



HAL
open science

Etude du rôle des sous-populations monocytaires dans l'obésité et l'insulinorésistance

Sophie Béliard-Lasserre

► **To cite this version:**

Sophie Béliard-Lasserre. Etude du rôle des sous-populations monocytaires dans l'obésité et l'insulinorésistance. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : 2011PA066445 . tel-00824652

HAL Id: tel-00824652

<https://theses.hal.science/tel-00824652>

Submitted on 22 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

Spécialité de Physiologie et Physiopathologie

Présentée par **Sophie BELIARD-LASSERRE**

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris VI

**ETUDE DU ROLE DES SOUS-POPULATIONS
MONOCYTAIRES DANS L'OBESITE ET
L'INSULINORESISTANCE**

Thèse dirigée par le Dr. **Philippe LESNIK**

Soutenue le 15 décembre 2011

Jury :

Pr Karine Clément	Présidente
Pr Marie-Christine Alessi	Rapporteur
Dr Anne Bouloumié	Rapporteur
Dr Christophe Combadière	Examineur
Dr Philippe Lesnik	Directeur de thèse

Sommaire

ABBREVIATION.....	5
LISTE DES PUBLICATIONS	7
AVANT-PROPOS.....	10
INTRODUCTION.....	12
I. ROLE DES MONOCYTES EN CONDITIONS HOMEOSTATIQUES ET AU COURS DE L'INFLAMMATION.....	13
A. Les différentes populations de monocytes.....	14
1. Chez l'homme	14
2. Chez la souris	16
B. Le rôle des monocytes	18
1. Rôle des monocytes dans la circulation.....	18
2. Monocytes : cellules précurseurs des phagocytes mononuclés.....	20
C. Trafic monocyttaire : de la moelle osseuse aux tissus cibles.....	27
1. Récepteurs aux chimiokines et monocytes	27
2. Provenance des monocytes.....	32
3. Trafic et fonctions des monocytes en conditions homéostatiques.....	34
4. Trafic et fonctions des monocytes en conditions inflammatoires.....	37
II. L'INFLAMMATION AU COURS DE L'OBESITE.....	45
A. Introduction sur l'obésité et l'insulinorésistance.....	45
B. Nature de l'inflammation au cours de l'obésité	46
C. Les tissus inflammés au cours de l'obésité.....	48
1. Le tissu adipeux.....	50
2. Le foie.....	58
3. Le muscle.....	59
4. L'hypothalamus.....	60
5. Le pancréas.....	61
OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE.....	62
RESULTATS-ARTICLE.....	64
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	103

DISCUSSION GENERALE.....	116
ANNEXE 1.....	133
BIBLIOGRAPHIE.....	134
ANNEXE 2: article 2: Bcl-x inactivation in macrophages accelerates progression of advanced atherosclerotic lesions in Apoe ^{-/-} mice.....	145
ANNEXE 3: article 3: Influence of dendritic cells on cholesterol absorption and excretion....	169

REMERCIEMENTS

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement John Chapman et Philippe lesnik de m'avoir accueilli au sein de leur unité. Je remercie Phillipe pour tout ce qu'il m'a enseigné en recherche fondamentale, pour sa disponibilité et pour son enthousiasme scientifique.

Je remercie l'ensemble des membres de mon équipe pour leur soutien et leur aide. Je remercie particulièrement Flora, pilier du laboratoire, qui m'a enseigné beaucoup de savoirs-faire, et qui est devenue mon amie. Merci à Virginie et Laura pour leur amitié.

Je remercie tous les autres membres de l'unité 939, pour leur soutien, leurs conseils scientifiques, le partage de leurs savoir-faire.

Je remercie le Professeur Eric Bruckert et le Docteur Philippe Giral pour toute la confiance qu'ils m'ont accordée, ainsi que pour le partage de leurs connaissances aussi bien en médecine qu'en recherche.

Je remercie bien évidemment toute ma famille.

ABBREVIATIONS

TA	Tissu adipeux
HFD	High Fat Diet
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) Receptor 1
KI	Knock-In
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
LPS	Lipopolysaccharides
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
ApoE	Apolipoprotéine E
CCR2	Chemokine (CC motif) Receptor 2
CCR5	Chemokine (CC motif) Receptor 5
TLR	Toll Like Receptor
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
GTT	Glucose Tolerance Test
ITT	Insulin Tolerance Test
ROS	Reactive Oxygen Species
NO	Nitric Oxide
FcγR-III	Fragment crystallizable Receptor
IL	Interleukine
LPS	Lipopolysaccharides
NK	Natural Killer
LT	Lymphocyte T
CD	Cluster of differentiation
IDM	Infarctus du myocarde
MIP-1α	Macrophage Inflammatory protein 1
MDPs	Macrophages Dendritic cells Progenitor

GFP	Green Fluorescence Protein
DC	Dendritic cell
Mgl-1	Macrophage galactose type-C Lectin
NASH	Non Alcoholic steatohepatitis
JNK	Junk Kinase

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS INDEXEES

1. **S Béliard**¹, M Coudert^{2,3}, R Valéro⁴, L Charbonnier¹, E Duchêne¹, Y Bayet¹, F Delestre¹, F.A Allaert⁵, E Bruckert¹. Validation of a short self-administered food frequency questionnaire to evaluate nutritional lifestyles in hypercholesterolemic patients. **Soumis à Nutrition, Metabolism and cardiovascular diseases** en octobre 2011.
2. Nogueira JP, Maraninchi M, **Béliard S**, Lorec AM, Berthet B, Bégu-Le Corroller A, Dubois N, Grangeot R, Mattei C, Gaudart J, Nicolay A, Portugal H, Vialettes B and Valero R. “Ghrelin is associated with the isolated low HDL-cholesterol obese phenotype independently of insulin resistance and CRP level”. **Soumis à Nutrition & Metabolism** en octobre 2011.
3. Deswaerte V^{1,2,5}, Huby T^{1,2,3,4}, Saint-Charles F.^{1,2}, Proschogo N⁵, Chapman J.^{1,2}, **Béliard S**^{1,2,3,4}, Pirault J.^{1,2}, Lesnik P^{1,2,3,4} and Jessup W⁵. Influence of Dendritic cells on cholesterol absorption and excretion. **Manuscrit en préparation, soumission prévue dans Journal of Clinical Investigation.**
4. Andrew I. U. Shearn^{1,2}, Virginie Deswaerte^{1,2,5}, Emmanuel L. Gautier¹, Flora Saint-Charles^{1,2}, John Pirault^{1,2}, Edmund B. Rucker III⁴, **Sophie Béliard**^{1,2,3}, John Chapman^{1,2}, Wendy. Jessup⁵, Thierry Huby^{1,2,3} and Philippe Lesnik^{1,2,3}. Bcl-x inactivation in macrophages accelerates progression of advanced atherosclerotic lesions in Apoe^{-/-} mice. **En revision favorable à ATVB.**
5. Nogueira JP, Maraninchi M, **Béliard S**, Lorec A, Berthet B, Bégu-Le Corroller A, Dubois N, Grangeot R, Mattei C, Nicolay A, Portugal H, Vialettes B, Valéro R. Ghrelin and adiponectin are associated with HDL-cholesterol levels in obesity

independently of insulin resistance and inflammation. **Soumis à ATVB août 2010 (accepté).**

6. **Béliard S**, Nogueira JP, Maraninchi M, Lairon D, Nicolay A, Giral P, Portugal H, Vialettes B, Valéro R. [Parallel increase of plasma apoproteins C-II and C-III in Type 2 diabetic patients.](#) **Diabetic Medicine**, 2009 (IF 3,182)
7. Meguerditchian C, Jacquet P, **Béliard S**, Benderitter T, Valero R, Vialettes B. “Scleredema adutorum of Buschke: an under recognized skin complication of diabetes”. **Diabetes and metabolism**, 2006 (IF 2,558)
8. Vialettes B, Samuelian-massat C, Valero R, **Béliard S**. “The refusal of treatment in anorexia nervosa, an ethical conflict with the characters: “the girl, the family and the medical profession”. Discussion in a french legislative concept”. **Diabetes and metabolism**, 2006 (IF 2,558)
9. Valéro R, Lorec AM, Paganelli F, **Béliard S**, Atlan C, Lairon D, Vialettes B, Portugal H. “Fasting apoB-48 level and coronary heart disease in a population without frank fasting hypertriglyceridemia” **Metabolism**, 2005 (IF 2,659).
10. Valéro R, **Béliard S**, Paquis-Fluckinger V, Vialettes B. « Monogenic diabetes: a useful dimension for diabetology practice » **Ann Endocrinol (Paris)** 2005 (IF 0.3).
11. **Béliard S**, Valéro R, Vialettes B. « Atypical neuroleptics and diabetes. » **Diabetes and metabolism**, 2003 (IF 2,558)
12. Valéro R, Baron ML, Guérin S, **Béliard S**, Lelouard H, Kahn-Perles B, Vialettes B, Nguyen C, Imbert J, Naquet P. “A defective NF-Kappa B/RelB pathway in autoimmune-prone NZB mice is associated with inefficient expansion of thymocytes and dendritic cells.” **J Immunol**, 2002 (IF 5,847).

PUBLICATIONS NON INDEXEES

Beliard S et Lesnik P. Inflammation et Athérosclérose : mise à jour des mécanismes moléculaires impliqués dans l'inflammation vasculaire. **Diabète et Obésité**. Mars **2011**, vol 16, N° 47.

