lecture de l'absorbance a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre SpectraMax® Plus (Molecular Devices, CA, USA, #MNRO7963) à 570nm et 690nm avec le programme SoftMax® Pro (v7.0.2, Molecular Devices, CA, USA). L'absorbance réelle est obtenue en soustrayant la valeur à 570nm par celle à 690nm ainsi que la valeur du blanc. La viabilité est finalement calculée avec la formule suivante, avec le contrôle négatif étant le puit contenant des cellules non traitées :

$$\text{Viabilité (\%)} = 100 \times \frac{\text{Moyenne absorbance cellule}}{\text{Moyenne absorbance contrôle négatif}}$$

### 3.9 Cytométrie en flux

Après traitement, l'expression de différents marqueurs à la surface des cellules (monocytes ou cellules iNKT) a été réalisée à l'aide du Cytotflex2 V5-B5-R3 (#B53000). Les données brutes obtenues ont été analysées sur le logiciel FlowJO™ (v10.4, BD Life Science, NJ, USA). La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse de cellules uniques en solution. Elle utilise des lasers permettant d'exciter des fluorochromes et de détecter l'émission de cette fluorescence via des détecteurs qui les convertissent en signaux électriques analysables<sup>92</sup>. La diffusion de la lumière émise est mesurée de manière frontale, « *Forward Scatter* » (FSC), et latéralement à 90°, « *Side Scatter* » (SSC), ce qui détermine la taille et la granulosité de la cellule, respectivement. Les cellules marquées avec des anticorps couplés à des fluorochromes permettent d'étudier l'expression des marqueurs. Deux panels ont été utilisés lors de ce mémoire, dont un qui a été mis au point. Chaque panel permet l'analyse d'une classe cellulaire à savoir les monocytes et les cellules iNKT. Lors de la mise au point d'un panel, il y a 3 grandes étapes à suivre, à savoir : 1) les compensations, 2) la titration et 3) les contrôles *fluorescence minus one* (FMO).

#### 3.9.1 Compensation

Chaque fluorochrome couplé à un anticorps possède un spectre d'excitation et un spectre d'émission. Le choix des anticorps lors de la création d'un panel doit prendre en compte ces spectres pour éviter au maximum le chevauchement des spectres d'émission. Cependant, il reste tout de même généralement un chevauchement spectral qui mène à un signal

difficilement interprétable. Afin de remédier à cette interférence, une étape de compensation est indispensable. Elle permet d'isoler le signal propre à chaque fluorochrome, grâce à la soustraction mathématique des signaux indésirables des autres. Pour cela, un échantillon de billes de compensation UltraComp eBeads™ (Invitrogen™, MA, USA) a été marqué pour chaque fluorochrome de manière individuelle. Une goutte de bille a ainsi été mélangée à 1 µL d'un anticorps conjugué à son fluorochrome. Les tubes ont été incubés pendant 10 minutes à 4°C dans l'obscurité avant l'ajout de tampon FACS.

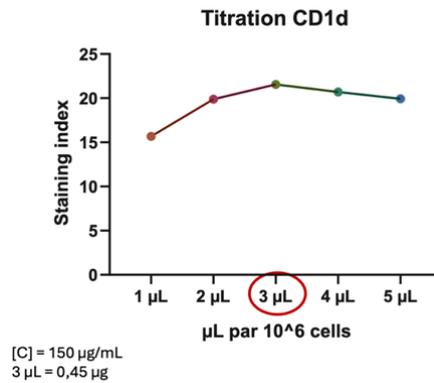
La création de la matrice de compensation commence par le réglage des voltages pour chaque anticorps à l'aide de cellules marquées (cf. paragraphe suivant). Une fois cette étape faite, chaque échantillon marqué avec 1 fluorochrome est passé individuellement afin que le cytoflex puisse calculer la matrice de compensation.

### 3.9.2 Titration des anticorps

Une titration des anticorps a été réalisée afin d'optimiser la quantité d'anticorps à utiliser pour maximiser le signal et minimiser le bruit de fond. Pour ce faire, un volume de 1 à 5 µL a été ajouté par millions de cellules marquées. Pour chaque volume d'anticorps, l'intensité médiane de fluorescence (MFI) des cellules positives et négatives a été déterminée via le logiciel FlowJO™ (v10.4, BD Life Science). Ceci a permis le calcul du « *Staining Index* » (SI) avec la formule suivante :

$$SI = \frac{MFI(\text{positives}) - MFI(\text{négatives})}{2 \times SD(\text{négatives})}$$

Le SI permet de connaître la quantité d'anticorps optimale à utiliser. En effet, un SI élevé montre que l'intensité des cellules positives est distincte des cellules négatives, ce qui permet une meilleure discrimination entre les deux. L'exemple choisi est celui de l'anticorps anti-CD1d dont la titration a permis de déterminer que 3 µL par millions de cellules était la quantité optimale à utiliser. Ceci a été réalisé pour chaque anticorps utilisé.



**Figure 14.** Staining Index obtenu pour l'anticorps anti-CD1d.

### 3.9.3 FMO

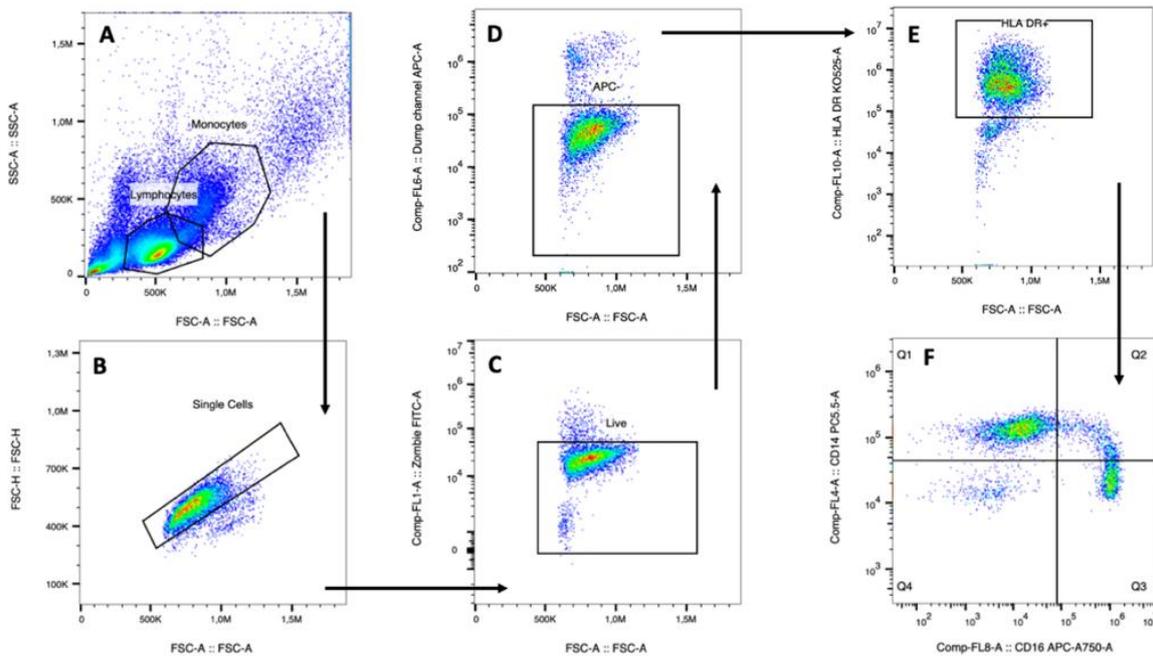
La FMO est utilisée comme contrôle pour déterminer le seuil de positivité d'un marqueur, en prenant en compte l'influence de l'environnement. Chaque échantillon contient tous les anticorps du panel sauf un, celui qui est évalué. Le FMO tient compte de la perte de résolution due aux compensations, et permet ainsi de délimiter exactement les populations positives des populations négatives.

### 3.9.4 Les panels

- **Monocytes**

La stratégie de gating utilisée pour les monocytes repose d'abord sur leur sélection en fonction de leur taille (FSC-A) et granulosité (SSC-A) ce qui permet de discriminer les populations cellulaires, les monocytes étant des cellules plus granuleuses et plus grandes que les lymphocytes (**Figure 15.A**). Les doublets ont ensuite été éliminés en regardant la taille des cellules (**Figure 15.B**). Ensuite, les cellules vivantes ont été sélectionnées, elles sont négatives au marqueur de viabilité Zombie Green (**Figure 15.C**). Ensuite, les cellules négatives aux marqueurs CD3, CD19 et CD56 (APC) sont sélectionnées (**Figure 15.D**). La sélection des cellules positives à l'antigène leucocytaire humain (HLA-DR) (**Figure 15.E**) permet de confirmer la sélection des monocytes. Finalement, les différentes sous-populations de monocytes sont identifiées en fonction de l'expression des marqueurs CD14 et CD16 (**Figure 15.F**). Le quadrant 1 (Q1) représente la population de monocytes classique, le Q2 représente les monocytes intermédiaires et le Q3 les monocytes non-classiques.

Les anticorps utilisés dans ce panel sont repris dans la **Table 2**.



**Figure 15.** Stratégie de gating utilisée pour sélectionner les monocytes. **A)** Sélection des monocytes. **B)** Suppression des doublets. **C)** Sélection des cellules vivantes. **D)** Élimination des lymphocytes. **E)** Sélection des cellules positives au HLA-DR.

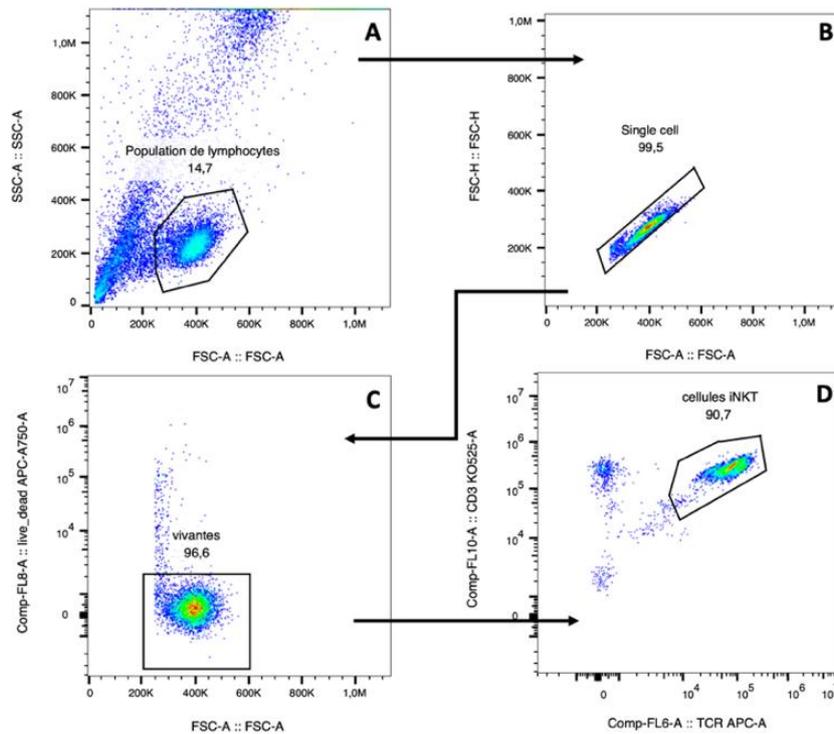
**Table 2.** Liste des anticorps utilisés pour les monocytes.

Anticorps	Fluorochrome	Firme	Clone	Volume/ 1x10 <sup>6</sup> cellules	Référence
CD1d	BV421	Biolegend	51.1	3 µL	350316
CD3	APC	Biolegend	HIT3a	3 µL	300312
CD19	APC	Biolegend	4G7	4 µL	392504
CD56	APC	Biolegend	5.1H11	2.5 µL	362504
HLA DR	BV510	Biolegend	L243	4 µL	307646

- **Cellules iNKT**

La stratégie de gating des cellules iNKT commence par la sélection des lymphocytes en regardant la granulosité (SSC-A) en fonction de la taille (FSC-A) (**Figure 16.A**). Ensuite, l'élimination des doublets et des cellules mortes se fait de la même manière que décrite pour les monocytes (**Figure 16.B**), mais le marqueur de viabilité est le Zombie NIR™ (**Figure 16.C**). Enfin, les cellules positives aux CD3 et TCR sont les cellules iNKT (**Figure 16.D**).

Les anticorps utilisés dans ce panel sont repris dans la **Table 3**.



**Figure 16.** Stratégie de gating utilisée pour sélectionner les cellules iNKT. **A)** Sélection des lymphocytes. **B)** Suppression des doublets. **C)** Sélection des cellules vivantes. **D)** Population de cellules iNKT positive au marqueur CD3 et TCR.

**Table 3.** Anticorps utilisés pour les cellules iNKT.

Anticorps	Fluorochrome	Firme	Clone	Volume/ 1x10 <sup>6</sup> cellules	Référence
CD3	BV510	Biolegend	UCHT1	3 µL	300448
Vα24Jα1 8 (TCR)	APC	Biolegend	6B11	5 µL	342932
CD25	PE/Cy7	Biolegend	BC96	5 µL	302612
CD69	FITC	Biolegend	FN50	5 µL	310904

### 3.9.5 Marquage des cellules pour la cytométrie

A la fin des traitements, les cellules ont été récupérées dans du PBS. Les cellules iNKT étant en nombre faible dans nos échantillons, 0,5x10<sup>6</sup> de THP1 préalablement tuées par choc thermique (20 min à 65°C puis placée sur glace) ont été ajoutées à nos échantillons. Pour tous types cellulaires, les tubes ont été centrifugés à 500g à 4°C pendant 5 min et le surnageant a été éliminé. Ensuite, 0,15 µL de zombie NIR ou Green ont été ajoutés par million de cellules, aux cellules iNKT ou aux monocytes respectivement, avant d'être vortexés. Les échantillons ont été incubés dans le noir à température ambiante pendant 20 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées avec du tampon FACS en centrifugeant 5 minutes à 500g à 4°C. après élimination du surnageant, les anticorps ont été ajoutés suivant les valeurs reprises dans les **Tables 2**

(monocytes) et **3** (cellules iNKT). Les cellules ont été vortexés avant d'être incubées pendant 20 minutes à 4°C dans le noir. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS de la même manière que mentionnée précédemment. Finalement, les cellules ont été resuspendues dans 100µL de PBS. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

### 3.10 Western Blot

Des Western Blot (WB) ont été réalisés dans le but de déterminer l'expression de la protéine XBP1s, qui provient de l'ARNm *XBP1U* épissé en *XBP1s* par l'endoribonucléase IRE1, activée en réponse au stress du RE.

#### 3.10.1 Lyse des cellules

A la fin des traitements aux acides gras saturés (C16:0, C18:0) et insaturé (C18:1) ou la BSA, le véhicule, les cellules ont été lysées afin de récupérer les extraits protéiques. Après avoir lavé les cellules avec du PBS, 50 et 100 µL de tampon de lyse a été ajouté. Ensuite, la lyse a été poursuivie manuellement à l'aide d'un grattoir. Le contenu du puit a été récupéré, vortexé et laissé sur glace pendant 10 minutes avant d'être centrifugé 15 minutes à 4 °C à 21130g. Le surnageant contenant les protéines a finalement été récupéré.

#### 3.10.2 Dosage protéique

Le dosage protéique a été réalisé à l'aide du kit Biorad® (Bio-Rad Laboratories, CA, USA, #5000116). Une courbe étalon a été réalisée avec comme standard de la BSA à 2 mg/mL et quand l'échantillon a été dosé à partir d'un volume de 1 µL. Le dosage a été réalisé conformément aux instructions du fabricant. La mesure de l'absorbance a été mesuré à 750 nm. Les WB ont été réalisés avec 50 ou 75 µg de protéine.

#### 3.10.3 Migration

Du tampon de chargement 4X est ajouté à chaque échantillon dans une proportion 1 :4 et chauffé à 95 °C pendant 3 minutes puis mis sur glace. La migration se fait dans un tampon de migration à 70 V dans le gel de concentration et à 120V dans la seconde partie du gel.

#### 3.10.4 Transfert sur la membrane

Une fois la migration terminée, le gel est récupéré pour que les protéines puissent être transférées sur membrane PVDF (Amersham™ Hybond P 0.45, #10600023), préalablement activée celle-ci dans du méthanol. Le transfert a lieu durant 2 h à à 200 mA dans du tampon de

transfert. Pour vérifier la présence des protéines à la fin du transfert, la membrane a été colorée au rouge Ponceau.