Beliard S et Lesnik P. Les triglycérides : facteur de risque en recherche d'indépendance. **Abstract Atherosclerosis**. N°16, Mai **2010**.

Vialettes B, Valero R, **Beliard S**. Y a-t-il un intérêt clinique à doser les apoprotéines dans l'évaluation du risque vasculaire ? Vingt-Quatrièmes Journées Françaises d'Endocrinologie Clinique, Nutrition et Métabolique, **2004**.

PUBLICATIONS DIDACTIQUES

Coauteur du chapitre « Médicaments obésogènes » du manuel « **Traité de Médecine et Chirurgie de l'Obésité** » coordonné par le Pr A Basdevant. Flammarion Médecine-Sciences, 2011.

AVANT-PROPOS

L'abondance et la disponibilité alimentaire associées à la sédentarité de nos sociétés « modernes » ont entraîné peu à peu une véritable épidémie mondiale d'obésité. En Amérique du Nord, dans la péninsule arabique et dans certaines îles du Pacifique, la prévalence de l'obésité dépasse les 30%. En France, la prévalence de l'obésité ne cesse de croître depuis les années 1990, atteignant les 15 % en 2009 (ObEpi 2009, Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. <http://www.roche.fr>). Depuis une vingtaine d'années, beaucoup de travaux de recherche clinique et fondamentale se sont intéressés aux causes et aux conséquences de cette maladie.

Chez l'homme, comme dans les modèles animaux, l'obésité est associée à une inflammation de bas grade. En 2006, pour la première fois, le concept de « métainflammation » était élaboré pour décrire l'état d'inflammation chronique de bas grade au cours de l'obésité ¹. L'excès chronique de nutriments entraîne non seulement des dépôts ectopiques de graisses (c'est-à-dire dans les organes dont la fonction originelle n'est pas le stockage des graisses) mais aussi des anomalies des médiateurs cellulaires et moléculaires de l'inflammation et de l'immunité. Un régime riche en graisses va donc entraîner une inflammation chronique de multiples tissus : tissu adipeux (TA), foie, muscle, vaisseaux, pancréas et hypothalamus ². L'inflammation de ces tissus est notamment la résultante d'une accumulation de cellules immunes parmi lesquelles les macrophages ³. Ces derniers vont sécréter des facteurs pro-inflammatoires qui vont altérer les voies de signalisation de l'insuline et entraîner une insulino-résistance du TA, du foie, du muscle et de l'hypothalamus ⁴. L'insulino-résistance est un facteur de risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires.

Depuis une dizaine d'années, de nombreux auteurs se sont intéressés aux rôles des cellules immunitaires au cours de l'obésité, notamment aux cellules recrutées dans le tissu adipeux. Une des finalités de ces travaux de recherche est de répondre à la question suivante: Est-ce que moduler l'inflammation du TA, notamment par le biais des cellules immunitaires, peut avoir un impact sur l'obésité, c'est-à-dire moduler la quantité et/ou la qualité du TA, et donc les complications comme l'insulinorésistance et la stéatose hépatique ? Les monocytes sont les précurseurs circulants des macrophages tissulaires, acteurs principaux de l'inflammation du TA. Une des approches utilisée pour étudier le rôle de ces différentes populations de macrophages dans le TA est de supprimer l'expression de gènes codant pour des récepteurs aux chimiokines (ou pour des chimiokines) impliqués dans le recrutement et/ou la survie de monocytes/macrophages dans des modèles murins. Les phénotypes de ces modèles murins génétiquement modifiés sont ensuite étudiés au cours de l'obésité pour tenter de décrypter qui sont les acteurs clés de l'inflammation du TA.

Mon projet de thèse s'est inscrit dans ce cadre d'étude du rôle spécifique d'une sous-population de monocytes dans l'inflammation du tissu adipeux, dans l'insulinorésistance et dans la prise de poids. A l'aide de modèles murins génétiquement modifiés dont les populations monocytaires sont modulées, nous avons pu mettre en évidence le rôle d'une sous-population spécifique de monocytes dans l'obésité et l'insulinorésistance.

INTRODUCTION

I. ROLE DES MONOCYTES EN CONDITIONS HOMEOSTATIQUES ET AU COURS DE L'INFLAMMATION

Les monocytes circulent dans le sang, la rate et la moelle osseuse et ne se différencient pas en condition normale (c'est-à-dire en l'absence d'inflammation). Ils représentent 5 à 10 % des leucocytes circulants chez l'homme et 2 % des leucocytes circulants chez la souris (seulement 100 000 cellules au total chez la souris). Les monocytes sont des cellules immunitaires effectrices qui ont la propriété de migrer dans les tissus inflammés grâce à des récepteurs aux chimiokines et à des molécules d'adhésion. Ils peuvent également sécréter des cytokines et capter des débris cellulaires ou des molécules toxiques. Les monocytes ont également la propriété de se différencier en macrophages et en cellules dendritiques dans les tissus agressés mais aussi en conditions normales ⁵. La migration et la différenciation des monocytes dépendent du tissu agressé et du type d'agression ⁶. Les monocytes humains et murins présentent certaines similitudes ⁷. Ils sont définis par l'expression du récepteur au MCS-F (CD115) et du récepteur aux chimiokines CX3CR1. Ils possèdent un large répertoire de récepteurs « scavengers » qui reconnaissent des lipides aussi bien que des microorganismes. Lorsque les monocytes sont stimulés, ils peuvent produire de forts taux de ROS (Reactive Oxygen Species), de prostaglandines, de facteurs du complément, d'oxyde nitrique (NO) (seulement chez la souris), de cytokines, d'enzymes protéolytiques et de molécules d'adhésion. Les monocytes jouent un rôle dans la défense contre les pathogènes ⁶. Ils peuvent faire de la présentation antigénique mais de façon beaucoup moins efficace que les cellules dendritiques ⁸.

A. Les différentes populations de monocytes

1. Chez l'homme

Au début des années 1980, deux sous-populations de monocytes sont décrites dans le sang humain, se différenciant par leur fréquence, leur morphologie et leurs antigènes de surface CD16 (FC γ R-III) et CD14⁹. Ces résultats sont les premiers en faveur d'un rôle propre joué par chaque sous-population. L'expression de CD14 et CD16 sur la surface des monocytes permet leur classification en deux sous-populations majeures : les cellules CD14⁺⁺CD16^{neg}, majoritaires (représentent 90% des monocytes), appelées « monocytes classiques » car ressemblent à la description originale des monocytes ; et les cellules CD14⁺(ou ^{dim}) CD16⁺⁺ (ou cellules CD16⁺) appelées « non-classiques » par opposition^{10 11}. Plus récemment, de nouvelles populations ont été identifiées sur la base du degré d'expression de leurs récepteurs membranaires et de différents gènes ainsi que sur l'existence de fonctions spécifiques. Une troisième population est maintenant décrite chez l'homme : les cellules CD14⁺⁺CD16⁺ appelées « intermédiaires ». (Table 1).

Subset	Markers	Chemokine receptors	Functions
Mouse			
LY6C ^{hi}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{hi}	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Pro-inflammatory ⁷ and antimicrobial ³ roles
LY6C ^{low}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{low}	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹¹ ; early responses ¹¹ ; tissue repair ¹²⁸
Human			
Classical	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Resemble LY6C ^{hi} monocytes based on gene-expression arrays ^{7,17,140}
Intermediate	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Pro-inflammatory roles ^{12,15}
Non-classical	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹⁴ ; antiviral roles ¹⁴

CCR2, CC-chemokine receptor 2; CX₃CR1, CX₃C-chemokine receptor 1.

Table 1 : Sous populations monocytaires chez l'homme et chez la souris. D'après Shi and Pamer, Nature Reviews Immunology 2011¹².

a) Les monocytes classiques

Les « monocytes classiques » ($CD16^{neg}$), population majoritaire, expriment un fort niveau de CCR2, un faible niveau de CX3CR1, et ont une forte activité phagocytaire. Leur phénotype, basé sur l'expression de leurs récepteurs membranaires ($CCR2^+CX3CR1^{low}$) et sur leur signature transcriptionnelle, présente une forte homologie avec celui des monocytes $Gr1^{high}$ de la souris. Cependant, *in vitro*, en réponse au LPS ils vont plutôt sécréter de l'Interleukine-10 (IL-10) que du TNF- α (Tumor Necrosis Factor) et de l'IL-1.

b) Les monocytes intermédiaires

A coté de cette population majoritaire, des travaux plus récents ont permis d'identifier deux sous-populations de $CD16^+$, très différentes sur le plan phénotypique et fonctionnel^{13 14}¹⁵. Parmi elles, les monocytes « intermédiaires » ($CD14^{++}CD16^+$) qui expriment les Fc récepteurs CD64 et CD32, ont une activité de phagocytose et sécrète du TNF- α et de l'IL-1 en réponse au LPS (Lipopolysaccharides)^{15 16}. Ils ont donc un fort potentiel pro-inflammatoire.