### 3.10.5 Saturation au lait de la membrane

Afin de ne pas avoir de marquage non-spécifique, la membrane a été saturée avec une solution de lait 10% diluée dans du TBS Tween durant 45 minutes à température ambiante ou à 4 °C pendant la nuit.

### 3.10.6 Marquage aux anticorps

La membrane a été ensuite marquée avec des anticorps primaires, anti-XBP1s pour notre protéine d'intérêt et anti-Hsp90 comme contrôle de charge, dilué 1:1000 dans du lait 3% durant 2h à température ambiante. La membrane est lavée avec du TBS-Tween trois fois pendant 5 min avant d'être marquée avec l'anticorps secondaire dilué à 1:4000 durant 1 h à température ambiante. La membrane est lavée dans du TBS-Tween trois fois pendant 8 min avant de révéler. Les anticorps primaires utilisés sont repris dans l'**annexe 1**. L'anticorps secondaire utilisé était un anticorps anti-lapin (Cell Signalling, IgG, MA USA).

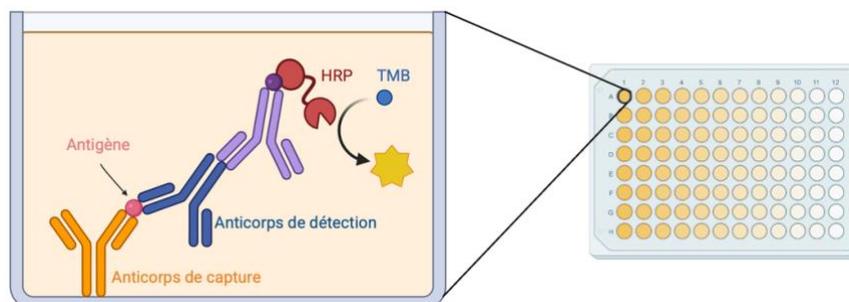
### 3.10.7 Révélation

La révélation est réalisée avec une solution de luminol-Tris + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui produit un signal chimio-luminescent et mesuré à l'aide du logiciel ImageQuant800 Amersham (Cytiva, MA USA). Les WB ont été quantifiés à l'aide du programme ImageQuant™ TL.

## 3.11 Test ELISA

La technique d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA) en sandwich est une technique largement utilisée pour la quantification de diverses molécules dont des cytokines. Le principe repose sur la liaison d'un anticorps de capture dans le fond du puit d'une plaque auquel l'antigène peut se lier et peut lui-même être reconnu par un anticorps de détection. Finalement, un anticorps couplé à une enzyme, la « *horseradish peroxidase* » (HRP) est capable de s'attacher à l'anticorps de détection. L'enzyme permet d'oxyder le 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) ce qui confère une coloration bleue dont l'intensité est directement dépendante de la quantité d'anticorps de détection lui-même lié à l'antigène. La réaction est arrêtée avec la solution STOP ELISA. L'ELISA a été utilisée pour détecter l'expression d'IFN $\gamma$  (Invitrogen, MA USA, #88-7316-88) ou l'IL-4 (Invitrogen, MA USA, #88-7046-88) humain dans le surnageant provenant de la co-

culture entre les cellules traitées et les cellules iNKT. Les kits mentionnés ont été utilisés conformément aux instructions du fabricant. L'absorbance a été mesurée sur le spectrophotomètre SpectraMax® Plus (Molecular Devices, CA, USA, #MNRO7963) à 570 nm et 690 nm avec le programme SoftMax® Pro (v7.0.2, Molecular Devices, CA, USA).



**Figure 17.** Représentation schématique de l'expérience ELISA. Figure créée via Biorender.com

### 3.12 RT-qPCR sur monocytes primaires

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative après transcription inverse (RT-qPCR) a été réalisée dans le but de quantifier l'expression de certains gènes en fonction de nos conditions expérimentales.

#### 3.12.1 Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN a été réalisée avec le protocole « *RNA extraction with Trizol* » (Immgen.org). Les cellules ont été récupérées dans des tubes directement après les traitements et centrifugées 30 secondes à 500 g à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans du Trizol, incubées 5 min à température ambiante et congelées à -80 °C pendant au moins 1 h. Les échantillons ont été décongelés à température ambiante et du chloroforme a été ajouté. Après avoir mélangés et attendus 2 à 3 min, les échantillons ont été centrifugés 15 min à 12000 g à 4 °C. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube et du GlycoBlue suivi par de l'isopropanol ont été ajoutés et le tout a été incubés 1 h à -20 °C. Les échantillons ont été centrifugés 20 min à 12000g à 4°C après quoi le surnageant a été enlevé avant l'ajout d'éthanol 75%. Finalement, une centrifugation de 15 min à 7400 g à 4 °C a permis d'éliminer l'éthanol et les échantillons ont été séchés à l'air pendant 1 h avant d'être resuspendus dans de l'eau *Nuclease free*. La quantification de la quantité d'ARN a été réalisée au NanoPhotometer® N60 (Implen, Allemagne).

### 3.12.2 Transcription inverse (RT) de l'ARN en ADNc

La RT de l'ARN a permis d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc) destiné à l'amplification par PCR. La RT a été effectuée à l'aide du kit « *RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis kit* » (ThermoScientific, #2730090) et les instructions du fabricant ont été suivies. L'ARN dilué (entre 9 et 22,5 ng/mL) a été mélangé à une solution contenant des amorces aléatoires, des désoxynucléotides triphosphates (DNTPs), un tampon de réaction, un inhibiteur de RNAses et une transcriptase inverse. Le mélange a ensuite été incubé 5 minutes à température ambiante, puis 60 minutes à 42°C, et enfin chauffé à 70°C pendant 5 minutes. Les échantillons d'ADNc ont été conservés à 4°C avant de débiter la PCR ou à -80°C pour un stockage à long terme.

### 3.12.3 PCR quantitative

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet de mesurer l'expression des gènes d'intérêt. 10 ng d'ADNc préalablement dilué ont été mélangés au Mastermix contenant en proportion 1:5 les amorces spécifiques des gènes ciblés (CD1d, *PPAR* $\gamma$ , FABP4, TGM2 et CD36) ainsi que l'agent intercalant SYBR green « *Takyon<sup>TM</sup> No ROX SYBR MasterMix Blue dTTP* » (Eurogentec, #EUK272). Les réactions ont été préparées dans une plaque PCR 384 puits. La dénaturation a démarré à 95 °C pendant 3 min, suivie par l'amplification (45 cycles) 95 °C pendant 10 s et l'hybridation/élongation à 60 °C pendant 45 s (l'acquisition des données) et finalement l'étape de fusion durant laquelle le produit PCR est chauffé à 95 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 30 s et 97 °C. L'acquisition des données sur la machine LightCycler®480 II (Roche Diagnostics, Suisse), et leur analyse ont été effectuées à l'aide du logiciel « *LightCycler®480 Software* » (version 1.5.1.62 SP3).

Les amorces spécifiques des gènes ciblés se trouvent dans l'**Annexe 2**.

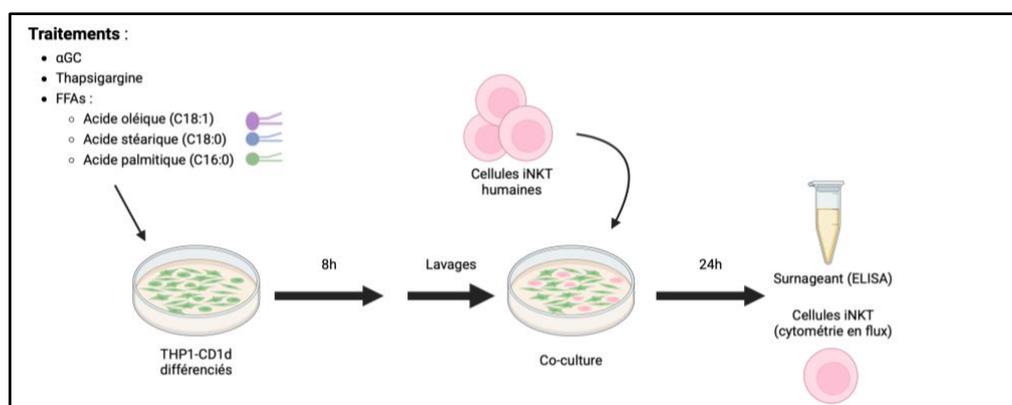
### 3.13 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 10.3.1 (464)). Un test Shapiro-Wilk a permis de vérifier la normalité des données afin de poursuivre avec des tests paramétriques lorsque la distribution était normale, ou non-paramétriques lorsqu'elle ne l'était pas. Des t-tests ainsi que des tests ANOVA ou Kruskal-Wallis ont été réalisés selon la distribution des données. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs pour une valeur de  $p \leq 0.05$ .

## 4. Résultats

### 4.1 Résultats préliminaires du laboratoire

Pour tester l'hypothèse qu'un stress du RE induit par les FFAs au sein des APCs pourrait contribuer à l'activation chronique des cellules iNKT dans l'obésité, le laboratoire a tout d'abord utilisé la lignée de monocytes THP1<sup>93</sup> exprimant le transgène *CD1d* après différenciation en macrophages à l'aide du PMA. Le schéma expérimental de l'expérience est montré à la figure 18. Les macrophages (THP1-CD1d)+PMA ont été traités pendant 8h avec un inducteur classique du stress du RE (thapsigargine, 50 nM) ou son véhicule (DMSO), l'antigène lipidique  $\alpha$ GC (100 ng/mL) ou son véhicule (RPMI), deux SFAs (200  $\mu$ M), stéarate (C18:0) ou palmitate (C16:0) ou le MUFA oléate (C18:1, 200  $\mu$ M) ou leur véhicule (BSA). Après plusieurs lavages, les macrophages ont été co-cultivés avec des cellules iNKT primaires pendant 24h (rapport macrophages/iNKT : 3/1). L'activation de ces dernières a été évaluée dans le surnageant par la mesure de la production de l'IFN $\gamma$  ou par l'expression du marqueur d'activation CD25 par cytométrie en flux.

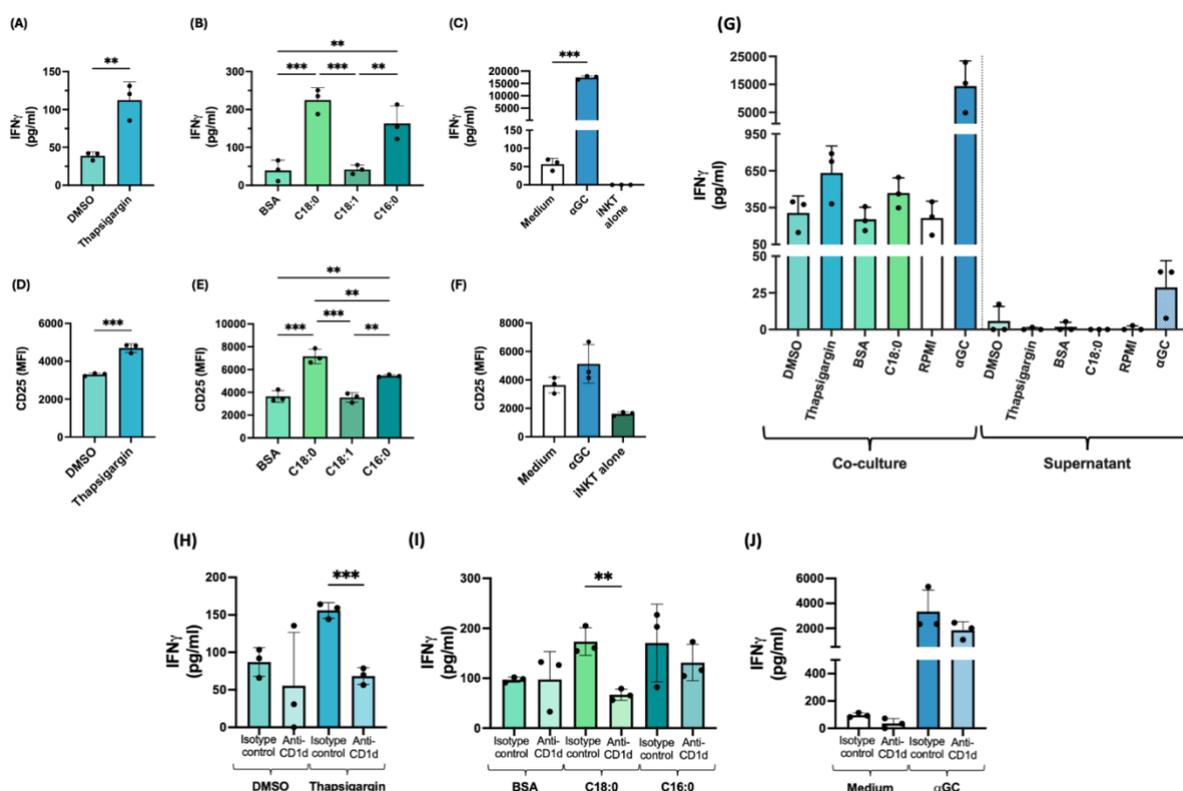


**Figure 18.** Schéma expérimental des expériences de co-culture des macrophages avec les cellules iNKT. Figure adaptée de la thèse de C. Wilkin (2024).

Le développement d'un stress du RE après traitement avec la thapsigargine, le C18:0 et C16:0 mais pas après C18:1 a été confirmé dans ces expériences (données non montrées). Les résultats montrés à la figure 19 confirment que la thapsigargine (**Figure 19.A, 19.D**) et l' $\alpha$ GC (**Figure 19.C**) induisent une activation indirecte des cellules iNKT après leur co-culture avec les macrophages traités. De manière intéressante, les SFAs contrairement au MUFA ont également

pu conférer aux macrophages la capacité d'activer les cellules iNKT (**Figure 19.B, 19.E**). Les cellules iNKT seules, quant à elles, ne produisent pas d'IFN $\gamma$ .

Afin d'exclure un éventuel effet médié par des facteurs solubles telles que des cytokines produites par les macrophages traités, les surnageants des macrophages traités pendant 8h puis lavés et remis en culture seuls pendant 24h ont été récupérés et utilisés comme milieu de culture pour les cellules iNKT pendant 24h. Les résultats confirment bien que les cellules iNKT n'ont pas été activées sans co-culture, à l'exception du surnageant provenant du traitement à l' $\alpha$ GC, bien que l'activation soit au moins 100 fois plus faible, ce qui reste négligeable (**Figure 19.G**). Finalement, l'activation des cellules iNKT passe bien par la présentation d'antigène lipidique via le CD1d comme le confirment les résultats utilisant des anticorps bloquant le CD1d. En effet, la production d'IFN $\gamma$  est revenue à un niveau basal dans le cas de la thapsigargine (**Figure 19.H**) et du C18:0, avec une activation maintenue pour le C16:0 (**Figure 19.I**) lorsqu'un anticorps bloquant a été ajouté.



**Figure 19.** Les acides gras saturés confèrent aux macrophages (THP1-CD1d) + PMA la capacité d'activer les cellules iNKT. Données provenant de la thèse de Wilkin C. (2024). Des analyses statistiques ont été réalisées sur les données selon leur distribution et le nombre de groupes comparés. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. \*\*p  $\leq$  0,01 ; \*\*\*p  $\leq$  0,001.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les SFAs sont capables de conférer aux macrophages (THP1-CD1d)+PMA la capacité d'activer les cellules iNKT par un mécanisme impliquant la présentation d'antigènes lipidiques via le CD1d.

La première partie de mon mémoire a été consacrée à conforter ces résultats sur d'autres lignées de monocytes/macrophages ainsi que sur macrophages et monocytes primaires humains.