c) Les monocytes non classiques

Au contraire, les $CD14^{dim}CD16^+$ (qui ont gardé la nomenclature de « non-classiques ») n'expriment pas d'autres Fc récepteurs que CD16, n'ont pas d'activité de phagocytose et ne sécrète pas de TNF- α et de l'IL-1 en réponse au LPS. Il est maintenant clair que les différentes sous-populations monocytaires exercent des fonctions critiques spécifiques en réponses aux pathogènes chez l'homme comme chez la souris⁶. Cependant, les différences observées entre les sous-populations monocytaires chez l'homme et chez la souris ont conduit à de nombreux débats sur la pertinence du degré d'homologie fonctionnelle et phénotypique entre les monocytes humains et les monocytes murins^{7 17}. Le groupe du Dr. Geissmann vient récemment d'éclairer ces débats sur l'analogie fonctionnelle des monocytes humains et murins¹⁸. Les auteurs démontrent premièrement que les monocytes $CD14^{dim}$ humains présentent de nombreuses caractéristiques phénotypiques communes avec les monocytes

Gr1^{low} murins (cf définition de Gr1 dans le paragraphe sur les monocytes murins). En effet, ils se caractérisent par des expressions de gènes communes, une faible activité de phagocytose, une absence de production de ROS et de cytokines inflammatoires en réponse au LPS et aux agonistes des TLR (Toll Like Receptor) classiques (1, 2 et 4), ainsi qu'une faible activité inflammatoire en condition homéostatique. Deuxièmement, grâce à un transfert adoptif de monocytes humains de sujets sains dans des souris déficientes pour les lymphocytes et pour les natural killer (NK) (Rag2^{-/-}Il2Rγ^{-/-}), ils observent par microscopie intravitale que les monocytes CD14^{dim}CD16⁺⁺ patrouillent le long des vaisseaux de la même façon que les monocytes Gr1^{low} murins¹⁹. Pour finaliser le phénotype des CD14^{dim}, les auteurs démontrent que les CD14^{dim} peuvent être activés par les voies TLR7 et TLR8 par des virus, des complexes immuns et des acides nucléiques, ce qui en fait des acteurs clés de la réponse innée immunitaire. Ils retrouvent également que les Gr1^{low} murins répondent mieux aux agonistes de TLR7 qu'au LPS, rajoutant un degré de fonctionnalité commune entre CD14^{dim} et Gr1^{low}.

Pour conclure, l'équipe du Dr. Geissmann décrit une analogie forte entre la sous-population spécifique de monocytes CD14^{dim} humains et celle de Gr1^{low} murins. Ils proposent une nouvelle classification des monocytes humains, non plus basée sur CD16⁺ et CD16^{neg} mais sur la présence de CD14 : les CD14^{neg} (ou ^{dim}), analogues aux Gr1^{low} murins et les CD14⁺ (CD16⁺ ou CD16^{neg}), représentant plus de 90% des monocytes, plutôt pro-inflammatoires et analogues aux Gr1^{high} murins.

2. Chez la souris

L'hétérogénéité des populations monocytaires est conservée chez les mammifères (les cochons, les rats, les souris, les vaches)^{20 21 22}. En 2003, le Dr. Geissmann et ses

collaborateurs décrivent pour la première fois *in vivo*, deux principales populations de monocytes, qui diffèrent par leurs propriétés migratoires²³. Chez la souris comme chez l'homme, ces deux populations de monocytes diffèrent par l'expression membranaire de deux récepteurs aux chimiokines : CX3CR1 et CCR2. Grâce à un élégant modèle de transfert adoptif chez la souris, les auteurs démontrent que les monocytes CX3CR1^{low}CCR2⁺Gr1⁺ (aussi appelés Gr1^{high} ou Ly6C^{high}) ont une demi-vie courte, sont recrutés sur les sites inflammés et sont les précurseurs des macrophages et des cellules dendritiques en conditions inflammatoires. Ce recrutement au sein des sites inflammés implique CCR2 et CD62-ligand (la L-sélectine). Ils les nomment « monocytes inflammatoires ». Par contre, les monocytes CX3CR1^{high}CCR2^{neg}Gr1^{low} (aussi appelés Gr1^{low} ou Ly6C^{low}) ont une demi-vie longue et sont les précurseurs des macrophages résidents et de cellules dendritiques en conditions normales dans les tissus non inflammés (ce sont les seules cellules à repeupler les tissus étudiés en conditions homéostatiques : foie, cerveau, rate, poumon, après transfert adoptif) (Table 2).

Gr1 est un antigène de différenciation myéloïde, utilisé comme marqueur membranaire des monocytes, des neutrophiles et des précurseurs myéloïdes. L'épitope Gr1 est représenté par deux molécules Ly-6C et Ly-6G. Ly-6G est porté par les neutrophiles alors que Ly-6C est porté par les monocytes circulants et à un moindre degré sur les granulocytes dans la moelle osseuse²⁴. Ly-6C est utilisé comme marqueur des monocytes chez la souris. Gr1 est aussi utilisé comme marqueur monocyttaire, lorsque les polynucléaires neutrophiles sont exclus à l'aide d'autres marqueurs (comme par exemple le récepteur au M-CSF : CD115). Par extension, dans de nombreuses publications, les auteurs utilisent le terme de monocytes Gr1^{high} (Ly-6^{high}) ou monocytes Gr1^{low} ou ^{neg} (Ly-6C^{low}), en ayant préalablement pris le soin d'exclure les granulocytes.

La classification des monocytes murins demeure inchangée depuis sa description ^{7 25}, par contre les fonctions spécifiques de chaque sous-population Gr1^{high} et Gr1^{low} dans différentes pathologies sont l'objet d'intenses débats.

	Ly6C ^{high}	Ly6C ^{low}
MHC II	-	-
Ly6G	-	-
CD11b	+	+
CD115 (M-CSF-R)	+	+
α ₃ CR1	Intermediate	High
CCR2	+	-
CD62L (L-selectin)	+	-
CCR5	-	+
CD11c	-	+*
CD43	-	+
MBR	-	+
VLA-4	-	+
LFA-1	Intermediate	High
ICAM-1	Intermediate	High
F4/80	Intermediate	High

*Ly6C^{low} monocytes were described as negative for mann et al. (12).

Table 2 : Profils phénotypiques des deux sous-populations monocytaires Ly6C^{low} (Gr1^{low}) et Ly6C^{high} (Gr1^{high}) chez les souris C57BL/6. D'après Dominguez et Ardavin, *Immunological Reviews* 2010 ²⁶.

B. Le rôle des monocytes

1. Rôle des monocytes dans la circulation

Comme les monocytes ont une demi-vie courte dans la circulation (estimée à environ un jour chez la souris ²⁷), de nombreux auteurs présentent cette population comme un simple réservoir de cellules précurseur des phagocytes mononucléés (macrophages et cellules

dendritiques) ²⁸. Cependant, plusieurs travaux ont mis en évidence que les monocytes circulants pouvaient avoir des fonctions effectrices dans le sang. Par exemple, les monocytes participent à la clairance de microorganismes ⁶. Cette propriété a notamment été démontrée lors de l'infection systémique à *Listeria Monocytogenes*, au cours de laquelle les monocytes captent la bactérie par ses TLR membranaires, puis les éliminent grâce à la production de ROS et l'action d'enzymes protéolytiques lysosomales ²⁹. Il a aussi été mis en évidence que les précurseurs médullaires des monocytes (promonocytes) ont la capacité de capter des antigènes provenant de cellules apoptotiques (lymphocytes B et neutrophiles) dans la moelle osseuse³⁰. Ces monocytes sortent ensuite de la moelle et migrent en périphérie pour présenter les antigènes aux LT effecteurs ³⁰. Les monocytes matures circulants peuvent aussi faire de la clairance de débris apoptotiques ³¹. Récemment, le Dr.Peng et ses collaborateurs ont injecté des thymocytes apoptotiques marqués dans des modèles murins et étudié leur devenir. Les résultats de leurs travaux sont très intéressants car ils mettent en évidence que ce sont les monocytes Gr1^{low} qui phagocytent les débris apoptotiques, puis que ces derniers migrent dans la rate où ils vont se différencier en cellules dendritiques DC capables de tolérer des cellules T. Dans les modèles murins d'athérosclérose, modèles dans lesquels la cholestérolémie est élevée, il a été démontré que les monocytes, équipés de nombreux « scavengers récepteurs », pouvaient capter des lipides neutres. Cette charge en lipides entraîne une activation des monocytes circulants avant même qu'ils ne pénètrent dans l'endothélium artériel ^{32 33 34}. Très récemment, il a été montré que l'apolipoprotéine E (ApoE) joue un rôle important dans la protection de l'internalisation des lipides et de l'activation monocytaire ³⁵. Certains chercheurs évoquent la possibilité d'échange d'informations entre le sang circulant et les tissus grâce à l'émission de « filopodes-like » par les monocytes à travers la paroi vasculaire (communication orale du Dr. Geissmann, non publiée).

Ces données mettent en lumière des propriétés spécifiques des monocytes dans le sang circulant.

2. Monocytes : cellules précurseurs des phagocytes mononucléés

Les monocytes sont les cellules précurseurs des macrophages et de certains types de cellule dendritiques (figure 1).