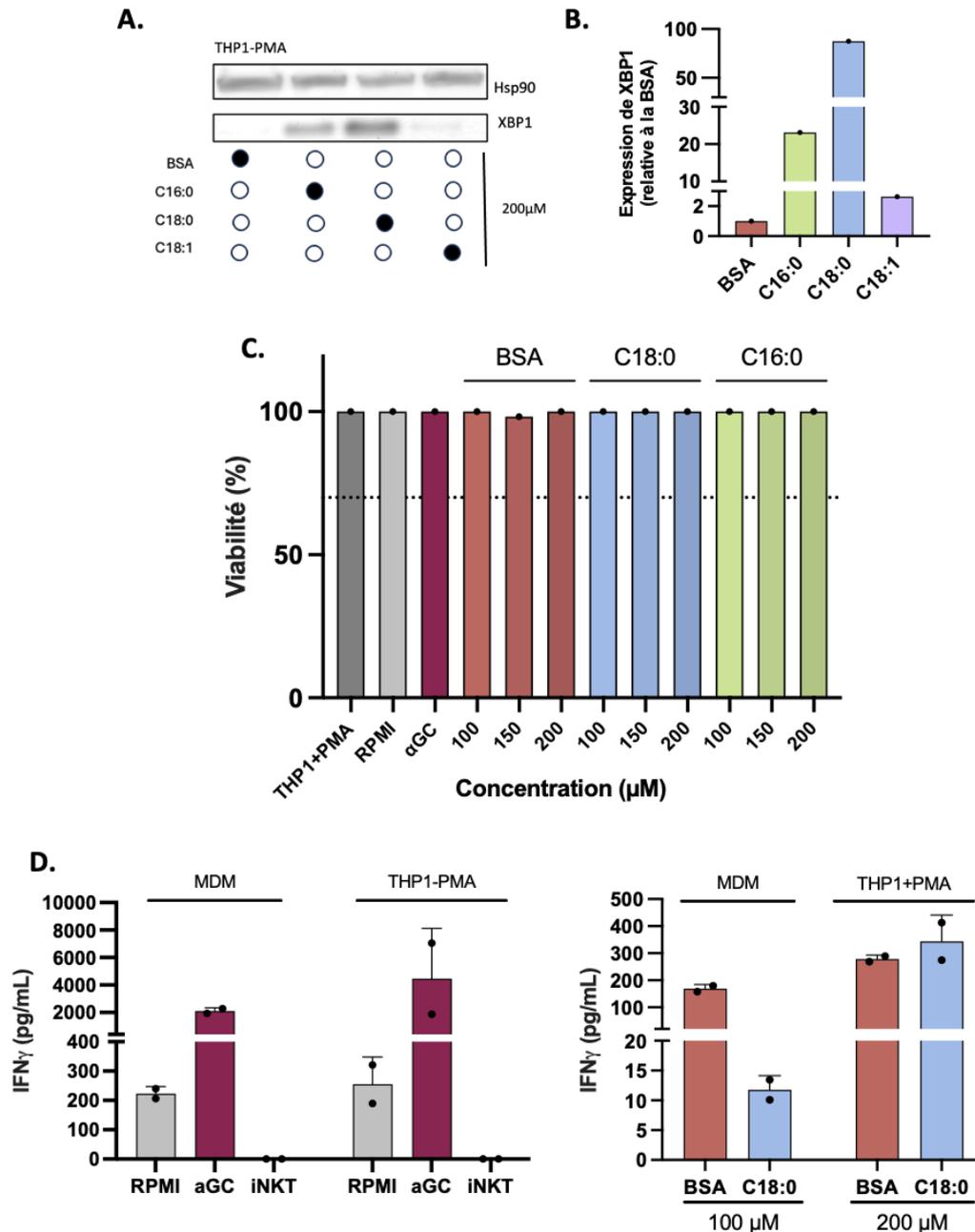
## 4.2 Effet des acides gras libres sur la capacité des monocytes/macrophages d'activer les cellules iNKT.

### 4.2.1 Les macrophages THP1+PMA et MDMs

Les macrophages dérivés de la lignée monocyttaire THP1 d'origine n'expriment pas le transgène *CD1d* mais des niveaux plus faibles de CD1d endogène comme les MDMs ou macrophages primaires humains dérivés de monocytes.

Notre laboratoire a montré que les SFAs sont capables d'induire un stress au niveau du RE dans les macrophages THP1+PMA et MDMs en induisant une saturation et rigidification des membranes cellulaires<sup>35,94</sup>. Le traitement des macrophages THP-1+PMA pendant 8h avec le C18:0 (200 µM) et C16:0 (200 µM) mais pas avec le C18:1 (200µM) a bien induit un stress du RE comme démontré par l'accumulation de la protéine XBP1s issue de l'épissage de l'ARNm *XBP1* par l'endoribonucléase IRE1, contrairement au C18:1 (200 µM) (**Figure 20.A**). La quantification a permis de confirmer que cette expression était presque 90 fois plus importante que le niveau basal représenté par la BSA (**Figure 20.B**). La viabilité des macrophages THP1+PMA a également été mesurée à trois concentrations (100, 150 et 200µM) (**Figure 20.C**). Les résultats ne montrent aucune mortalité significative après 8h, même aux plus hautes concentrations.

Afin d'étudier l'effet des FFAs sur la capacité des macrophages THP1+PMA et MDMs à activer les cellules iNKT, et surtout de voir si ces effets sont semblables en fonction des macrophages utilisés, des essais de co-culture ont été réalisés selon le schéma expérimental de la **figure 18**. Les macrophages THP1-PMA et MDMs ont été traités durant 8h avec le C18:0 en concentration de 200 µM et 100 µM, respectivement, avant d'être lavés et mis en co-culture avec des cellules iNKT durant 24h. Les surnageants ont été récupérés afin de mesurer la quantité produite d'IFN $\gamma$



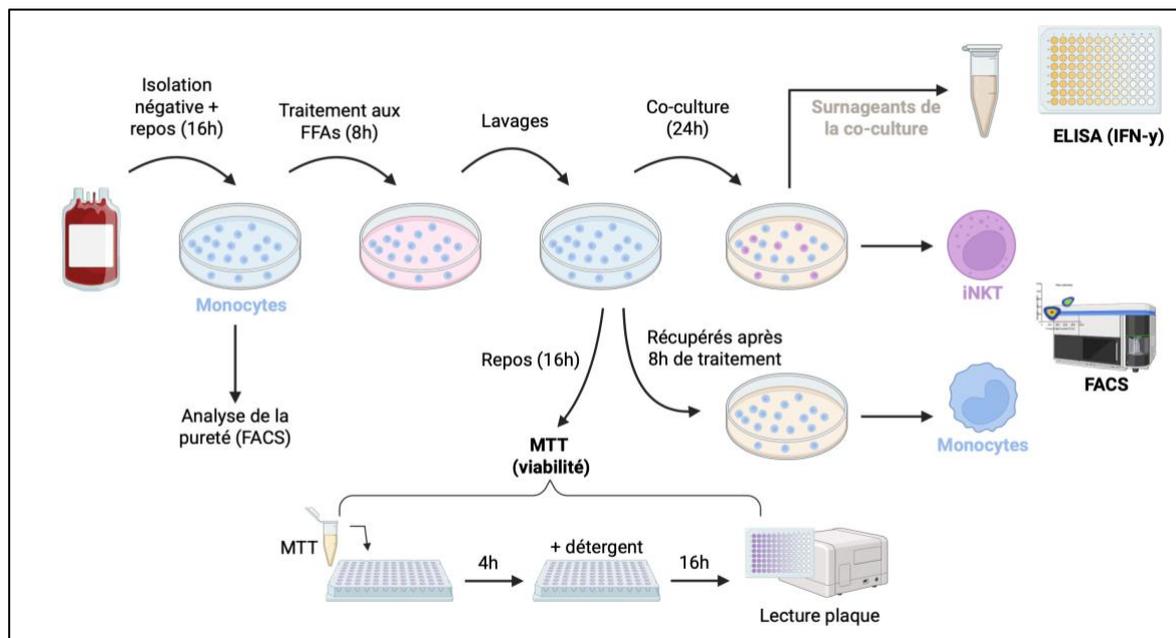
**Figure 20.** Impact des SFAs sur la capacité des macrophages THP-1+PMA et MDMs sur leur capacité à activer les cellules iNKT après co-culture **A)** Western blot montrant l'expression de XBP1s et de HSP90, le contrôle de charge, dans les cellules THP1+PMA traitées pendant 8 h avec 200 μM de C16:0, C18:0, C18:1 et la BSA. **B)** Quantification de l'expression de XBP1s. L'expression de XBP1s a été normalisée en rapportant les valeurs de quantification à celles de HSP90 utilisé comme contrôle de charge et en fixant la condition BSA à une valeur de référence égale à 1. **C)** Viabilité (test MTT) des macrophages THP1-PMA après traitement de 8h avec des concentrations croissantes de BSA, C18:0 et C16:0 (100, 150, 200 μM). Les THP1+PMA représentent les macrophages seules sans co-culture. **D)** Production d'IFN $\gamma$  par les cellules iNKT seules ou co-cultivées pendant 24 h avec les MDMs ou les macrophages THP1-PMA non traités (RPMI), stimulés avec l' $\alpha$ GC ou traités avec la BSA ou le C18:0 (100 μM ou 200 μM, respectivement). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type. N=2.

par test ELISA. Comme attendu, les cellules iNKT seules ne produisent pas d'IFN $\gamma$ . Leur co-culture avec les macrophages non traités (RPMI) induit une légère production d'IFN $\gamma$  qui est fortement stimulée lorsque les macrophages sont prétraités avec l' $\alpha$ GC (**Figure 20.D**). Étonnamment, le traitement avec le C18:0 (200  $\mu$ M) des macrophages THP1+PMA semble induire une légère activation des cellules iNKT alors que celui des MDMs avec le C18:0 (100  $\mu$ M) induit une diminution de la production d'IFN $\gamma$  par les iNKT après co-culture (**Figure 20.D**).

En somme, ces résultats montrent l'induction du stress du RE par les acides gras saturés, ce qui est mesurable via l'expression de XBP1s, sans compromettre la viabilité cellulaire. Ils révèlent également la réponse différente des cellules iNKT selon le type de macrophages utilisés, soulignant déjà l'importance du contexte cellulaire.

#### 4.2.2 Les monocytes THP1 et monocytes primaires

L'attention a ensuite été portée sur les monocytes, en utilisant le modèle THP1 et les monocytes primaires. Les monocytes sont les APCs du sang périphérique les plus abondantes. Des résultats antérieurs du laboratoire ont démontré que les niveaux de CD1d étaient augmentés à la surface des monocytes des patients obèses (Wilkin C. et al., Thèse 2024). Par conséquent, les monocytes pourraient contribuer à l'activation chronique des cellules iNKT dans l'obésité.

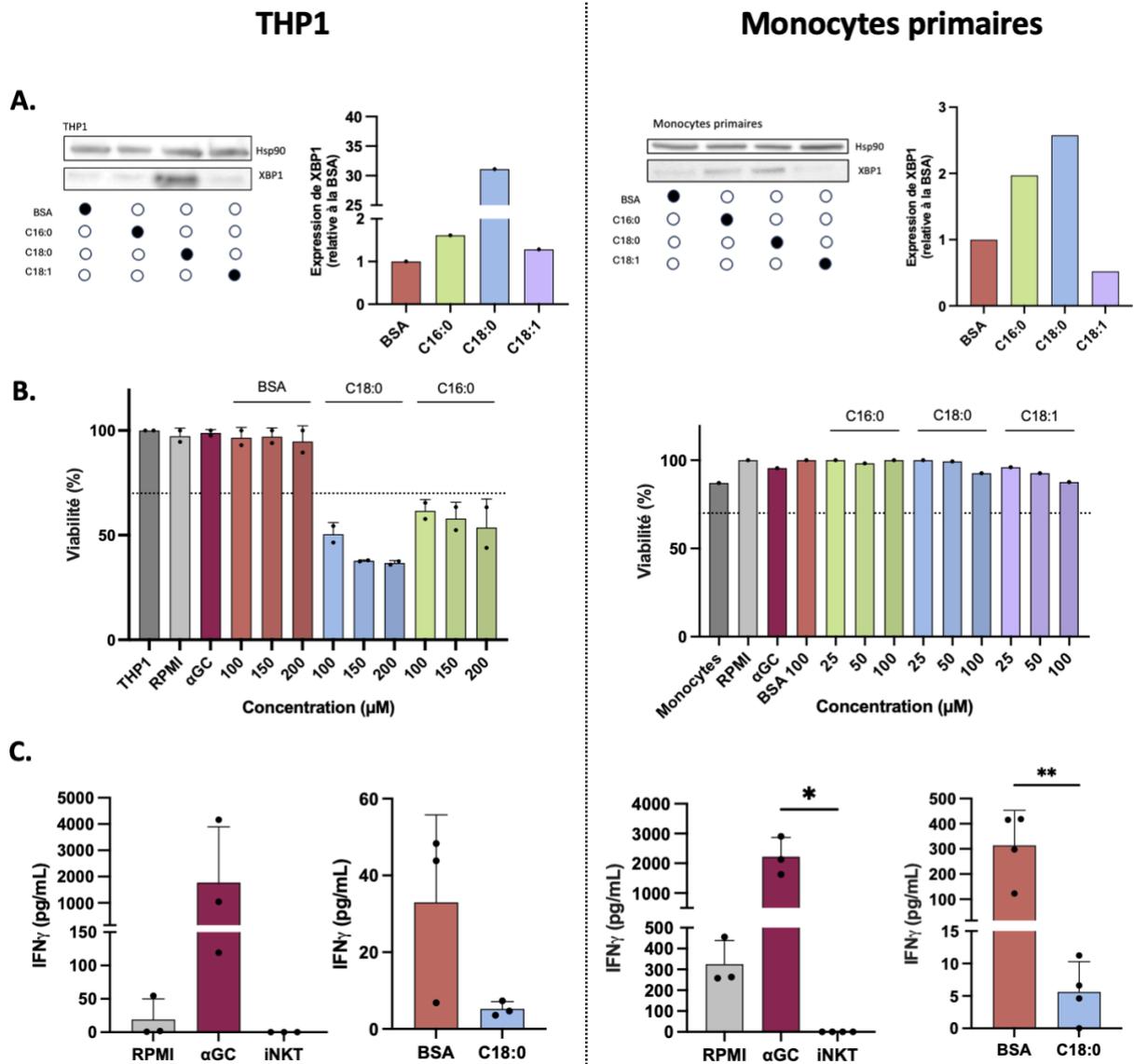


**Figure 21.** Schéma expérimental des expériences de co-culture des monocytes avec les cellules iNKT.

Tout d'abord, l'induction d'un stress du RE à la suite du traitement des monocytes avec les FFAs a été déterminée. Les cellules ont été traitées durant 8h avec 200  $\mu$ M de C18:0, C16:0 et C18:1, ainsi qu'avec leur véhicule (BSA). Les cellules ont été lavées et lysées pour récupérer le contenu protéique. Les analyses par WB ont révélés une activation modérée du stress du RE sur monocytes THP1, particulièrement après traitement avec le C18:0 (**Figure 22.A**). La quantification de l'expression de XBP1s a montré une augmentation d'environ 30 fois par rapport au contrôle BSA (**Figure 22.A**). Toutefois, l'analyse de la viabilité cellulaire réalisée 16h+20h après les lavages a mis en évidence une cytotoxicité notable dès 100  $\mu$ M de C18:0, avec un taux de survie inférieur à 70 %, soit en dessous du seuil admis pour considérer les cellules comme viables (**Figure 22.B**). Des expériences de co-culture ont été réalisées avec les cellules iNKT après avoir traité ou non les monocytes THP1 avec l' $\alpha$ GC, le C18:0 ou la BSA (200  $\mu$ M) durant 8h. Après 24h de co-culture, les surnageants ont été récupérés afin de mesurer la production d'IFN $\gamma$ . Comme attendu, une forte activation a été observée avec le contrôle positif ( $\alpha$ GC) par rapport à la condition RPMI et aux cellules iNKT seules. Le traitement des monocytes avec le C18:0, quant à lui, semble avoir un effet inhibiteur sur l'activation des cellules iNKT (**Figure 22.C**).

Les résultats sur monocytes primaires montrent une très légère augmentation de l'expression de XBP1s après traitement avec le C18:0 (200 $\mu$ M) ; la quantification révèle que l'expression de XBP1s normalisée est d'environ 2,5 fois supérieure à celle obtenue dans la condition BSA (**Figure 22.A**). La pureté des monocytes isolés a été contrôlée par cytométrie en flux après leur isolation. Le test de viabilité ne montre quant à lui aucune mortalité des cellules jusqu'à 100  $\mu$ M de C18:0 (**Figure 22.B**). À l'instar des monocytes THP1, les monocytes primaires traités 8h avec 100  $\mu$ M de C18:0, lavés et mis en co-culture 24 h avec les cellules iNKT, inhibent l'activation de ces dernières. En effet, la production d'IFN $\gamma$  est même significativement diminuée (**Figure 22.C**). Les contrôles ont permis de vérifier que seules, les cellules iNKT ne produisent pas d'IFN $\gamma$  tandis qu'il y a une forte activation avec le contrôle positif ( $\alpha$ GC) et une activation basale quand il y a co-culture avec les monocytes sans traitement (RPMI).