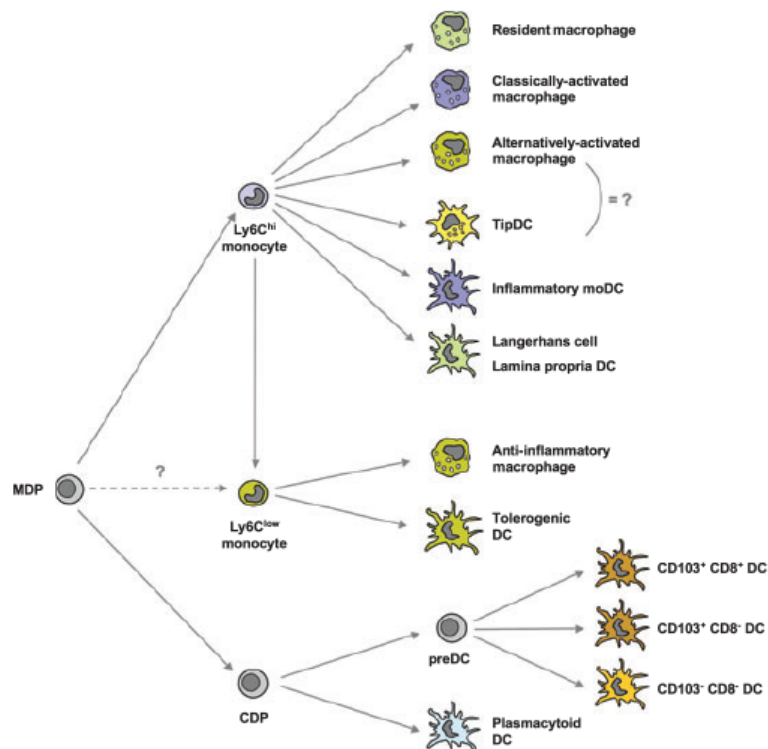


Figure 1: Macrophages et cellules dendritiques dérivées des monocytes. D'après Dominguez et Ardavin, *Immunological Reviews* 2010²⁶.

a) Les macrophages

(1) Généralités sur les macrophages

Les macrophages sont présents dans tous les tissus. Ils sont impliqués dans l'homéostasie tissulaire, l'inflammation en réponse à un stress et la résolution de l'inflammation. Les macrophages ont longtemps été considérés comme les acteurs clés de la réponse immunitaire effectrice à travers leurs propriétés de phagocytose, mais depuis quelques années, on sait qu'ils jouent également un rôle primordial dans la maintenance de l'homéostasie tissulaire, indépendamment de la réponse immune ³⁶. Ce sont eux qui sont impliqués dans le nettoyage des débris cellulaires générés lors du remodelage tissulaire et notamment dans la clairance des cellules apoptotiques. Ce processus de nettoyage s'effectue en l'absence de stimulation immunitaire et semble ne pas entraîner de production de médiateurs immuns ³⁷.

(2) Les différentes sous-populations de macrophages

Les macrophages ont une remarquable plasticité qui leur permet de répondre efficacement aux modifications de signaux de leur environnement. Cette plasticité inclut une modification profonde de leur phénotype et de leurs propriétés fonctionnelles. La réponse immunitaire, innée comme adaptative, peut entraîner une augmentation ou bien une diminution de la réponse immune du macrophage (phagocytose, production de cytokines pro-inflammatoires etc...). Cette dernière est notamment nécessaire lors de la résolution de l'inflammation. Il y a une dizaine d'années, les macrophages ont été classifiés de façon dichotomique en M1 pour « classically activated macrophages » ou macrophages « pro-inflammatoires » et M2 pour « alternatively activated macrophages » ou macrophages « anti-inflammatoires » ³⁸. Plus récemment, la population de macrophages M2 a été subdivisée. En effet, les macrophages M2 ont été décrits la première fois en 1992 ³⁹ et ont été nommés « alternatively activated » par opposition aux macrophages M1. Cependant, le Dr. Edwards et ses collaborateurs démontrent

en 2006 que les macrophages M2 représentent une population hétérogène de macrophages cicatriciels et de macrophages anti-inflammatoires qui diffèrent par leurs propriétés ⁴⁰. Actuellement, une majorité des auteurs s'accorde pour définir 3 populations: les macrophages pro-inflammatoires ou M1 (« classically activated macrophages »), les macrophages cicatriciels (« wound healing macrophages ») et les macrophages anti-inflammatoires (« regulatory macrophages ») ³⁶ qui font partie des M2. Les 3 types de macrophages peuvent être activés par des signaux de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (figure 2).

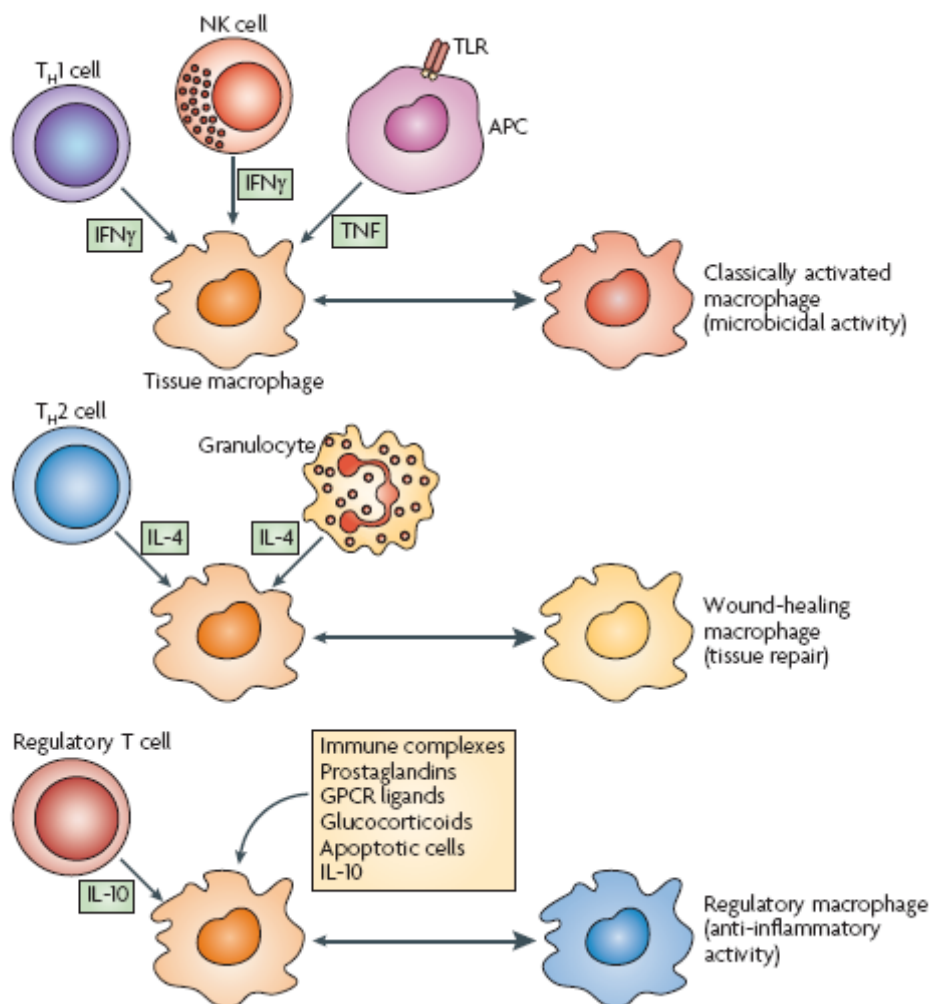


Figure 2 : Les différentes cytokines secrétées par les cellules immunes permettent la différenciation de 3 types de macrophages ayant des phénotypes et des propriétés différentes. D'après Mosser et Edwards, Nature Immunology Reviews, 2008 ³⁶.

➤ **Les macrophages M1**

Les macrophages M1 ou « **classically activated macrophages** » ou macrophages « pro-inflammatoires » sont activés par le TNF- α et l'IFN- γ (Interféron) ³⁸. L'IFN- γ peut être sécrété par les cellules NK, cellules de l'immunité innée qui vont amorcer l'activation du macrophage pour qu'il sécrète des cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires, ou bien par des lymphocytes CD4 Th1, cellules de l'immunité adaptative, antigène-spécifiques. A son tour, de façon autocrine, le macrophage peut sécréter de l'IFN- β qui va remplacer l'IFN- γ ⁴¹. Le TNF- α est quant à lui sécrété par une cellule présentatrice d'antigène ou de façon autocrine par le macrophage lui-même lorsqu'il est activé par son récepteur TLR. Lorsque le macrophage M1 est activé, il va sécréter des cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires nécessaires à la défense de l'hôte agressé : l'IL-1, l'IL-6, IL-12 et l'IL-23. Ces cytokines vont entraîner, en autres, une réponse cellulaire de type Th17, avec sécrétion d'IL17, cytokine impliquée dans le recrutement sur le site inflammé d'autres cellules immunitaires qui vont contribuer au développement de l'inflammation ⁴².

➤ **Les macrophages cicatriciels**

Les macrophages cicatriciels ou « **alternatively activated macrophages** » vont se développer principalement en réponse à l'IL-4 mais aussi à l'IL-13 ⁴³. L'IL-4 est le premier signal émis par les basophiles et les mastocytes (d'autres granulocytes peuvent aussi en sécréter mais en moindre quantité) lorsqu'il y a une dégradation tissulaire. Les cellules CD4 orientées Th2 sont aussi des pourvoyeurs d'IL-4 ainsi que d'IL-13. Les macrophages cicatriciels activés vont rapidement sécréter eux-mêmes de l'IL-4. Le rôle de l'IL-4 est de convertir les macrophages résidents en macrophages « réparateurs tissulaires ». Ces derniers vont développer une forte activité arginase, qui va convertir l'arginine en ornithine, qui est un

précurseur essentiel des polyamines et du collagène pour la matrice extracellulaire. Ils vont également sécréter des facteurs tels qu'Ym1 et Ym2, protéases de la famille des « chitinases-like », qui auraient un rôle dans la réorganisation et la réparation de la matrice extra-cellulaire⁴⁴. Ils peuvent aussi sécréter des facteurs de croissance tissulaire comme l'IGF-1 (insulin growth factor)⁴⁵.