Pris ensemble, ces résultats montrent que les SFAs (200  $\mu$ M), surtout le C18:0, induisent un stress du RE dans les deux modèles monocytaires, bien que de manière beaucoup plus marquée dans les monocytes THP1.



**Figure 22.** Impact des SFAs sur la capacité des monocytes THP-1 et monocytes primaires sur leur capacité à activer les cellules iNKT après 24h de co-culture. **(A)** Western blot montrant l'expression de XBP1s dans les monocytes THP1 ou monocytes primaires après 8h de traitement avec C16:0, C18:0 et C18:1 (200  $\mu$ M) et leur véhicule (BSA). Quantification de l'expression de XBP1s et normalisation par rapport au contrôle de charge HSP90, en fixant la valeur du contrôle BSA à 1. **(B)** Viabilité cellulaire (MTT) mesurée 16h après les lavages des cellules. Un seuil de 70% de viabilité a été fixé pour indiquer un effet cytotoxique. **(C)** Production d'IFN $\gamma$  par les cellules iNKT après co-culture (24h) avec les monocytes THP-1 ou monocytes primaires traités ou non (RPMI) pendant 8h avec l' $\alpha$ GC (50ng/mL), le C18:0 200 $\mu$ M pour les monocytes THP1 et 100 $\mu$ M pour les monocytes primaires ou la BSA. Des t-tests non appariés ont été réalisés pour chaque traitement et son contrôle pour mesurer la significativité.  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), \*\*\* $p < 0.001$ .

De même, la concentration en C18:0 de 100  $\mu$ M semble déjà cytotoxique pour les monocytes THP1 mais pas pour les monocytes primaires. Par conséquent, les expériences de co-culture avec les monocytes THP1 traités avec le C18:0 200  $\mu$ M montrent une inhibition de l'activation des cellules iNKT qui pourrait s'expliquer par la cytotoxicité de ce traitement. En revanche, dans le cas des monocytes primaires, la concentration en C18:0 utilisée (100  $\mu$ M) est non cytotoxique et pourtant induit une diminution significative de la production d'IFN $\gamma$ .

Donc, les résultats antérieurs du laboratoire obtenus sur les macrophages (THP1-CD1d)+PMA ne semblent pas se confirmer sur macrophages et monocytes primaires. Les résultats sur monocytes avec les SFAs ne pourraient pas expliquer l'activation chronique des cellules iNKT que le laboratoire a observée chez les individus avec obésité (Wilkin C. et al., Thèse 2024). Cependant, nous avons voulu comprendre les mécanismes sous-jacents à cette inhibition et étudier l'impact d'un mélange de SFAs et MUFAs en différentes proportions.

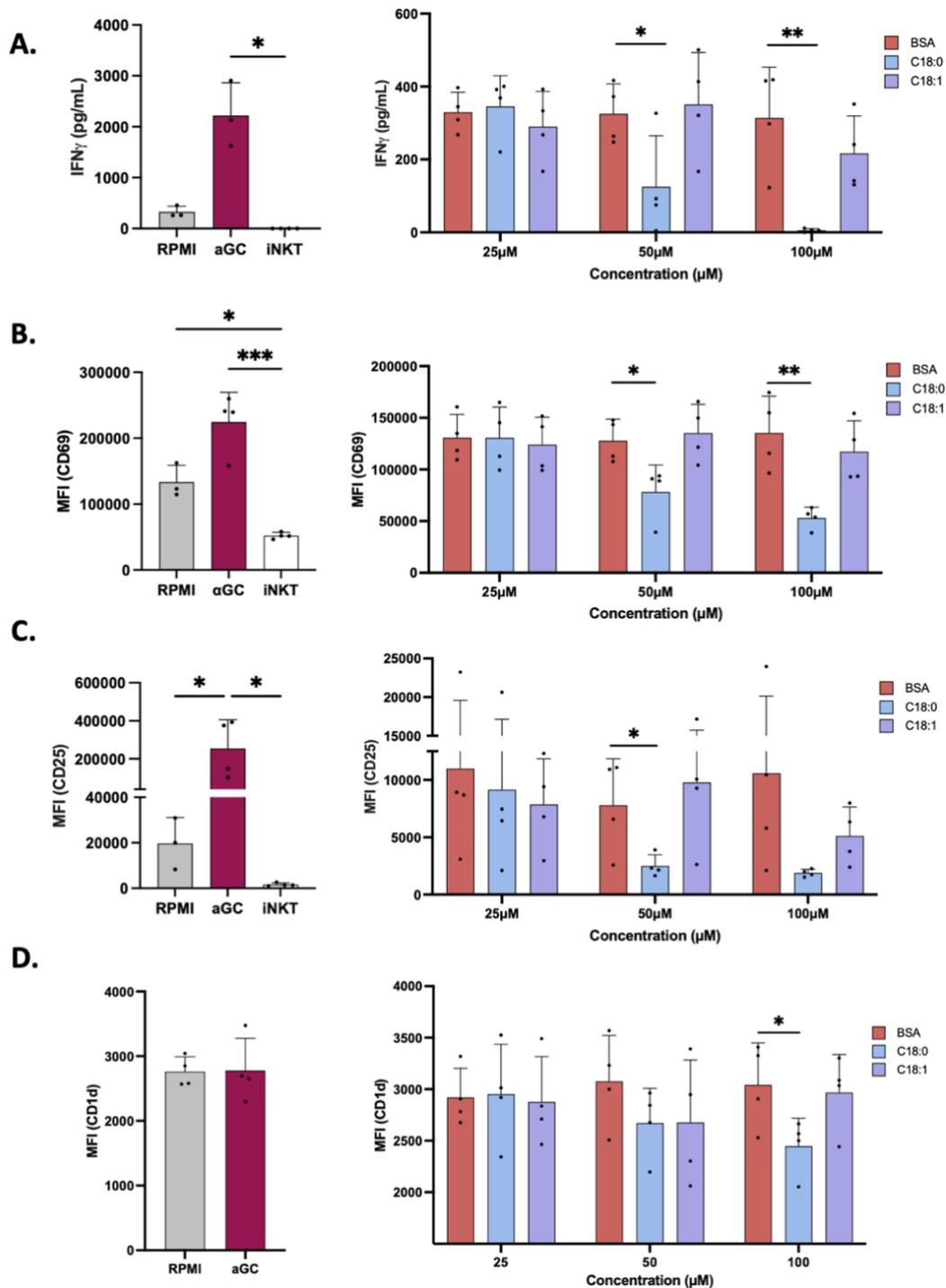
#### 4.3 Impact des traitements de monocytes primaires avec des concentrations croissantes en C18:0 et C18:1 sur l'expression du CD1d et l'activation des cellules iNKT

Afin d'approfondir ces observations, des expériences de co-culture ont été menées pour évaluer si la réponse des cellules iNKT variait en fonction des concentrations en C18:0 et C18:1 utilisées pour traiter les monocytes primaires. Les monocytes primaires ont été isolés par sélection négative à partir de PBMCs provenant de buffy coat. La pureté des monocytes a été vérifiée par cytométrie en flux après leur isolation. Les traitements des monocytes avec le C18:0, C18:1 ou leur véhicule (BSA) ont été réalisés 16h après leur isolation avec trois concentrations (25, 50 et 100  $\mu$ M) durant 8 h. Les monocytes ont été lavés plusieurs fois avant d'y ajouter les cellules iNKT durant 24 h. Les surnageants ont été récoltés pour mesurer la production d'IFN $\gamma$  tandis que les cellules iNKT ont été récupérées pour analyser les marqueurs d'activation précoce (CD69) et tardif (CD25) par cytométrie en flux. La **figure 23** reprend l'ensemble des résultats obtenus. Les contrôles confirment bien que les cellules iNKT seules ne produisent pas d'IFN $\gamma$  et expriment faiblement les 2 marqueurs CD25 et CD69. Leur co-culture avec les monocytes non-traités (RPMI) induit déjà une activation qui est fortement augmentée par l'ajout de l' $\alpha$ GC. Par contre, l'activation des cellules iNKT est diminuée de manière dépendante de la dose lorsque les

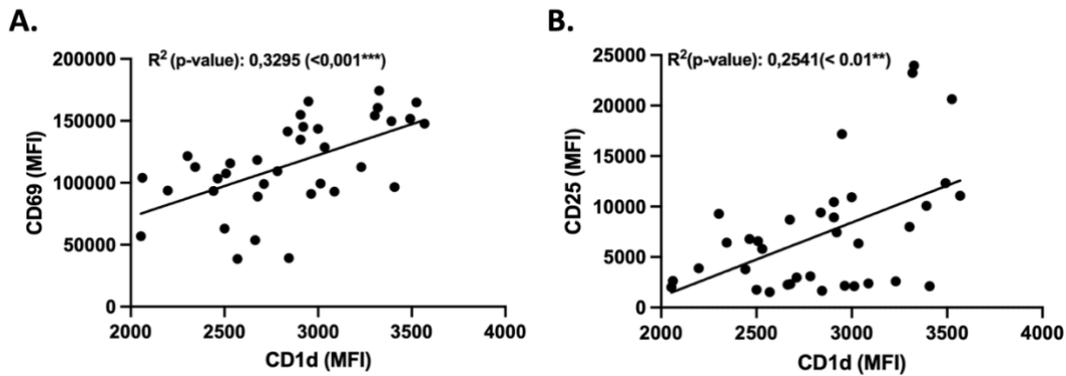
monocytes sont traités avec le C18:0 comme le démontrent les concentrations en IFN $\gamma$  dans les surnageants de culture significativement plus faibles à 50 et 100  $\mu$ M (**Figure 23.A**) et les marqueurs d'activation significativement moins exprimés sur les cellules iNKT à 50 et 100  $\mu$ M pour CD69 (**Figure 23.B**) et 50  $\mu$ M pour CD25 (**Figure 23.C**). Quant au C18:1, il ne semble pas avoir d'effet.

Les résultats de la co-culture obtenus révèlent une diminution inattendue de l'activation des cellules iNKT lorsque les monocytes sont traités à l'acide stéarique. Cette observation intrigante a soulevé l'hypothèse d'une possible régulation négative de l'expression du CD1d à la membrane des monocytes primaires induite par le traitement au C18:0. Pour répondre à cette question, l'expression du CD1d a été mesurée par cytométrie sur les monocytes primaires ayant subi les mêmes traitements (BSA, C18:0, C18:1). L'expression du CD1d ne semble pas différer entre les monocytes non traités (RPMI) et ceux stimulés avec l' $\alpha$ GC (**Figure 23.D**). De manière intéressante, une diminution significative de l'expression du CD1d sur monocytes est observée à 100  $\mu$ M (**Figure 23.D**). De nouveau, le C18:1 n'a pas d'effet.

Lorsqu'une régression linéaire est réalisée avec toutes les MFI du CD1d sur les monocytes traités avec la BSA, le C18:0 et C18:1 aux trois concentrations et les MFI correspondantes du CD69 et CD25 sur les cellules iNKT, on s'aperçoit que l'expression du CD1d sur les monocytes dans nos expériences de co-culture est positivement corrélée à l'activation des cellules iNKT évaluée par les marqueurs d'activation CD69 et CD25 (**Figure 24**).



**Figure 23.** Impact des traitements des monocytes primaires avec des doses croissantes d'acides gras saturés ou insaturés sur l'activation des cellules iNKT après 24h de co-culture et sur l'expression du CD1d. Les monocytes primaires ont été traités ou non (RPMI) avec le contrôle positif (aGC), les FFAs et leur véhicule (BSA) aux concentrations indiquées pendant 8h. Ils ont ensuite été lavés et récupérés ou mis en co-culture avec les cellules iNKT pendant 24h. Un contrôle constitué par des cellules iNKT placées seules en culture pendant 24h est réalisé (iNKT). **(A)** L'activation des cellules iNKT a été évaluée par la production d'IFN $\gamma$  dans le milieu de co-culture. Par cytométrie en flux, les marqueurs d'activation **(B)** CD69 et **(C)** CD25 ont été mesurés sur les cellules iNKT. **(D)** Expression du CD1d sur les monocytes après 8h de traitement. Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  écart-type. Des t-tests multiples et tests ANOVA ont été réalisés entre les conditions. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.



**Figure 24.** Corrélation positive entre l'expression du CD1d à la surface des monocytes et l'activation des cellules iNKT. La régression linéaire a été réalisée en prenant en compte les MFI du CD1d et celles des marqueurs d'activation **(A)** CD69 et **(B)** CD25 sur les cellules iNKT.

Ces résultats suggèrent que le traitement avec les SFAs des monocytes primaires induit une diminution de l'expression du CD1d à la membrane qui pourrait impacter négativement l'activation des cellules iNKT après leur co-culture.

#### 4.4 Les acides gras insaturés inhibent l'effet négatif des acides gras saturés

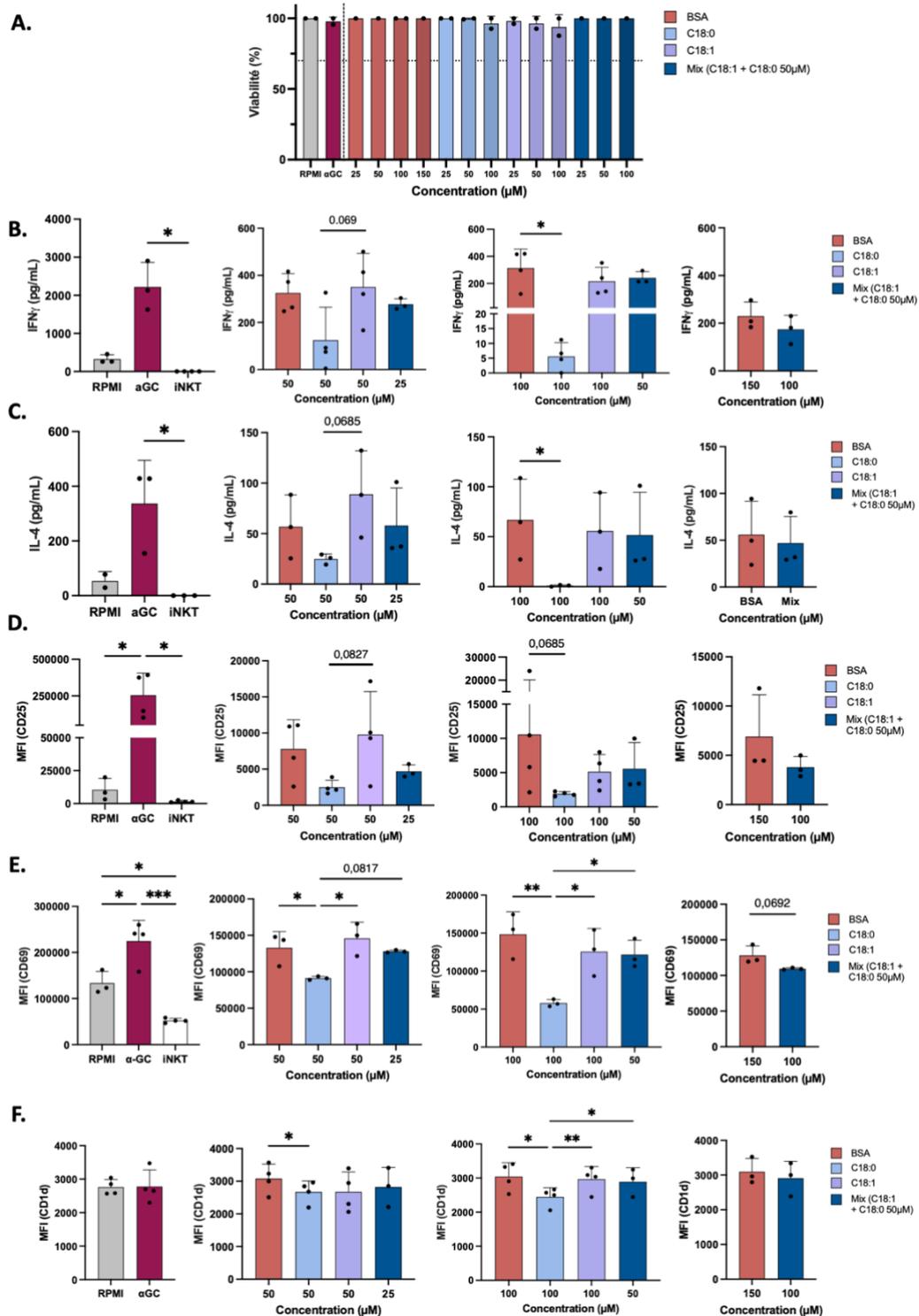
Dans le contexte de l'obésité, les acides gras circulants ne se résument pas à un seul type, mais forment un mélange de SFAs et d'UFAs présents en proportions variables. Sur cette base, nous avons voulu évaluer si l'ajout d'UFAs pouvait atténuer l'effet inhibiteur observé avec les SFAs.

##### 4.4.1 Effet d'un traitement combiné C18:0+C18:1 des monocytes sur l'activation des cellules iNKT

Pour cela, des monocytes primaires ont été traités durant 8 h avec C18:0, C18:1 ou un mélange des deux. Dans les conditions mixtes, la concentration de C18:0 a été maintenue constante à 50  $\mu$ M, tandis que celles du C18:1 a été de 25, 50 et 100  $\mu$ M, formant des ratios respectifs de 2:1, 1:1 et 1:2. Le contrôle était constitué de BSA seule. Après plusieurs lavages, les monocytes ont été co-cultivés avec des cellules iNKT pendant 24 h ou directement récoltés pour mesurer l'expression du CD1d par cytométrie. À l'issue de la co-culture, les surnageants ont été collectés pour mesurer la production d'IFN $\gamma$  et d'IL-4, tandis que les cellules iNKT ont été récupérées pour l'analyse par cytométrie en flux des marqueurs d'activation (CD25 et CD69). En parallèle, un test de viabilité sur monocytes a confirmé l'absence de cytotoxicité induite par les traitements avec les FFAs (**Figure 25.A**). Les contrôles (RPMI,  $\alpha$ GC) valident l'activation des cellules iNKT par l' $\alpha$ GC,

avec une production accrue d'IFN $\gamma$  et d'IL-4 comparée à la condition contrôle (RPMI). Comme attendu, les cellules iNKT seules ne produisent pas d'IFN $\gamma$  et d'IL-4.

Les résultats montrent que le traitement au C18:0 entraîne une diminution dose dépendante de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules iNKT significative à 100 $\mu$ M, tandis que l'ajout de C18:1 au C18:0 50 $\mu$ M, à partir de 25 $\mu$ M, permet de restaurer partiellement cette production, avec un effet d'autant plus marqué à 100 $\mu$ M (**Figure 25.B**). Les résultats de l'IL-4 suivent la même tendance avec une diminution significative de la production d'IL-4 après traitement au C18:0 à 100 $\mu$ M et une récupération de la production d'IL-4 par le C18:1 (**Figure 25.C**). L'expression du marqueur d'activation tardif (CD25) montre également avec une diminution significative avec le C18:0 à 100 $\mu$ M (**Figure 25.D**). Le marqueur précoce CD69 présente la même dynamique avec une diminution de l'expression avec le C18:0 et une restauration progressive dès l'ajout de 25 $\mu$ M de C18:1, suggérant l'effet modulateur exercé par l'acide oléique (**Figure 25.E**).

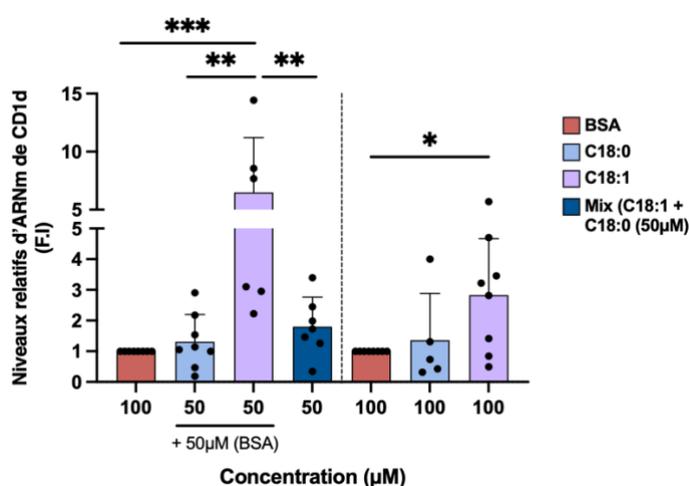


**Figure 25.** Impact des traitements de monocytes primaires avec un mélange de SFAs et UFAs sur l'activation des cellules iNKT après 24h de co-culture. Les monocytes primaires ont été traités ou non (RPMI) avec le contrôle positif (aGC), les FFAs et leur véhicule (BSA) aux concentrations indiquées pendant 8h. Les concentrations pour le mix indiquent la concentration en C18:1 ajoutée au C18:0 en concentration constante de 50µM. Ils ont ensuite été lavés et récupérés ou mis en co-culture durant 24h avec les cellules iNKT. Un contrôle constitué par des cellules iNKT placées seules en culture pendant 24h est réalisé (iNKT). **(A)** La viabilité des cellules a été mesurée (MTT) et est représentée en pourcentage de viabilité. L'activation des cellules iNKT a été évaluée par la production **(B)** d'IFN $\gamma$  ou **(C)** d'IL-4, et l'expression des marqueurs d'activation **(D)** CD25 et **(E)** CD69 par cytométrie en flux. **(F)** Expression du CD1d mesurée sur les monocytes directement après 8h de traitement. Les données sont relatées en MFI. Des t-tests et tests ANOVA ont été réalisés entre les conditions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### 4.4.2 Effet des différents traitements avec C18:0 et/ou C18:1 des monocytes sur l'expression du CD1d

De la même manière que précédemment, nous avons examiné l'expression du CD1d sur les monocytes traités. Pour cela, les mêmes conditions de traitement ont été reproduites sans coculture, et les cellules ont été récupérées directement après 8 h de traitement. Les résultats montrent une diminution progressive de l'expression membranaire du CD1d dès 50  $\mu$ M de C18:0, atteignant un minimum à 100  $\mu$ M. (**Figure 25.F**). De manière intéressante, l'expression du CD1d revient au niveau basal (BSA) lorsque le C18:1 (50  $\mu$ M) est ajouté au C18:0 (50  $\mu$ M), ce qui démontre bien l'effet modulateur du C18:1.

Finalement, afin de déterminer si la diminution de l'expression membranaire du CD1d observée par cytométrie en flux pouvait s'expliquer par une régulation transcriptionnelle, des analyses par RT-qPCR ont été réalisées. Les monocytes ont été traités pendant 8h avec la BSA (100  $\mu$ M), le C18:0 50  $\mu$ M (+50  $\mu$ M de BSA) et 100  $\mu$ M, le C18:1 50  $\mu$ M (+50  $\mu$ M de BSA) et 100  $\mu$ M et finalement le mix C18:0 50  $\mu$ M + C18:1 50  $\mu$ M. De manière surprenante, les résultats obtenus ne reflètent pas ceux observés en cytométrie en flux. En effet, aucune diminution des niveaux en ARNm du CD1d n'est observée avec le C18:0 alors qu'une augmentation significative est visible avec le C18:1 50 et 100  $\mu$ M (**Figure 26**). De manière intéressante, le mélange des deux FFAs permet de revenir au niveau basal de l'ARNm du CD1d (BSA).

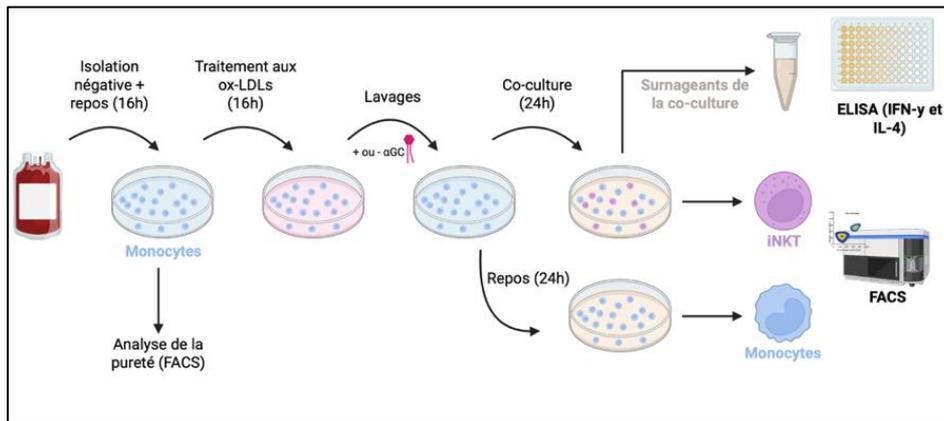


**Figure 26.** Impact des traitements des monocytes primaires avec le C18:0 et/ou C18:1 sur l'expression de l'ARNm du CD1d. Les monocytes primaires issus de 4 « buffy coat » ont été traités avec les FFAs et le véhicule BSA aux concentrations indiquées durant 8h. Les cellules ont ensuite été récupérées et des RT-qPCR ont été faites à partir des ARNs avec 2 paires de primers différentes pour le CD1d. Les résultats ont été normalisés avec le gène HPRT1 et son exprimés en fold-induction (F.I) par rapport au contrôle BSA présents les cellules. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Des tests statistiques ANOVA ont été réalisés. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

En résumé, ces résultats montrent que l'activation des cellules iNKT est modulée par les FFAs avec lesquels les monocytes sont traités avant la co-culture. Les traitements aux SFAs diminuent l'activation des cellules iNKT, ce qui est corrélé à une perte d'expression membranaire du CD1d. Les UFAs seuls n'ont pas d'effet sur l'activation des cellules iNKT et l'expression du CD1d sur les membranes des monocytes. Par contre, les UFAs sont capables de renverser la perte du CD1d membranaire et la baisse d'activation des cellules iNKT induites par les SFAs. Toutefois, cette régulation négative du CD1d sur les monocytes, exercée par les SFAs, ne semble pas dépendre d'une diminution de la transcription du gène, suggérant un mécanisme post-transcriptionnel. Pris ensemble, ces résultats soutiennent l'idée qu'un environnement lipidique déséquilibré pourrait altérer l'activation des cellules iNKT via une modulation du CD1d.

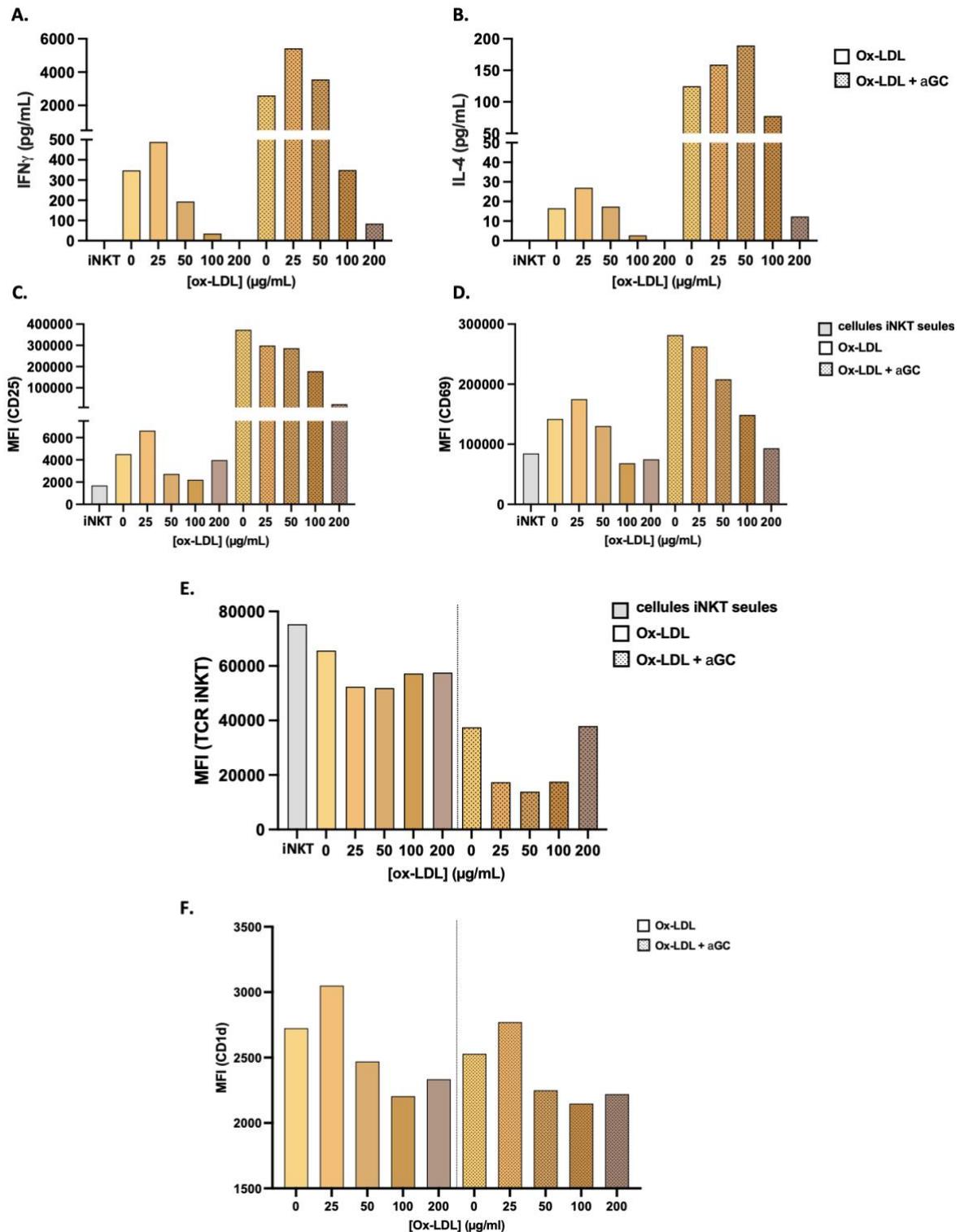
#### 4.5 Effet des ox-LDLs sur la capacité des monocytes primaires d'activer les cellules iNKT

Étant donné que les SFAs et UFAs, seuls ou combinés, ne semblent pas conférer aux monocytes la capacité d'activer les cellules iNKT, ils ne pourraient pas contribuer à l'activation chronique des cellules iNKT observée chez les individus avec obésité. Dans cette seconde partie du mémoire, nous nous sommes intéressés aux ox-LDLs comme agent lipidique potentiel contribuant au développement du dysfonctionnement des cellules iNKT dans l'obésité. Plusieurs arguments ont motivé notre choix : (1) L'oxydation des LDLs est en effet augmentée dans l'obésité et les niveaux en ox-LDLs de base sont restaurés après perte de poids induite par chirurgie bariatrique. (2) Les résultats antérieurs du laboratoire ont démontré une corrélation entre le LDL-cholestérol des patients et l'activation chronique de leurs cellules iNKT ainsi qu'entre l'expression du CD1d sur leurs monocytes et le dysfonctionnement de leurs cellules iNKT (Wilkin C. et al., Thèse 2024). (3) Les ox-LDLs ajoutés au sang des patients sains ou injectés en intraveineuse dans des souris s'accumulent de préférence dans les monocytes<sup>54</sup>. Les ox-LDLs ont été décrits capables d'induire la transcription du gène *CD1d* dans des DCs par un mécanisme impliquant les voies PPAR $\gamma$  et RAR<sup>74</sup>.



**Figure 27.** Schéma expérimental de la co-culture des cellules iNKT avec des monocytes primaires traités avec des ox-LDLs.

Le protocole des essais de co-culture est illustré à la **Figure 27**. Les monocytes ont été isolés par sélection négative à partir de PBMCs et traités durant 16h avec des doses croissantes en ox-LDLs (0, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), avant d'être lavées plusieurs fois suivi par l'ajout d' $\alpha\text{GC}$  (50ng/mL) et remis en culture pendant 24 h avant l'analyse au FACS ou co-cultivés avec les cellules iNKT (ratio 5:1) pendant 24 h. Les surnageants de co-culture ont été récupérés afin de quantifier la production d'IFN $\gamma$  et d'IL-4 tandis que les marqueurs d'activation ont été mesurés à la surface des cellules iNKT par cytométrie en flux. Cette expérience de co-culture n'a été réalisée qu'une fois. Nous pouvons voir que les contrôles négatifs montrent bien qu'il n'y a pas de production d'IFN $\gamma$  par les cellules iNKT seules. De manière intéressante, la concentration en ox-LDL de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  conduit à une production d'IFN $\gamma$  et d'IL-4 par les cellules iNKT plus importante que la condition contrôle où les monocytes ne sont pas traités en absence et en présence d' $\alpha\text{GC}$  (**Figure 28.A-B**). Les résultats de la cytométrie en flux confirment l'activation des cellules iNKT avec une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69 à 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ox-LDL (**Figure 28.C-D**). Il est connu que lorsque le TCR des cellules iNKT est activé par des antigènes lipidiques présentés via le CD1d, il est internalisé pendant quelques heures. La co-culture des cellules iNKT avec les monocytes traités avec des ox-LDLs à 25 et 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  induit une diminution des niveaux en TCR (**Figure 28.E**). Ceux-ci sont davantage diminués lorsque l' $\alpha\text{GC}$  est ajouté aux traitements.