➤ **Les macrophages anti-inflammatoires**

Les macrophages anti-inflammatoires (« regulatory macrophages ») ont besoin de deux ligands à la fois pour être activés. Parmi ces ligands, les plus importants sont les glucocorticoïdes (secrétés en cas de stress par les glandes surrénales), l'IL-10, la phagocytose de corps apoptotiques (qui va entraîner la sécrétion de TGF- β par le macrophage)⁴⁶, les complexes immuns, ou les prostaglandines. Ainsi activés, les macrophages anti-inflammatoires vont sécréter de l'IL-10 et inhiber la sécrétion d'IL-12, qui sont les deux signatures caractéristiques de ces cellules⁴⁷. Ces macrophages sont impliqués dans la résolution de l'inflammation. Par contre, ils ne contribuent pas à la production de matrice extracellulaire.

Les macrophages sont caractérisés par une très grande plasticité, et certains peuvent modifier leur phénotype lors des changements d'environnement. Il existe donc des macrophages « hybrides » entre les principales populations décrites ci-dessus.

La balance entre ces différentes populations doit être finement régulée au sein du tissu agressé car un excès ou un défaut d'une ou plusieurs populations de macrophages peut être

nocif pour l'hôte. En effet, un excès de développement de macrophages M1 peut entraîner une chronicisation de l'inflammation (comme dans l'obésité), des dégâts tissulaires, des maladies auto-immunes (comme dans la polyarthrite rhumatoïde). D'autre part, un excès de développement de macrophages cicatriciels peut entraîner une fibrose tissulaire (comme dans l'obésité également) ou une réponse allergique. En outre, un excès de développement de macrophages anti-inflammatoires peut être la cause d'un défaut de défense de l'hôte ou d'une néoplasie.

b) Les cellules dendritiques dérivées des monocytes

Les premiers travaux démontrant *in vivo* que les monocytes pouvaient se différencier en cellules dendritiques sont ceux du groupe de R. Steinman en 1999⁴⁸. Depuis une dizaine d'années, de multiples travaux ont confirmés que les monocytes étaient les précurseurs de certaines cellules dendritiques en conditions homéostatiques mais aussi au cours de l'inflammation.

(1) Cellules dendritiques dérivées des monocytes en conditions homéostatiques

En l'absence d'inflammation, les monocytes sont les précurseurs de certaines DC comme les DC respiratoires, les DC de la *lamina propria* intestinale, ou du tractus génital ou encore des cellules de Langherans dans certaines conditions,²⁶. En effet, les travaux du Dr. Varol et de ses collaborateurs ont permis de révéler que la sous-population de monocytes Gr1^{high} peut servir de précurseur à des DC de la *lamina propria* intestinale, après déplétion, en l'absence

d'inflammation ⁴⁹. Ces cellules ont été classées en « phagocytes mononucléés » car elles présentent un phénotype de cellule dendritique mais expriment en surface des marqueurs monocytaires tels que CD11b et CX3CR1 ⁵⁰. Au niveau du tissu pulmonaire, plusieurs travaux ont montré que chaque sous-population monocyttaire se différencie en sous population spécifiques de cellules dendritiques : les Gr1^{high} sont les précurseurs des cellules dendritiques pulmonaires CD103⁺ alors que les Gr1^{low} se différencient en cellules dendritiques CD11b⁺ ⁵¹. D'autres travaux ont révélé que les monocytes Gr1^{low} sont les précurseurs des macrophages alvéolaires ⁵².

(2) Cellules dendritiques dérivées des monocytes en conditions inflammatoires

Dans de nombreux modèles d'inflammation, les monocytes sont les précurseurs de DC pro-inflammatoires spécifiques. Dans de nombreux modèles expérimentaux, ce sont les monocytes Gr1^{high} qui sont à l'origine des DC pro-inflammatoires dérivées des monocytes, ²⁶. Ces DC sont très efficaces pour la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T. Récemment un type particulier de DC dérivant des monocytes Gr1^{high} a aussi été décrit: les Tip-DC (TNF- α i-Nos producing DC) ⁵³. Ces cellules sont très efficaces dans l'immunité innée anti-pathogène ⁶. Cependant, la question de savoir si ces cellules sont des cellules dendritiques à forte activité antimicrobienne ou bien des macrophages M1 pro-inflammatoires fait l'objet d'intenses débats ⁵⁴.

Avant de se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques au sein des tissus, les monocytes doivent être mobilisés de leur lieu de fabrication : la moelle osseuse, jusqu'au tissu cible. Ce trafic monocyttaire est très complexe et met en jeu, entre autres, des chimiokines et leurs récepteurs pour mobiliser les monocytes où il y en a besoin.

C. Trafic monocytaire : de la moelle osseuse aux tissus cibles

1. Récepteurs aux chimiokines et monocytes

Les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans le trafic des monocytes en condition normale et en cas d'inflammation. Certaines chimiokines jouent aussi un rôle dans la survie cellulaire, notamment la fractalkine, le ligand de CX3CR1. Les récepteurs aux chimiokines les plus importants dans le trafic monocytaire sont CX3CR1, CCR2 et CCR5. Ces récepteurs aux chimiokines peuvent aussi être présents sur d'autres cellules hématopoïétiques et jouer un rôle dans leur recrutement sur les sites agressés. Il est très probable que le niveau d'expression de CX3CR1 et de CCR2 (à un moindre degré CCR5) sur les monocytes Gr1^{high} et Gr1^{low} conditionne leur recrutement sur différents sites et dans différentes conditions inflammatoires.

a) CX3CR1

J'ai utilisé pour mes travaux de thèse un modèle murin déficient pour le récepteur aux chimiokines CX3CR1. Je vais donc particulièrement détailler le chapitre dédié à ce récepteur.

(1) Le récepteur CX3CR1

Le récepteur CX3CR1 a été décrit pour la première fois par une équipe japonaise en 1997⁵⁵. Comme tous les récepteurs aux chimiokines, il possède sept domaines transmembranaires et est couplé aux protéines G. Il est exprimé par tous les monocytes, les cellules NK, certains lymphocytes T, certains sous-types de cellules dendritiques, les cellules microgliales et par les neurones embryonnaires humains^{55 56 57 58 59 52}. Sa particularité est qu'il ne possède qu'un ligand unique (connu à ce jour) qui est la fractalkine ou CX3CL1 ou neurotactine (décrite pour la première fois par le Dr. Bazan et ses collaborateurs⁶⁰).

(2) Son ligand CX3CL1 ou fractalkine

La fractalkine, qui est donc l'unique membre de la quatrième classe des chimiokines (CX3C), est originale car elle existe sous deux formes : une liée à la membrane et une soluble. Ces deux formes possèdent des activités distinctes (figure 3). La forme soluble agit comme les autres chimiokines, c'est-à-dire qu'elle possède une activité chimioattractive pour les monocytes et les lymphocytes T en formant un gradient de concentration. Par contre, la forme ancrée à la membrane permet la capture initiale et l'adhésion ferme de ces mêmes cellules lors du processus d'extravasation (figure 3)⁶¹. La forme ancrée à la membrane peut être clivée par des métalloprotéases^{62 63} et libérer la forme soluble. La fractalkine est exprimée par les cellules endothéliales activées, les neurones, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules dendritiques et les macrophages^{64 65 66 67 68}.

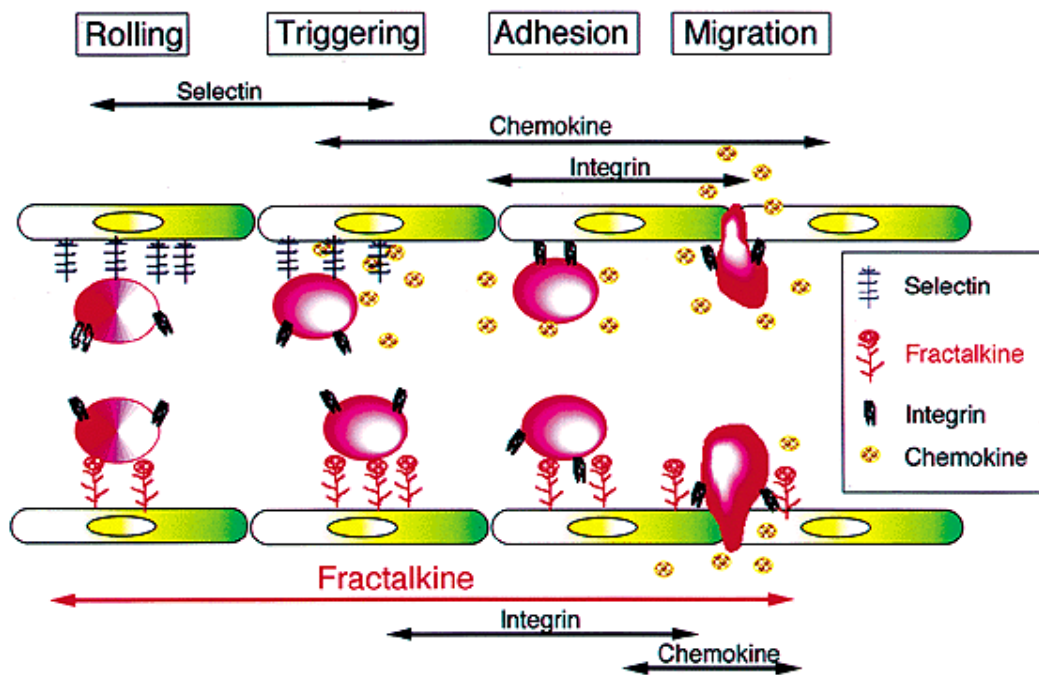


Figure 3 : Migration et recrutement des monocytes à travers l'endothélium activé. La fractalkine est impliquée à chaque phase grâce à sa forme soluble qui fait un gradient de chemokine et à sa forme ancrée qui va permettre l'adhésion monocytaire. D'après Umehara et al, Drug News and Perspective 2001)