**Figure 28.** Impact du traitement des monocytes primaires avec des doses croissantes en Ox-LDL sur l'activation des cellules iNKT après 24 h de co-culture. Les monocytes primaires ont été traités durant 16 heures avec des ox-LDLs aux concentrations indiquées en présence ou non d'aGC (50 ng/mL). Après plusieurs lavages, ceux-ci ont été mis en co-culture avec des cellules iNKT pendant 24h. Des cellules iNKT seules ont également été mises en culture 24h. L'activation des cellules iNKT a été mesurée à partir des surnageants par la production (A) d'IFN $\gamma$  et (B) d'IL-4, ainsi qu'avec les marqueurs d'activation (C) CD25, (D) CD69 et (E) TCR. (F) L'expression du CD1d a été mesurée sur les monocytes directement après leurs par cytométrie en flux.

#### 4.5.1 Le traitement des monocytes aux ox-LDLs module l'expression du CD1d

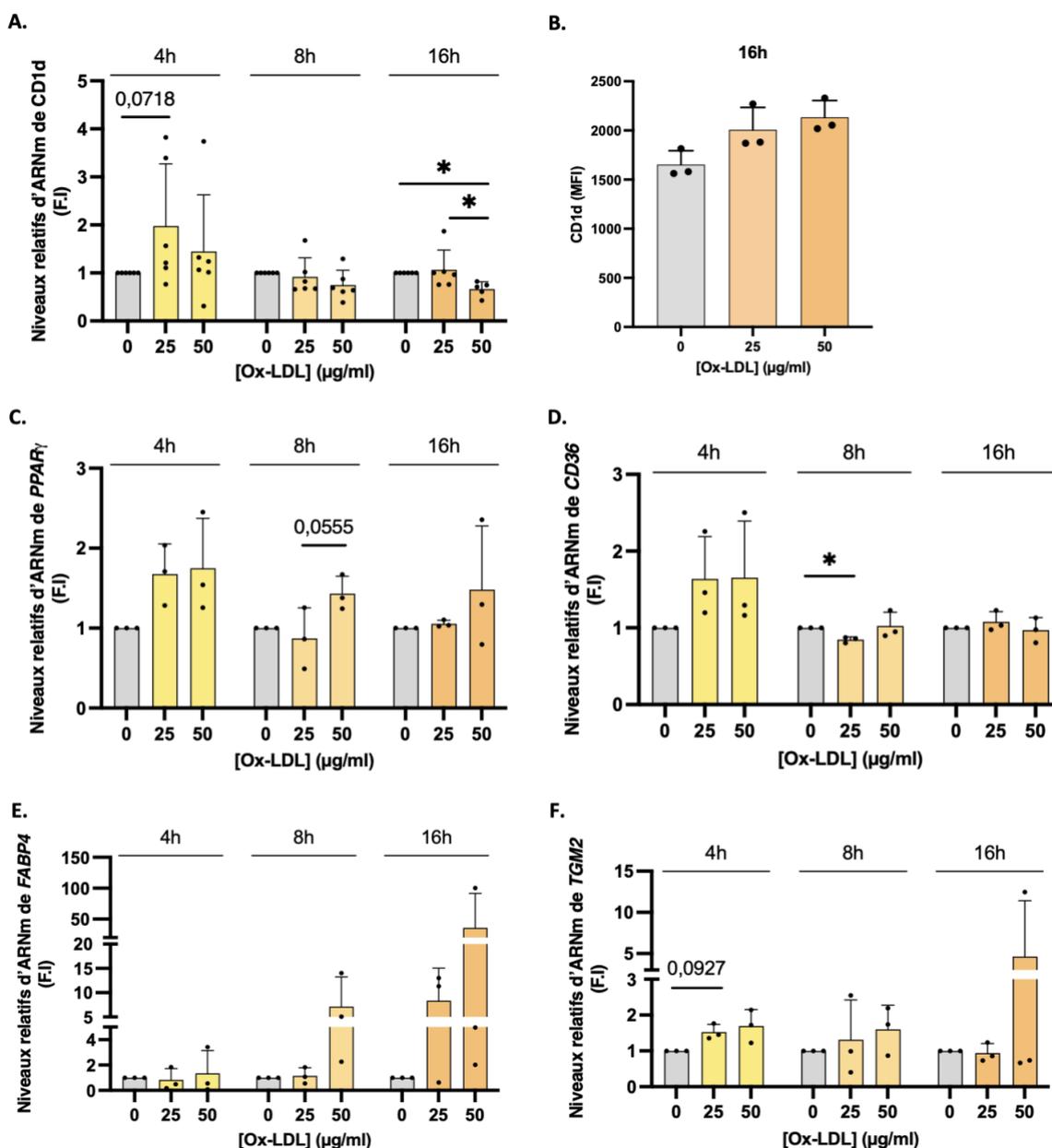
Dans la même suite logique, l'expression du CD1d a également été évaluée à la membrane des monocytes après traitement dans les mêmes conditions que lors de la co-culture. La **Figure 28.F** montre que les niveaux du CD1d sont augmentés avec le traitement ox-LDL de 25 µg/mL mais diminuent pour atteindre des niveaux inférieurs au contrôle lorsque les concentrations en ox-LDLs dépassent 25 µg/mL, ce qui pourrait expliquer le profil activé des cellules iNKT uniquement à cette concentration (**Figure 28.F**).

Enfin, afin de vérifier si les modulations du CD1d s'effectuent au niveau transcriptionnel, des RT-qPCR ont été réalisées pour analyser l'expression du gène *CD1d*. D'autres gènes impliqués dans la voie PPAR $\gamma$  tels que les deux gènes cibles *CD36* et *FABP4* (« *Fatty-Acid Binding Protein 4* ») et PPAR $\gamma$  lui-même ainsi qu'un gène cible de RAR, *TGM2* (« *Transglutaminase 2* ») ont été analysés. Les monocytes ont été isolés à partir de PBMCs de trois donneurs et traités pendant 4, 8 et 16 h à trois concentrations en ox-LDLs (0, 25 et 50 µg/mL) avant d'être récupérés pour extraire les ARN et poursuivre avec la RT-qPCR. Les résultats montrent une légère augmentation de l'expression du gène *CD1d* à 4 h de traitement avec des ox-LDLs 25 µg/mL et une diminution significative après 16 h de traitement à 50 µg/mL (**Figure 29.A**). En parallèle, l'expression membranaire du CD1d a été évaluée par cytométrie en flux. Une augmentation a été observée après 16 h de traitement, ce qui pourrait refléter l'élévation préalable de l'ARNm détectée à 4 h, suggérant le décalage temporel entre la transcription du gène et son expression en surface (**Figure 29.B**).

L'expression du gène *PPAR $\gamma$*  a ensuite été analysée et les résultats montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm dès 4h avec 25µg/mL de ox-LDLs (**Figure 29.C**). Avec des temps plus longs, cette augmentation reste visible avec un traitement à 50µg/mL. Les niveaux d'ARNm de *CD36* sont augmentés dès 4h de traitement mais semblent diminuer à 8h de traitement, sans différence notable à 16h de traitement (**Figure 29.D**). Le gène *FABP4* est également une cible de PPAR $\gamma$  et son expression semble être augmentée dès 8h de traitement à 50µg/mL et surtout après 16h de traitement (**Figure 29.E**).

Finalement, en ce qui concerne le gène *TGM2*, dès 4h de traitement, une augmentation de son expression est visible à 25µg/mL de manière similaire à ce qui est observé avec CD1d, sans différence significative aux plus longs temps de traitements (**Figure 29.F**).

Ces données préliminaires montrent une légère augmentation de l'expression des gènes *CD1d*, *PPAR $\gamma$* , *CD36* et *TGM2* à 4h qui est transitoire puisqu'elle s'estompe dans la plupart des cas au-delà de 4h. Le gène cible par excellence de *PPAR $\gamma$* , *FABP4*, est aussi exprimé en réponse aux ox-LDLs mais son induction suit une cinétique plus lente. Ces résultats doivent bien sûr être confortés par un nombre d'expériences indépendantes plus important.



**Figure 29.** Impact du traitement des monocytes primaires avec les Ox-LDLs sur l'expression du gène *CD1d* et des gènes cibles potentiels de *PPAR $\gamma$*  et *RAR*. Les monocytes primaires isolés de 3 donneurs ont subi différents temps de traitements (4, 8 ou 16 h) aux ox-LDLs (0, 25, 50 µg/mL), après quoi les cellules ont été récupérées afin de réaliser une RT-qPCR pour évaluer l'expression de (A) *CD1d* (2 paires de primers), (C) *PPAR $\gamma$* , (D) *CD36*, (E) *FABP4* et (F) *TGM2*. (B) L'expression du *CD1d* à la surface des monocytes a également été mesurée par cytométrie en flux après 16h de traitement. Des tests ANOVA ont été réalisés entre les conditions. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

## 5. Discussion

La laboratoire d'immuno-métabolisme et nutrition s'intéresse aux cellules iNKT et aux mécanismes sous-jacents à leur dysfonctionnement dans le contexte de l'obésité. A l'interface de l'immunité innée et adaptative, ces cellules iNKT se distinguent d'une part par leur capacité à répondre rapidement à la suite de leur activation en libérant de grandes quantités de cytokines Th1 et/ou Th2 ou Th17 capables de moduler l'activation d'autres cellules immunes et d'autre part, en exerçant une cytotoxicité directe via les granzymes et perforine. Puisqu'une baisse de l'immunosurveillance chez les personnes obèses pourrait contribuer à leur sensibilité accrue à certains cancers, comprendre comment les cellules iNKT sont impactées est crucial. Les résultats antérieurs du laboratoire ont pu confirmer une déplétion des cellules iNKT chez les personnes obèses qui pourrait découler de leur activation chronique qui mènerait à leur apoptose. De plus, une augmentation du CD1d à la surface des monocytes chez les patients obèses a été observée et corrélée à l'activation chronique et au dysfonctionnement des cellules iNKT. Il était dès lors intéressant d'étudier le lien entre cette hausse du CD1d et l'activation des cellules iNKT. Ce mémoire s'intègre dans un projet destiné à mieux comprendre comment un déséquilibre de l'environnement lipidique associé à l'obésité pourrait contribuer à l'activation chronique des cellules iNKT. Mon travail de mémoire a consisté à analyser l'impact de milieux de culture enrichis soit en FFAs ou Ox-LDLs, d'une part, sur la capacité de monocytes/macrophages d'activer des cellules iNKT et d'autre part, sur l'expression du CD1d.

### 1. *Effet des acides gras libres sur la capacité des monocytes/macrophages d'activer les cellules iNKT.*

Des résultats antérieurs du laboratoire ont montré que le traitement par des SFAs (C18 :0 et C16 :0) mais pas avec le MUFAs (C18 :1) des monocytes THP-1 exprimant le transgène CD1d et différenciés en macrophages était capable de leur conférer la capacité d'activer les cellules iNKT via un mécanisme impliquant le CD1d. Mon premier objectif a été de confirmer ou non ces résultats sur des macrophages exprimant des niveaux endogènes de CD1d comme les THP-1+PMA et les macrophages primaires (MDMs) ainsi que sur les monocytes THP-1 et monocytes primaires. La comparaison de l'effet des traitements sur les différentes lignées cellulaires, MDM, THP1+PMA, THP1 et monocytes primaires, a permis de montrer que le stress du RE est bien présent après traitement aux SFAs même si le degré de ce stress varie d'un type cellulaire à l'autre, comme on a pu le mettre en évidence via l'analyse par WB (**Figures 20,22**). La présence

de la protéine XBP1s confirme l'activation de l'UPR au moins via la voie de IRE1, après traitement au C18:0. Cependant, les concentrations utilisées sur les monocytes primaires étaient deux fois plus élevées que les concentrations utilisées pour la suite des manipulations. Des expériences supplémentaires devraient être réalisées en utilisant les mêmes concentrations que pour les co-cultures. De plus, au vu de la mortalité induite par les traitements aux SFAs sur les THP1 (**Figure 22.B**), des mises au point seraient nécessaires en testant par exemple des concentrations en SFAs inférieures à 100µM comme 25, 50 et 75µM. Les expériences de co-culture ont été intéressantes car elles ont permis de mettre en évidence la différence de réponse entre les lignées cellulaires sur l'activation des cellules iNKT (**Figures 20.D, 22.C**). Dans un premier temps, l'activation des cellules iNKT a été estimée uniquement par la production d'IFN $\gamma$ . Pour chaque expérience de co-culture, deux contrôles négatifs ont été utilisés à savoir (1) les cellules iNKT qui n'ont pas subi de co-culture et qui au repos, ne produisent pas d'IFN $\gamma$ , (2) les cellules iNKT mises en co-culture avec des APCs n'ayant pas subi de traitement (appelé condition « RPMI »). Dans ce cas, les cellules iNKT présentent un faible niveau d'activation, qui découle d'une présentation basale d'antigènes lipidiques endogènes. Le contrôle positif était l' $\alpha$ GC, connu pour être un antigène lipidique fort pour l'activation des cellules iNKT. Bien que les contrôles aient donné les résultats attendus sur les deux types de macrophages, THP1+PMA et MDMs, leur traitement avec le C18:0 (200 µM et 100 µM, respectivement) a permis de montrer une différence flagrante entre les deux types de macrophages. Les premiers ont montré une légère activation des cellules iNKT contrairement aux seconds dont le traitement a conduit à une diminution importante de l'activation des cellules iNKT après co-culture. Cette dernière observation a également été visible sur les monocytes THP1+C18:0 (200 µM) et monocytes primaires+C18:0 (100 µM). Dans le cas des monocytes THP1, contrairement aux monocytes primaires, le traitement avec le C18:0 s'est montré cytotoxique (< 50 % de viabilité). Nous ne pouvons donc pas exclure un rôle de cette cytotoxicité des monocytes THP1 dans la forte diminution de leur capacité à activer les cellules iNKT.

Donc, ce premier aperçu rapide de l'effet des SFAs sur plusieurs types de monocytes et macrophages, ne nous a pas permis de confirmer les résultats obtenus sur les macrophages (THP1+PMA) exprimant le transgène CD1d. Au contraire, les traitements avec les SFAs ont conduit à une diminution importante de l'activation des cellules iNKT après co-culture. Les résultats sur monocytes avec les SFAs ne pourraient pas expliquer l'activation chronique des

cellules iNKT que le laboratoire a observée chez les individus avec obésité (Wilkin C. et al., manuscrit soumis). Cependant, nous avons voulu comprendre les mécanismes sous-jacents à cette inhibition et étudier l'impact d'un mélange de SFAs et MUFAs en différentes proportions. Nous avons confirmé l'inhibition dose-dépendante de l'activation des cellules iNKT évaluée par une diminution significative de la production d'IFN $\gamma$  et de l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69 lorsque ceux-ci sont co-cultivés avec des monocytes traités avec des concentrations croissantes en C18:0 (**Figure 23**). En revanche, des concentrations croissantes en C18:1 n'ont toujours eu aucun effet.

Une telle inhibition pourrait s'expliquer par la diminution de l'expression du CD1d à la membrane des monocytes. De manière tout à fait intéressante, le traitement au C18:0 a effectivement induit une diminution significative et dose-dépendante de l'expression du CD1d (**Figure 23.D**). Cette observation pourrait expliquer les résultats différents obtenus avec les cellules THP-1 exprimant le transgène *CD1D* sous le contrôle d'un promoteur fort différent de celui du gène endogène. Dans notre modèle de co-culture monocytes primaires/iNKT (5:1), il semble que l'amplitude de l'activation des cellules iNKT soit dépendante des niveaux en CD1d chargés d'antigènes lipidiques issus du sérum comme le démontrent les corrélations positives entre le CD1d et les marqueurs d'activation des cellules iNKT (**Figure 24**). Même si le stress du RE induit par le C18:0 favorise la synthèse d'antigènes lipidiques dans les monocytes comme décrit dans des macrophages et DCs soumis à un stress du RE (thapsigargine et tunamycine) (références), la perte de CD1d empêche leur présentation aux cellules iNKT.