(3) Rôles versatiles de CX3CR1

CX3CR1 joue de multiples rôles dans l'homéostasie tissulaire, dans les infections à différents pathogènes, dans les inflammations stériles, dans les réponses anti-tumorales. Les données de la littérature concernant le rôle de CX3CR1 sur les monocytes et les phagocytes mononucléés sont les suivantes :

- Récemment, l'équipe du Dr. Jung a démontré que l'axe CX3CR1-CX3CL1 était impliqué dans la survie des monocytes Gr1^{low} *in vivo* et que ce signal de survie dépendait de la voie anti-apoptotique Bcl2⁶⁹. Les souris déficientes pour CX3CR1 présentent une baisse importante des monocytes Gr1^{low} en conditions normales et en fond Apoe^{-/-}^{69 70}.
- CX3CR1 est impliqué dans le mouvement de « crawling » effectué par les monocytes Gr1^{low} le long des vaisseaux, suspectés de faire de la surveillance¹⁹.
- CX3CR1 est impliqué dans le trafic des monocytes Gr1^{low} pour repeupler les tissus après déplétion, en l'absence d'inflammation²³.
- CX3CR1 est impliqué dans le recrutement des Gr1^{low} dans un modèle d'infarctus du myocarde (IDM), qui vont se différencier en macrophages M2 pour faire de la réparation tissulaire⁷¹. CX3CR1 est aussi impliqué dans le recrutement de monocytes/macrophages ayant des propriétés de cicatrisation dans un modèle de lésion cutanée (de type coupure)⁷².
- CX3CR1 est impliqué dans le recrutement de monocytes pro-inflammatoires Gr1^{high} dans de nombreux modèles d'inflammations stériles, comme l'athérosclérose^{73 74}, l'ischémie cérébrale⁷⁵, ou l'ischémie rénale⁷⁶.
- CX3CR1 est impliqué dans la migration et la fonction de cellules dendritiques de la *lamina propria* intestinale qui ont la propriété d'émettre des dendrites dans la lumière intestinale pour « scanner » les antigènes bactériens^{59 77}.

Par ailleurs, CX3CR1 peut être exprimé sur les lymphocytes T CD4, CD8 et les cellules NK

Il est intéressant de noter que CX3CR1 a des fonctions versatiles : dans certaines pathologies la fonction de CX3CR1 semble protectrice ⁷⁸, alors que dans d'autres elle semble délétère ^{74 73}. Cependant, CX3CR1 joue un rôle majeur dans la survie et le recrutement des monocytes.

b) CCR2

CCR2 est le récepteur de CCL2 (ou MCP-1) et de CCL7 (ou MCP-3). CCR2 est fortement exprimé sur les monocytes Gr1^{high} mais n'est pas exprimé sur les Gr1^{low}. Dans de nombreuses inflammations, chez l'homme comme chez la souris, CCL2 est retrouvé fortement augmenté dans la circulation et dans le tissu inflammé. CCR2 est nécessaire à l'égression médullaire des monocytes Gr1^{high} ⁶ (cf chapitre sur l'origine des monocytes). Les souris déficientes pour CCR2 présentent donc une importante diminution des monocytes Gr1^{high} dans la circulation. La délétion concomitante de CCL2 et CCL7 diminue le recrutement monocyttaire en cas d'infection à *Listeria Monocytogene* de 50% environ ⁷⁹. De plus, CCR2 est impliqué dans le recrutement des monocytes Gr1^{high} sur les sites agressés dans de nombreux modèles expérimentaux ⁶. Cependant, de récentes études ont mis en évidence que le recrutement des Gr1^{high} par la voie CCR2-CCL2 (ou CCL7) dépendait du tissu agressé et de la nature de l'agression. En effet, le recrutement des Gr1^{high} dans le modèle d'IDM ⁷¹ ou d'infection péritonéale à *Toxoplasma Gondii* est très dépendant de CCR2, car fortement diminué voir aboli dans les modèles murins déficients pour CCR2. Par contre, la migration des Gr1^{high} dans

la rate lors d'une infection à *Listeria Monocytogenes* est dépendante de CX3CR1⁸⁰ et non de CCR2⁸¹.

CCR2 est donc impliqué dans l'égression médullaire des monocytes Gr1^{high} et dans leur recrutement dans les tissus agressés. Cependant, l'utilisation de CCR2 pour le trafic des Gr1^{high} semble dépendre de la nature de l'inflammation et du tissu agressé.

c) CCR5

CCR5 est un autre récepteur aux chimiokines exprimé par les monocytes. Il peut se lier à plusieurs ligands dont MIP-1 α et CCL5 (ou Rantes)⁸². Les modèles murins déficients pour CCR5 ont permis de montrer que ce récepteur était impliqué dans le recrutement monocytaire lors de l'athérosclérose^{83 70}, de la sclérose multiple et de la polyarthrite rhumatoïde⁸². L'expression de CCR5 est augmentée sur les monocytes Gr1^{low} dans le modèle murin d'athérosclérose Apoe^{-/-} et son blocage par des anticorps inhibe le recrutement des Gr1^{low} au niveau de la plaque d'athérome⁷⁰. Par contre la monocytose n'est pas affectée chez les souris déficientes pour CCR5.

d) Autres récepteurs aux chimiokines

CCR7 et CCR8 peuvent être exprimés par les monocytes Gr1^{low}. Les monocytes Gr1^{low} peuvent se différencier en cellules dendritiques dans la peau et utiliser CCR7 et CCR8 pour migrer de la peau aux ganglions lymphatiques⁸⁴.

2. Provenance des monocytes

Les monocytes circulants proviennent de progéniteurs médullaires communs aux monocytes, aux macrophages et aux cellules dendritiques: les MDPs (Macrophages Dendritic cells Progenitor) ^{5 7}. Les progéniteurs des monocytes expriment le récepteur au M-CSF (aussi appelé CD115) en surface et vont proliférer et se différencier en réponse au macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). Quand aux cellules dendritiques, elles vont se développer en réponse au FLT3L (FMS related tyrosine kinase 3 ligand).

a) Origine des monocytes Gr1^{high}

En l'absence d'inflammation, les monocytes Gr1^{high} qui ont une demi-vie courte, retourneraient dans la moelle hématopoïétique où ils perdraient l'expression du Gr1 et deviennent des Gr1^{low} ^{25 85}. En conditions inflammatoires, que ce soient au cours d'infection ou d'un régime riche en graisses, le nombre de monocytes circulant augmente fortement, essentiellement par une augmentation de l'égression des niches médullaires. Il a récemment été montré que le récepteur aux chimiokines CCR2 ses ligands CCL2 et CCL7 médient en partie (mais pas complètement) la sortie médullaire des Gr1^{high} ^{81 86}. Les souris déficientes pour CCR2 ont donc une forte diminution de monocytes Gr1^{high} circulants ⁸¹. Cependant le taux de Gr1^{low} circulants dans ce modèle CCR2^{-/-} n'est pas modifié.

b) Origine des monocytes Gr1^{low}

Actuellement, on ne sait pas comment la sous-population de Gr1^{low} sort de la moelle. Il est possible que seuls les Gr1^{high} sortent de la moelle osseuse et se qu'ils se différencient ensuite en périphérie en Gr1^{low}. Pour soutenir cette hypothèse, des études utilisant des marquages des GR1^{high} (par des liposomes fluorescents ou par des billes de latex) ont montré que les GR1^{high}

pouvaient perdre l'expression du Gr1 et devenir des Gr1^{low}, aussi bien en conditions homéostatiques³⁰ qu'après une déplétion cellulaire préalable²⁵. Finalement, on ne sait pas si les MDPs se différencient directement en monocyte Gr1^{low} ou si les Gr1^{high} sont une étape intermédiaire obligatoire pour générer des Gr1^{low}, ou si les deux phénomènes co-existent⁸⁵.

c) Réservoir splénique

Récemment, dans un modèle d'infarctus du myocarde, le Dr.Swirski et ses collaborateurs ont démontré qu'il existait aussi un réservoir splénique de monocytes, en plus du réservoir médullaire⁸⁷. Ce réservoir contiendrait plus d'un million de monocytes, avec le même ratio de sous-populations monocytaires que dans le sang. Ces monocytes spléniques sont indifférenciables sur le plan morphologique et transcriptionnel des monocytes du sang. Les auteurs émettent l'hypothèse que ce réservoir splénique permettrait de mobiliser dans la circulation dans un temps très court un fort nombre de monocytes nécessaires à la réaction inflammatoire aigue sur le site myocardique (figure 4).

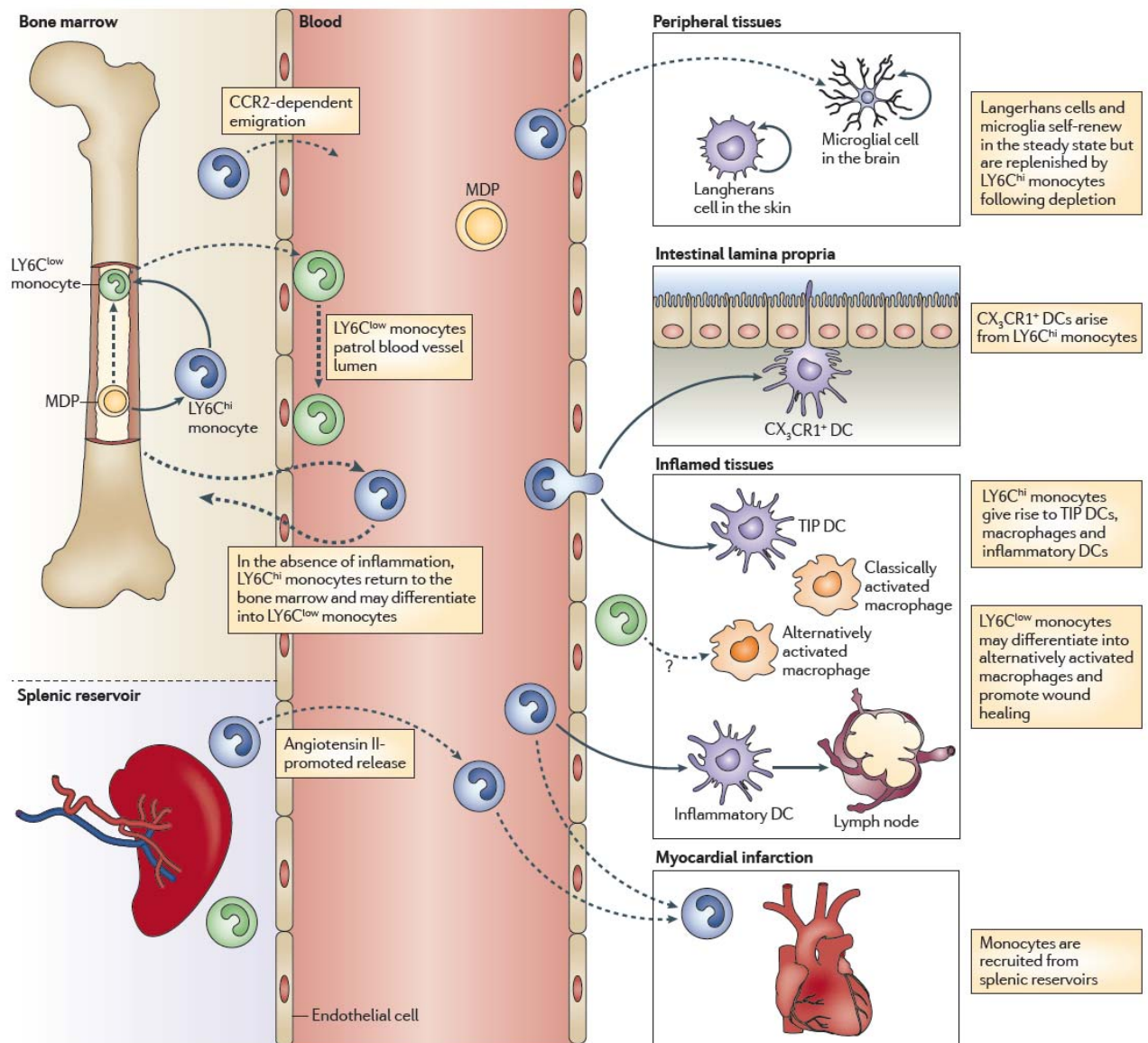


Figure 4 : Trafic des différentes sous-populations de monocytes $Ly6c^{high}$ ($Gr1^{high}$) et $Ly6c^{low}$ ($Gr1^{low}$). D'après Shi and Pamer Nature Rev Imm 2011 ¹².

3. Trafic et fonctions des monocytes en conditions homéostatiques

Avant d'aborder le chapitre sur le trafic des monocytes de la circulation vers les tissus, il est important de noter que les techniques utilisées pour étudier ce processus sont toutes

imparfaites et ne reflètent pas exactement les conditions réelles de trafic des monocytes *in vivo*.

a) Méthodes expérimentales pour étudier le trafic monocytaire

Il existe deux grands types d'approches. La première approche consiste à supprimer l'expression de gènes codant pour des récepteurs aux chimiokines (ou pour des chimiokines) impliqués dans le recrutement et/ou la survie de monocytes, ou des molécules d'adhésion impliquées dans l'extravasation tissulaire des monocytes. Cette approche permet de comprendre le rôle exact joué par les récepteurs aux chimiokines et les molécules d'adhésion dans le trafic des monocytes dans des modèles d'inflammation précis ou en condition homéostatiques. La deuxième approche consiste à marquer les monocytes et à suivre leur circulation dans les différents tissus étudiés, ou bien de façon dynamique *in vivo* (notamment par les équipes du Dr. Geissmann et du Dr. Swirski) ou bien *ex-vivo*. Les marquages des monocytes sont difficiles techniquement, apportent des informations importantes mais présentent des biais. La méthode la plus utilisée est celle du gène rapporteur : le gène codant pour la GFP (green fluorescence protein) est inséré dans le deuxième exon du gène codant pour CX3CR1 (exon codant pour l'extrémité N-terminale du récepteur et nécessaire à l'interaction avec son ligand la fractalkine), ce qui permet de marquer tous les monocytes puisque CX3CR1 est exprimé par tous les monocytes⁵⁸. Ce modèle est souvent utilisé dans des fonds génétiques déficients pour les autres cellules hématopoïétiques exprimant CX3CR1 (les lymphocytes activés et les NK) ce qui permet de ne suivre que les monocytes^{23 19}. Par contre, le suivi est limité car l'expression de la GFP peut être augmentée ou diminuée après extravasation selon la différenciation cellulaire^{58 59}. Cependant, cette technique de gène rapporteur permet de suivre le trafic des monocytes *in vivo*¹⁹. Par ailleurs, il existe la méthode de transfert adoptif : les monocytes sont sortis d'un modèle murin et transplantés dans un

autre modèle. Mais seul un petit nombre des monocytes transférés est retrouvé dans la circulation et cette petite fraction ne reflète pas obligatoirement le devenir de l'entière population monocyttaire²³. De plus, la manipulation des monocytes *ex vivo* doit sûrement affecter la différenciation, la maturation et l'activation cellulaire. L'équipe du Dr. Randolph a récemment développé des techniques de marquage endogène utilisant des particules inertes qui marquent spécifiquement les sous-populations de monocytes Gr1^{high} et Gr1^{low}^{30 88}. Ces méthodes sont plus sensibles que le transfert adoptif. Pour marquer spécifiquement les Gr1^{high}, il faut d'abord dépléter tous les monocytes avec des liposomes contenant du clodronate. Cette déplétion transitoire est suivie d'une injection 16 à 18 heures plus tard de billes fluorescentes qui vont sélectivement marquer les Gr1^{high} qui sont les premiers à réapparaître dans la circulation³⁰. Par contre, le marquage spécifique des monocytes Gr1^{low} se fait en l'absence de déplétion cellulaire préalable et avec des billes de latex. Ces deux techniques de marquage relativement spécifiques des sous-populations ont été utilisées pour suivre le trafic des monocytes au cours de l'athérosclérose⁸³ (cf chapitre plus bas).

b) Trafic des monocytes en l'absence d'inflammation

En conditions homéostatiques, de nombreux tissus possèdent leur propre réservoir de macrophages et de cellules dendritiques qui prolifèrent localement : les cellules de Kuppfer dans le foie⁸⁹, les cellules de la microglie (macrophages du système nerveux central)⁹⁰, les macrophages du poumon⁵², certains macrophages spléniques⁹¹, les cellules de Langherans⁹². Cependant, les monocytes circulants de type Gr1^{low} peuvent aussi repeupler les tissus en condition normale et servir de précurseurs aux macrophages et à certains types de cellules dendritiques²³. Un degré de complexité a récemment été ajouté avec des travaux qui ont révélés que certains de ces macrophages étaient présents très tôt au cours de la vie embryonnaire et provenaient du sac embryonnaire et non de la moelle hématopoïétique⁹³. Ces

travaux viennent souligner le fait que les études de repeuplement tissulaire par les monocytes après déplétion cellulaire ne reflètent pas obligatoirement les conditions *in vivo*.

Pour conclure, en l'absence d'inflammation, les macrophages et certaines cellules dendritiques proviennent d'une prolifération locale mais sont aussi renouvelés par les monocytes circulants. De plus, il paraît clair que chaque sous-type monocyttaire va se différencier dans les tissus en macrophage ou cellule dendritique ayant des phénotypes et des fonctionnalités spécifiques. Il faut bien garder à l'esprit que les études de repeuplement tissulaire après déplétion expérimentale ne reflètent pas obligatoirement les conditions homéostatiques *in vivo* ¹².