Un effet négatif des SFAs sur la présentation d'antigènes lipidiques a déjà été observé par l'équipe de Hua et al. Ils ont démontré que des hépatocytes après traitements aux SFAs étaient moins aptes à activer les cellules iNKT, que ce soit in vivo ou in vitro<sup>95</sup>. Cependant, n'ayant pas observé de diminution de l'expression du CD1d à la membrane, les auteurs ont conclu que c'était plutôt le chargement d'antigènes lipidiques endogènes qui était altéré.

Comme les FFAs ne se limitent pas aux SFAs mais à un mélange de SFAs+UFAs, nous avons testé l'impact de l'ajout de concentrations croissantes de C18:1 au C18:0. La supplémentation de C18:1 25  $\mu$ M au C18:0 50  $\mu$ M a déjà permis de restaurer partiellement l'activation des cellules iNKT. L'effet fut plus marqué avec C18:1 50  $\mu$ M. Ce ratio C18:1/C18:0 1:1 a permis de restaurer

les niveaux de base du CD1d sur les monocytes. Ces résultats démontrent encore une fois l'association entre l'expression du CD1d et l'activation des cellules iNKT dans ce modèle et suggèrent un rôle protecteur des UFAs.

L'origine de la diminution des niveaux de CD1d à la membrane des monocytes pourrait impliquer un processus transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Des résultats antérieurs du laboratoire ont démontré une diminution significative de l'expression de l'ARNm du CD1d dans une analyse RNAseq réalisée sur des MDMs traités pendant 16h avec le C18:0 100  $\mu$ M<sup>91</sup>. De manière surprenante, nos analyses de RT-qPCR réalisées sur les monocytes primaires traités avec le C18:0 50 et 100  $\mu$ M pendant 8h n'ont pas démontré de modulation de l'ARNm du CD1d. Par contre, nous avons observé une augmentation des niveaux d'ARNm du CD1d avec le C18:1 50 et 100  $\mu$ M (8h) qui ne se traduit pas par une augmentation des niveaux membranaires de CD1d déterminés par cytométrie en flux. Le mélange C18:0 50  $\mu$ M+C18:1 50  $\mu$ M ne conduit à aucune modulation transcriptionnelle du CD1d. Si la diminution des niveaux de CD1d membranaire induite par le C18:0 ne résulte pas d'une régulation négative de la transcription, elle pourrait impliquer des problèmes de recrutement de la protéine à la membrane plasmique. Il est bien établi que les SFAs peuvent contribuer à une rigidification des membranes et cet effet est inhibé lorsqu'on ajoute simultanément le C18:1<sup>94</sup>. Par ailleurs, la membrane plasmique contient des domaines, les *lipid rafts*, enrichis en glycosphingolipides et cholestérol. Une étude menée sur cellules B cancéreuses a montré par microscopie confocale que le CD1d se localise préférentiellement dans ces domaines. L'utilisation de la nystatine, un agent perturbant ces *lipid rafts*, a entraîné une baisse de la présentation antigénique aux cellules iNKT<sup>96</sup>. Ainsi, il serait donc pertinent d'explorer si les SFAs, en modifiant la fluidité membranaire, peuvent également altérer la structure des *lipid rafts*, affectant ainsi l'ancrage du CD1d. La nystatine pourrait alors servir de contrôle positif dans ce type d'approche. Une évaluation par microscopie confocale pourrait permettre de voir si les *lipid rafts* sont altérés. Ensuite, l'étude de Payet et al. a démontré que les SFAs pouvaient altérer la voie de sécrétion des protéines en perturbant la formation des vésicules<sup>97</sup>. En effet, le RE et l'appareil de golgi contiennent plus d'UFAs que de SFAs. Une augmentation de la concentration en SFA peut perturber la formation des vésicules de transport en rigidifiant les membranes intracellulaires. Ceci peut compromettre le trafic vésiculaire et notamment le transport des protéines à la surface cellulaire.

L'étude récente de Qiu et al. souligne un autre mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de CD1d. En effet, ils ont mis en évidence l'effet de la protéine virale, UL56, produite par HSV-1 capable de diminuer l'expression du CD1d et ainsi altérer la réponses des cellules NKT. Le virus induirait l'élimination de la protéine CD1d via un mécanisme d'ubiquitination de CD1d suivie de dégradation utilisant le protéasome et de manière lysosome dépendante<sup>98</sup>. Ainsi, il pourrait être intéressant de voir si des mécanismes similaires, utilisant la voie du protéasome, pourraient également être activés après traitement aux SFAs. Il est possible qu'un environnement inflammatoire, tel qu'observé dans l'obésité, puisse induire une modulation du CD1d via l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome. L'étude de Ando H. et al. travaillant sur des cellules du mélanome a démontré que lorsque la composition en FFAs était modifiée, cela entraînait la dégradation de la tyrosinase, une glycoprotéine membranaire, par la voie de l'ubiquitination et du protéasome<sup>99</sup>. Ils ont postulé que cette voie pouvait être régulée par les FFAs. C'est pourquoi, il pourrait être intéressant de tester des inhibiteurs de protéasome ou de regarder l'ubiquitination du CD1d pour essayer de comprendre si le traitement aux FFAs, et surtout aux SFAs, pourrait altérer l'expression membranaire du CD1d, menant in fine à une activation diminuée des cellules iNKT. Finalement, il pourrait être intéressant de réaliser des WB sur extraits totaux afin de confirmer si la baisse du CD1d est due à une dégradation de la protéine ou à son internalisation.

Donc, afin d'élucider l'origine de la disparition du CD1d à la membrane plasmique des monocytes après traitement avec des SFAs, il faudrait dans un premier temps répéter les analyses de RT-qPCR et investiguer les niveaux totaux de la protéine CD1d par Western blot. Si ni les ARNm, ni les niveaux protéiques de CD1d ne sont affectés, d'autres expériences visant à étudier les vésicules de transport et les *lipid raft* pourront être envisagées.

## **2. Effet des ox-LDLs sur la capacité des monocytes/macrophages d'activer les cellules iNKT**

Dans cette seconde partie du mémoire, nous nous sommes intéressés aux Ox-LDLs comme agent lipidique potentiel contribuant au développement du dysfonctionnement des cellules iNKT dans l'obésité. Plusieurs arguments ont motivé notre choix : (1) L'oxydation des LDLs est en effet augmentée dans l'obésité et les niveaux en ox-LDLs de base sont restaurés après perte de poids induite par chirurgie bariatrique. (2) Les résultats antérieurs du laboratoire ont démontré une corrélation entre le LDL-cholestérol et l'activation chronique des cellules iNKT (Wilkin C. et al., manuscrit soumis). (3) Les ox-LDLs ajoutés au sang des patients sains ou injectés

en intraveineuse dans des souris s'accumulent de préférence dans les monocytes<sup>54</sup>. Les ox-LDLs contiennent des ligands de la voie PPAR $\gamma$ , comme des acides gras oxydés ou des phospholipides oxydés. Les ox-LDLs sont internalisés via les SRs et déclenchent la cascade activant la voie PPAR $\gamma$ . L'équipe de Szatmari *et al.* (2004 et 2006) a montré que dans des DCs en différenciation, les ox-LDLs sont capables d'induire l'expression du CD1d<sup>74,100</sup>. Ceux-ci activent PPAR $\gamma$ , ce qui conduit à la génération d'acide rétinoïque, qui, à son tour, se lie au récepteur nucléaire RAR qui forme un hétérodimère avec RXR et active la transcription du gène *CD1d*. C'est pourquoi nous avons testé l'activation des cellules iNKT après traitements des monocytes aux ox-LDLs. Les résultats obtenus ne sont qu'indicatifs à ce stade, puisqu'ils sont issus d'une seule expérience. Dès lors des expériences supplémentaires sont évidemment nécessaires afin de confirmer ces résultats, qui semblent tout de même prometteurs pour la suite. En effet, nous avons observé une augmentation de la sécrétion des cytokines pro- et anti-inflammatoires (IFN $\gamma$  et IL-4) par les cellules iNKT après co-culture avec des monocytes traités pendant 16 h avec des ox-LDLs (25  $\mu$ g/ml). Les données par cytométrie en flux vont dans la même direction à savoir une augmentation du CD25 et CD69 sur les cellules iNKT à cette même concentration, ce qui confirme qu'elles sont bien activées. Le TCR a également été évalué pour confirmer si une internalisation avait lieu après l'activation, ce qui était également visible de par sa diminution en surface. L'expression du CD1d à la surface des monocytes a montré une augmentation. Il est clair que ces résultats doivent être pris avec des pincettes et que des conclusions ne peuvent pas être tirées, mais cela donne une première idée prometteuse. Des expériences supplémentaires sont dès lors nécessaires afin de confirmer cela.

De la même manière que précédemment, des analyses de RT-qPCR ont été réalisées pour investiguer si cette augmentation des niveaux de CD1d à la membrane résulte d'une stimulation de la transcription du gène *CD1d*. D'autres gènes cibles spécifiques de PPAR $\gamma$  ou RAR, tels que *FABP4* et *TGM2*, respectivement ou des gènes qui peuvent être modulés par les deux types de signalisation selon le contexte, tels que *PPAR $\gamma$*  et *CD36* ont également été analysés. Pour l'ensemble de ces résultats, nous avons observé des tendances mais pas des différences significatives. Dès lors, ces résultats sont à prendre avec des pincettes. Dès 4h, une augmentation des niveaux d'ARNm du CD1d est visible mais ne se maintient pas à 8 et 16h. L'augmentation du CD1d à la membrane est observable entre 8 et 24h (données non montrées). L'expression des gènes *PPAR $\gamma$* , *CD36* et de *TGM2* tend à augmenter à 4h comme *CD1d*. *FABP4*,

le gène spécifique de PPAR $\gamma$ , par contre, semble être induit mais avec une cinétique beaucoup plus lente. Les ox-LDLs peuvent transporter des lipides oxydés, ligands de PPAR $\gamma$ , mais également des précurseurs de l'acide rétinoïque qui peuvent être convertis en ATRA (*all-trans retinoic acid*) et initier rapidement la signalisation via RAR<sup>74</sup>. Il est possible que la petite stimulation précoce et transitoire de l'expression des gènes *PPAR $\gamma$* , *CD36*, *TGM2* et *CD1d* résulte d'une activation de la voie RAR. De nouvelles expériences en présence ou non d'agonistes et antagonistes des récepteurs nucléaires *PPAR $\gamma$*  et RAR seront nécessaires pour élucider ces questions.

Les ox-LDLs représentent un candidat intéressant pour expliquer l'activation chronique des cellules iNKT chez le patient obèse. Parmi les perspectives, une analyse des cellules immunes sur sang complet par cytométrie après l'ajout d'ox-LDLs conjugués à un fluorophore pourrait permettre de visualiser les cellules incorporant ces ox-LDLs, notamment les sous-populations de monocytes (classiques, intermédiaires et non-classiques), tout en évaluant l'expression du CD1d et l'activation des cellules iNKT. Par ailleurs, il serait pertinent d'injecter des ox-LDLs par voie intraveineuse chez la souris et d'analyser le sang complet par cytométrie en flux, méthode plus robuste et reproductible que l'étude sur PBMCs. Ces expériences *in vivo* permettraient de tenir compte que les différentes sous-populations de monocytes ont des durées de vie distinctes et ne présentent pas la même probabilité de rencontrer des ox-LDLs. Lors de ce mémoire, les iNKT analysées provenaient d'un donneur unique. C'est pourquoi, il faudrait reproduire ces expériences à partir d'au moins deux autres donneurs afin d'obtenir des résultats indépendants, renforçant la robustesse des résultats et la généralisation des observations. L'utilisation de LDLs non modifiées provenant du même donneur serait également un contrôle intéressant.

En résumé, ce mémoire a permis de montrer que l'environnement lipidique influence l'activation des cellules iNKT via la modulation de l'expression du CD1d sur les monocytes. Les acides gras saturés diminuent cette activation, en lien avec une baisse de l'expression du CD1d. Il semblerait que cela implique une régulation post-transcriptionnelle. Par ailleurs, les résultats préliminaires sur les ox-LDLs semblent montrer que ceux-ci induisent une modulation transitoire de l'expression du CD1d et de plusieurs gènes associés aux voies PPAR $\gamma$  et RAR, suggérant une régulation dynamique par les lipides oxydés. Ces résultats préliminaires doivent encore être confirmés, mais ouvrent la voie à de nombreuses pistes de recherches afin

d'élucider les mécanismes régulant l'expression du CD1d et l'activation des cellules iNKT dans le contexte de l'obésité.

## 6. Références

1. Ng, M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of adult overweight and obesity, 1990–2021, with forecasts to 2050: a forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* **405**, 813–838 (2025).
2. Sciensano. *sciensano.be* <https://www.sciensano.be/fr/sujets-sante/obesite/chiffres>.
3. Piening, A. *et al.* Obesity-related T cell dysfunction impairs immunosurveillance and increases cancer risk. *Nat Commun* **15**, 2835 (2024).
4. Zhang, Y. *et al.* Overweight, Obesity and Endometrial Cancer Risk: Results from a Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Biol Markers* **29**, e21–e29 (2014).
5. Gonzalez Rodriguez, E., Lamy, O., Hans, D., Favre, L. & Pralong, F. [b]Imagerie[/b] par DXA : le couteau suisse multifonction ? *Revue Médicale Suisse* **11**, 645–650 (2015).
6. Michelet, X. *et al.* Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat Immunol* **19**, 1330–1340 (2018).
7. Kitahara, C. M. *et al.* Prospective investigation of body mass index, colorectal adenoma, and colorectal cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *J Clin Oncol* **31**, 2450–2459 (2013).
8. Moon, J. M. *et al.* Increasing changes in visceral adiposity is associated with higher risk for colorectal adenoma: Multilevel analysis in a prospective cohort. *J of Gastro and Hepatol* **36**, 1836–1842 (2021).
9. Jang, S., Hong, W. & Moon, Y. Obesity-compromised immunity in post-COVID-19 condition: a critical control point of chronicity. *Front. Immunol.* **15**, 1433531 (2024).
10. Sheridan, P. A. *et al.* Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *Int J Obes (Lond)* **36**, 1072–1077 (2012).
11. Woodall, M. J., Neumann, S., Campbell, K., Pattison, S. T. & Young, S. L. The Effects of Obesity on Anti-Cancer Immunity and Cancer Immunotherapy. *Cancers* **12**, 1230 (2020).
12. Vick, L. V., Canter, R. J., Monjazeb, A. M. & Murphy, W. J. Multifaceted effects of obesity on cancer immunotherapies: Bridging preclinical models and clinical data. *Seminars in Cancer Biology* **95**, 88–102 (2023).
13. James, B. R. *et al.* Diet-induced obesity alters dendritic cell function in the presence and absence of tumor growth. *J Immunol* **189**, 1311–1321 (2012).
14. Boi, S. K. *et al.* Obesity diminishes response to PD-1-based immunotherapies in renal

cancer. *J Immunother Cancer* **8**, e000725 (2020).

15. Huang, S., Xing, Y. & Liu, Y. Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 $\alpha$  in metabolic regulation and disease. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 18726–18741 (2019).

16. Lee, K. P. K. *et al.* Structure of the Dual Enzyme Ire1 Reveals the Basis for Catalysis and Regulation in Nonconventional RNA Splicing. *Cell* **132**, 89–100 (2008).

17. Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S. & Xia, X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 352 (2023).

18. Park, S.-M., Kang, T.-I. & So, J.-S. Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. *Biomedicines* **9**, 791 (2021).

19. Berberich, A. J. & Hegele, R. A. A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocrine Reviews* **43**, 611–653 (2022).

20. Hung, Y.-P. *et al.* Measurement of lipid droplets in peripheral immune cells shows an immunomodulatory effect on monocyte polarization in experimental dyslipidaemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **650**, 73–80 (2023).

21. Jebari-Benslaiman, S. *et al.* Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* **23**, 3346 (2022).

22. Munno, M. *et al.* Radical Oxygen Species, Oxidized Low-Density Lipoproteins, and Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1: A Vicious Circle in Atherosclerotic Process. *Antioxidants (Basel)* **13**, 583 (2024).

23. Cho, C. H., Patel, S. & Rajbhandari, P. Adipose tissue lipid metabolism: lipolysis. *Current Opinion in Genetics & Development* **83**, 102114 (2023).

24. Cao, C. *et al.* Increased plasma fatty acid clearance, not fatty acid concentration, is associated with muscle insulin resistance in people with obesity. *Metabolism* **132**, 155216 (2022).

25. Liu, J. *et al.* Free fatty acids induce insulin resistance in both cardiac and skeletal muscle microvasculature in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 438–446 (2011).

26. Delarue, J. & Magnan, C. Free fatty acids and insulin resistance: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10**, 142–148 (2007).

27. Gianfrancesco, M. A., Paquot, N., Piette, J. & Legrand-Poels, S. Lipid bilayer stress in obesity-linked inflammatory and metabolic disorders. *Biochemical Pharmacology* **153**, 168–183 (2018).

28. Van Der Vusse, G. J. Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metabolism and*

*Pharmacokinetics* **24**, 300–307 (2009).

29. Tvrzicka, E., Kremmyda, L.-S., 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 Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **155**, 117–130 (2011).
30. Hubler, M. J. & Kennedy, A. J. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *J Nutr Biochem* **34**, 1–7 (2016).
31. University of Alberta, Fillmore, N., Abo Alrob, O., University of Alberta & Lopaschuk, G. D. *Fatty Acid Beta-Oxidation*. <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=39187> (2011) doi:10.21748/lipidlibrary.39187.
32. Shen, T. *et al.* Free fatty acids impair autophagic activity and activate nuclear factor kappa B signaling and NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome in calf hepatocytes. *Journal of Dairy Science* **104**, 11973–11982 (2021).
33. Blevins, H. M., Xu, Y., Biby, S. & Zhang, S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **14**, 879021 (2022).
34. Xing, J. *et al.* NLRP3 inflammasome mediate palmitate-induced endothelial dysfunction. *Life Sciences* **239**, 116882 (2019).
35. L'homme, L. *et al.* Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages. *Journal of Lipid Research* **54**, 2998–3008 (2013).
36. Legrand-Poels, S. *et al.* Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochemical Pharmacology* **92**, 131–141 (2014).
37. Feingold, K. R. Introduction to Lipids and Lipoproteins. in *Endotext* (eds. Feingold, K. R. et al.) (MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000).
38. Ginsberg, H. N. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* **27**, 503–519 (1998).
39. Ma, Z., Zhong, J., Tu, W., Li, S. & Chen, J. The functions of apolipoproteins and lipoproteins in health and disease. *Mol Biomed* **5**, 53 (2024).
40. Rahmany, S. & Jialal, I. Biochemistry, Chylomicron. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
41. Huang, J.-K. & Lee, H.-C. Emerging Evidence of Pathological Roles of Very-Low-Density

Lipoprotein (VLDL). *Int J Mol Sci* **23**, 4300 (2022).

42. van Zwol, W., van de Sluis, B., Ginsberg, H. N. & Kuivenhoven, J. A. VLDL Biogenesis and Secretion: It Takes a Village. *Circ Res* **134**, 226–244 (2024).

43. Yi, C. *et al.* Short-Chain Fatty Acids Weaken Ox-LDL-Induced Cell Inflammatory Injury by Inhibiting the NLRP3/Caspase-1 Pathway and Affecting Cellular Metabolism in THP-1 Cells. *Molecules* **27**, 8801 (2022).

44. Rye, K.-A. & Barter, P. J. Cardioprotective functions of HDLs. *Journal of Lipid Research* **55**, 168–179 (2014).

45. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation.* (Springer International Publishing : Imprint: Springer, Cham, 2015). doi:10.1007/978-3-319-09665-0.

46. Rader, D. J. Lipoprotein Metabolism. in *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* (eds. Offermanns, S. & Rosenthal, W.) 696–700 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008). doi:10.1007/978-3-540-38918-7\_190.

47. Rakateli, L., Huchzermeier, R. & Van Der Vorst, E. P. C. AhR, PXR and CAR: From Xenobiotic Receptors to Metabolic Sensors. *Cells* **12**, 2752 (2023).

48. Bruckert, E. & Le Goff, W. Physiologie du métabolisme des lipoprotéines. *Médecine des Maladies Métaboliques* **12**, 50–61 (2018).

49. Dash, S., Xiao, C., Morgantini, C. & Lewis, G. F. New Insights into the Regulation of Chylomicron Production. *Annu Rev Nutr* **35**, 265–294 (2015).

50. Gugliucci, A. The chylomicron saga: time to focus on postprandial metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* **14**, 1322869 (2023).

51. Njajou, O. T. *et al.* Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in a population-based cohort, the Health, Aging and Body Composition Study. *Diabetes Metab Res Rev* **25**, 733–739 (2009).

52. Kelly, A. S. *et al.* Relation of circulating oxidized LDL to obesity and insulin resistance in children. *Pediatr Diabetes* **11**, 552–555 (2010).

53. Alquraini, A. & El Khoury, J. Scavenger receptors. *Curr Biol* **30**, R790–R795 (2020).

54. Marcovecchio, P. M. *et al.* Scavenger Receptor CD36 Directs Nonclassical Monocyte Patrolling Along the Endothelium During Early Atherogenesis. *ATVB* **37**, 2043–2052 (2017).

55. Feinstein, M. J. *et al.* Nonclassical Monocytes (CD14dimCD16+) Are Associated With Carotid Intima-Media Thickness Progression for Men but Not Women: The Multi-Ethnic Study

of Atherosclerosis—Brief Report. *ATVB* **41**, 1810–1817 (2021).

56. Wilkin, C., Piette, J. & Legrand-Poels, S. Unravelling metabolic factors impacting iNKT cell biology in obesity. *Biochemical Pharmacology* **228**, 116436 (2024).

57. 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.* **14**, 1176724 (2023).

58. Birkholz, A. M. & Kronenberg, M. Antigen specificity of invariant natural killer T-cells. *Biomedical Journal* **38**, 470–483 (2015).

59. Liao, C.-M., Zimmer, M. I. & Wang, C.-R. The functions of type I and type II natural killer T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **19**, 1330–1338 (2013).

60. Jayawardena-Wolf, J. & Bendelac, A. CD1 and lipid antigens: intracellular pathways for antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* **13**, 109–113 (2001).

61. Brossay, L. *et al.* CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *Immunity* **10**, 1521–1528 (1998).

62. Kaczmarek, R., Pasciak, M., Szymczak-Kulus, K. & Czerwinski, M. CD1: A Singed Cat of the Three Antigen Presentation Systems. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **65**, 201–214 (2017).

63. Rampuria, P. & Lang, M. L. Regulation of Humoral Immunity by CD1d-Restricted Natural Killer T Cells. in *Immunology* 55–73 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-809819-6.00005-8.

64. Kawano, T. *et al.* CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of V $\alpha$  14 NKT Cells by Glycosylceramides. *Science* **278**, 1626–1629 (1997).

65. Macho-Fernandez, E. & Brigl, M. The Extended Family of CD1d-Restricted NKT Cells: Sifting through a Mixed Bag of TCRs, Antigens, and Functions. *Front. Immunol.* **6**, (2015).

66. Hosono, Y. *et al.* Identification of  $\alpha$ -galactosylceramide as an endogenous mammalian antigen for iNKT cells. *Journal of Experimental Medicine* **222**, (2025).

67. Govindarajan, S. *et al.* ER stress in antigen-presenting cells promotes NKT cell activation through endogenous neutral lipids. *EMBO Rep* **21**, e48927 (2020).

68. Morris, I., Croes, C.-A., Boes, M. & Kalkhoven, E. Advanced omics techniques shed light on CD1d-mediated lipid antigen presentation to iNKT cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1868**, 159292 (2023).

69. Girardi, E. & Zajonc, D. M. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD 1d and recognition by natural killer T cells. *Immunological Reviews* **250**, 167–179 (2012).

70. Sköld, M., Xiong, X., Illarionov, P. A., Besra, G. S. & Behar, S. M. Interplay of Cytokines

and Microbial Signals in Regulation of CD1d Expression and NKT Cell Activation. *The Journal of Immunology* **175**, 3584–3593 (2005).

71. Leslie, D. S. *et al.* Serum lipids regulate dendritic cell CD1 expression and function. *Immunology* **125**, 289–301 (2008).

72. Gervois, P. & Fruchart, J.-C. PPAR $\gamma$  : un récepteur nucléaire majeur de l'adipogenèse. *Med Sci (Paris)* **19**, 20–22 (2003).

73. Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C. & Sharma, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* **2**, 236–240 (2011).

74. Szatmari, I. *et al.* PPAR $\gamma$  controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 2351–2362 (2006).

75. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G. A., Thomazy, V. A. & Evans, R. M. PPAR $\alpha$  Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL.

76. Anderson, C. K., Reilly, S. P. & Brossay, L. The Invariant NKT Cell Response Has Differential Signaling Requirements during Antigen-Dependent and Antigen-Independent Activation. *J Immunol* **206**, 132–140 (2021).

77. Wilson, M. T. *et al.* The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 10913–10918 (2003).

78. Brennan, P. J., Brigl, M. & Brenner, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* **13**, 101–117 (2013).

79. Bedard, M. *et al.* Sterile activation of invariant natural killer T cells by ER-stressed antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 23671–23681 (2019).

80. Lisbonne, M. *et al.* Cutting Edge: Invariant V $\alpha$ 14 NKT Cells Are Required for Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperreactivity in an Experimental Asthma Model. *The Journal of Immunology* **171**, 1637–1641 (2003).

81. Simoni, Y., Diana, J., Ghazarian, L., Beaudoin, L. & Lehuen, A. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol* **171**, 8–19 (2013).

82. Franklin, R. A. & Medzhitov, R. Untangling iNKT Cell Function in Adipose Tissue Homeostasis. *Cell Metabolism* **32**, 148–149 (2020).

83. McEwen-Smith, R. M., Salio, M. & Cerundolo, V. The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity. *Cancer Immunol Res* **3**, 425–435 (2015).
84. Crosby, C. M. & Kronenberg, M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* **18**, 559–574 (2018).
85. Wang, X.-L. *et al.* Peripheral invariant natural killer T cell deficiency in metabolically unhealthy but normal weight versus metabolically healthy but obese individuals. *J Int Med Res* **44**, 1272–1282 (2016).
86. Lynch, L. *et al.* Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder through Regulatory Cytokine Production. *Immunity* **37**, 574–587 (2012).
87. Berger, S. *et al.* Lipodystrophy and obesity are associated with decreased number of T cells with regulatory function and pro-inflammatory macrophage phenotype. *Int J Obes* **41**, 1676–1684 (2017).
88. Lynch, L. *et al.* Invariant NKT cells and CD1d<sup>+</sup> cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur J Immunol* **39**, 1893–1901 (2009).
89. LaMarche, N. M. *et al.* Distinct iNKT Cell Populations Use IFN $\gamma$  or ER Stress-Induced IL-10 to Control Adipose Tissue Homeostasis. *Cell Metabolism* **32**, 243-258.e6 (2020).
90. Fernandes-da-Silva, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas. *Eur J Nutr* **60**, 2949–2960 (2021).
91. Iovino, M. *et al.* Novel XBP1s-independent function of IRE1 RNase in HIF-1 $\alpha$ -mediated glycolysis upregulation in human macrophages upon stimulation with LPS or saturated fatty acid. *Front Immunol* **14**, 1204126 (2023).
92. McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* **120**, 5.1.1-5.1.11 (2018).
93. Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* **23**, 37–45 (2014).
94. Gianfrancesco, M. A. *et al.* Saturated fatty acids induce NLRP3 activation in human macrophages through K<sup>+</sup> efflux resulting from phospholipid saturation and Na, K-ATPase disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1864**, 1017–1030 (2019).
95. Hua, J. *et al.* Dietary fatty acids modulate antigen presentation to hepatic NKT cells in nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* **51**, 1696–1703 (2010).

96. Lang, G. A., Maltsev, S. D., Besra, G. S. & Lang, M. L. Presentation of  $\alpha$ -galactosylceramide by murine CD1d to natural killer T cells is facilitated by plasma membrane glycolipid rafts. *Immunology* **112**, 386–396 (2004).
97. Payet, L. *et al.* Saturated Fatty Acids Alter the Late Secretory Pathway by Modulating Membrane Properties. *Traffic* **14**, 1228–1241 (2013).
98. Qiu, L. *et al.* HSV-1 UL56 protein recruits cellular NEDD4-family ubiquitin ligases to suppress CD1d expression and NKT cell function. *J Virol* **99**, e02140-24 (2025).
99. Ando, H. *et al.* Intracellular composition of fatty acid affects the processing and function of tyrosinase through the ubiquitin–proteasome pathway. *Biochemical Journal* **394**, 43–50 (2006).
100. Szatmari, I. *et al.* Activation of PPAR $\gamma$  Specifies a Dendritic Cell Subtype Capable of Enhanced Induction of iNKT Cell Expansion. *Immunity* **21**, 95–106 (2004).

## 7. Annexes

### Annexe 1. Anticorps primaires utilisés pour les Western Blot.

Anticorps	Espèce de production	Taille	Clone	Référence	Firme
HSP90	Lapin	90 kDa	CD45G5	#4877	Cell Signalling
XBP1s	Lapin	60 kDa	D2C1F	#12782	Cell Signalling

### Annexe 2. Couples d'amorces des gènes utilisés pour la RT-qPCR.

Gène	Amorce sens ( <i>forward</i> )	Amorce anti-sens ( <i>reverse</i> )	Firme
<i>CD1d(1)</i>	5'-AGCTACACC TCCATGGGCTT-3'	5'-GGTGTGATGAAAGCTGCCT C-3'	IDT
<i>CD1d(2)</i>	5'-GAGGCCCACTTTGGGTAA-3'	5'-CACTGTTTCCCTCGTCCACTT-3'	IDT
<i>CD36</i>	5'- TGTAACCCAGGACGCAGGACGCTGAGG -3'	5'-GAAGGTTCGAAG TTCGAAGATGGCACC-3'	IDT
<i>FABP4</i>	5'-GGATGGAAAATCAACCACCA-3'	5'-GGAAGTGACGCCTTTCATGA-3'	IDT
<i>TGM2</i>	5'-CTGGGCCACTTCATTTTGC-3'	5'-ACTCCTGCCGCTCCTCTTC-3'	IDT
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	5'-AAAGAAGCCGACACTAAACC-3'	5'-CTTCCATTACGGAGAGATCC-3'	IDT

## Résumé

L'obésité est une maladie chronique qui ne cesse de croître à l'échelle mondiale. L'un des problèmes majeur réside dans le fait qu'elle augmente le risque de développer des maladies métaboliques et cardiovasculaires ainsi que certains cancers, en lien avec une dyslipidémie. Le laboratoire d'Immuno-métabolisme et Nutrition s'intéresse à l'impact d'un environnement riche en lipides sur les fonctions des cellules immunitaires et particulièrement les cellules T invariantes « *Natural Killer* » (iNKT). Ces cellules jouent un rôle central dans la régulation de la réponse immune grâce à leur capacité à s'activer rapidement en réponse à la présentation d'antigènes lipidiques par le CD1d, exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APCs). Le laboratoire a mis en évidence une activation chronique des cellules iNKT du sang périphérique de patients obèses associée à une apoptose accrue et à un dysfonctionnement. De plus, une augmentation du CD1d à la surface des monocytes des patients obèses a été observée, suggérant la possibilité que cette augmentation mène à l'activation des cellules iNKT. L'objectif de ce mémoire était d'étudier l'impact d'un environnement riche en lipides sur la modulation du CD1d sur les monocytes et sur leur capacité d'activer les cellules iNKT dans des expériences de co-culture.

Nous avons démontré que le traitement des monocytes primaires avec des acides gras saturés induisait de manière dose-dépendante la diminution de l'expression du CD1d à la membrane ainsi qu'une inhibition de l'activation des cellules iNKT se traduisant par une diminution de l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69 ainsi qu'une baisse de la production d'IFN $\gamma$ . Les acides gras insaturés, seuls, n'ont eu aucun impact, par contre ils ont permis de contrecarrer l'inhibition induite par les acides gras saturés. L'analyse des niveaux d'ARNm *CD1d* suggère toutefois que cette régulation ne s'opère pas au niveau transcriptionnel. La seconde partie du mémoire a porté sur l'étude des ox-LDLs, dont les concentrations plasmatiques sont également élevées chez les personnes obèses. Bien que préliminaires, nos données suggèrent que les ox-LDLs pourraient induire une augmentation de l'expression du CD1d sur les monocytes de l'ordre transcriptionnel, entraînant une activation des cellules iNKT, comme en témoigne l'augmentation des marqueurs d'activation CD25 et CD69 sur les cellules iNKT et de la production des cytokines IFN $\gamma$  et IL-4.

Ces résultats préliminaires ouvrent la voie à de nombreuses pistes de recherches afin d'élucider les mécanismes régulant l'expression du CD1d et l'activation des cellules iNKT dans le contexte de l'obésité.