4. Trafic et fonctions des monocytes en conditions inflammatoires

a) Inflammations septiques

En cas d'infection, les monocytes vont rapidement sécréter des cytokines pro-inflammatoires et des agents antibactériens, et ils vont augmenter leur expression de CCR2 pour aller sur le site agressé, en réponse à CCL2 ⁶. Les monocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire antibactérienne, antivirale, antifongique et antiparasitaire (figure 5). Il a récemment été montré que la monocytose consécutive de l'égression médullaire de monocytes au cours de l'infection se faisait grâce à la production de CCL2 par les cellules stromales médullaires en réponse aux ligands circulants de TLR-4 ⁹⁴. En plus de leur rôle antimicrobien direct sur le site infecté, il a été montré que, lors d'infections cutanées ou pulmonaires, les monocytes avaient aussi la capacité de migrer vers les ganglions

lymphatiques, de faire de la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4 et CD8, et d'initier ainsi une réponse immunitaire adaptative^{48 95 96}.

Dans la grande majorité des infections, ce sont les monocytes Gr1^{high} qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire. Cependant, le Dr. Auffray et ses collaborateurs ont démontré par une technique de microscopie intravivante que les Gr1^{low} étaient les premiers monocytes recrutés lors d'une infection péritonéale à *Listeria Monocytogenes*, et qu'ils sécrétaient du TNF- α et des chimiokines pour attirer les monocytes Gr1^{high} sur le site¹⁹. Par la suite, les Gr1^{high} sont recrutés pour faire une réponse inflammatoire. Dans un troisième temps ce sont les Gr1^{low} qui sont à nouveau recrutés mais pour faire de la réparation tissulaire (figure 6). Ces données ont été obtenues par des études d'expression de gènes sur les cellules péritonéales triées à chaque phase de l'infection.

Cependant, des travaux récents ont mis en évidence, pour la première fois, une absence de recrutement monocytaire au sein du tissu agressé mais une prolifération de macrophages locaux⁹⁷. En effet, lors d'une infection pleurale à un nématode entraînant une forte réponse immunitaire de type Th2, l'expansion de macrophages locaux est due à une prolifération locale et non à un recrutement de monocytes circulants.

Pour conclure, les monocytes sont impliqués dans de nombreuses réponses inflammatoires d'origine infectieuse. Les monocytes Gr1^{high} semblent largement prédominants dans les réponses anti-infectieuses. Cependant, dans la stratégie expérimentale d'infection à *Listeria Monocytogenes*, il a été démontré *in vivo* que chaque sous-population de Gr1^{high} et de Gr1^{low} pouvait se différencier respectivement en macrophages M1 (et Tip-DC) et macrophage M2¹⁹. Il faut noter que la plupart des travaux n'ont pas systématiquement étudié la contribution relative de chaque sous-population Gr1^{high} et Gr1^{low}.

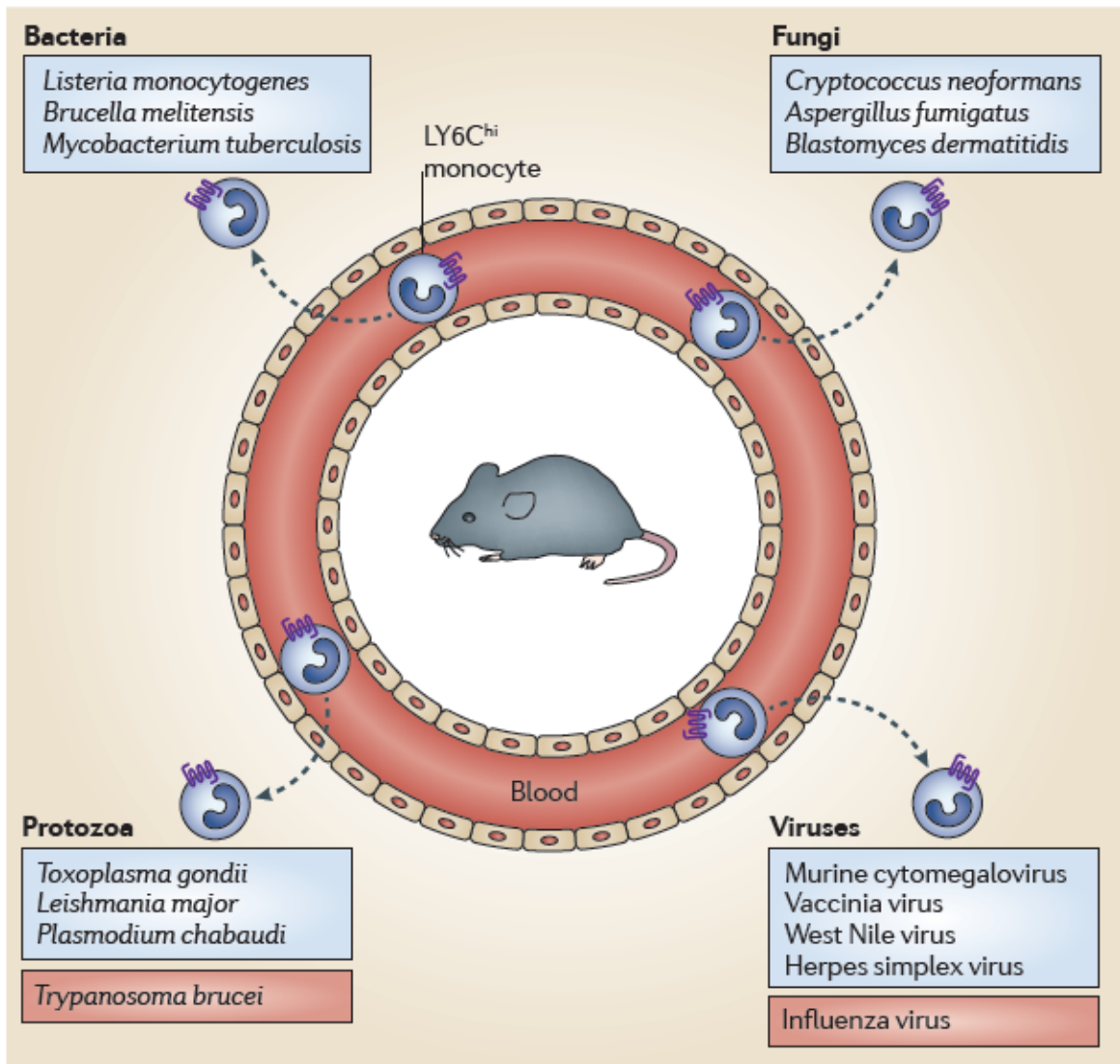


Figure 5 : Le recrutement des monocytes est crucial pour la défense de l'hôte contre de multiples pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites). D'après Shi and Pamer *Nature Rev Imm* 2011¹².

b) Inflammations aseptiques

(1) Inflammations aseptiques aiguës

Les deux modèles les plus utilisés pour l'étude du trafic des monocytes au cours d'inflammations aseptiques aiguës sont celui de l'infarctus du myocarde et celui de la lésion du muscle squelettique. Dans le modèle de l'IDM, le Dr. Narhendorf et ses collaborateurs⁷¹ ont montré grâce à l'utilisation de transfert adoptif, qu'il y avait un recrutement spécifique, les 3 premiers jours post-infarctus, de monocytes pro-inflammatoires Gr1^{high}. Ces monocytes recrutés en phase I ont une forte activité de phagocytose, de protéolyse et de sécrétions de cytokines pro-inflammatoires. Par contre, de façon très intéressante, ils ont observé que cette phase inflammatoire était suivie séquentiellement par une deuxième phase de recrutement spécifique de monocytes anti-inflammatoires Gr1^{low} (phase II) (figure 6). Ces monocytes Gr1^{low} recrutés servent à diminuer l'inflammation et à faire de la cicatrisation tissulaire myocardique en stimulant l'angiogénèse (via la sécrétion de Vascular Endothelial Growth Factor), l'accumulation de myofibroblastes (via la sécrétion de Fibroblast Growth Factor) et le dépôt de collagène. De plus, ils démontrent grâce à des modèles murins déficients pour CCR2 ou CX3CR1 que le recrutement des Gr1^{high} et des Gr1^{low} est dépendant respectivement de CCR2 et de CX3CR1. Ces résultats sont très intéressants car ils démontrent qu'il existe une fonctionnalité spécifique et séquentielle des deux sous-populations monocytaires murines. Les mêmes auteurs ont répétés la même expérience d'IDM mais dans le fond génétique Apoe^{-/-} qui entraîne une forte hypercholestérolémie et qui est utilisé pour l'étude de l'athérosclérose⁹⁸. Or dans ce fond génétique, l'hypercholestérolémie³³ et la déficience en Apoe⁹⁹ entraînent une monocytose portant spécifiquement sur les Gr1^{high}. Le Dr. Narhendorf et ses collaborateurs observent que cette monocytose à Gr1^{high} est responsable d'un retard à la mise en place de la phase II de cicatrisation, ce qui va entraîner une dilatation ventriculaire et une insuffisance cardiaque⁹⁸. Ils démontrent aussi qu'une monocytose isolée à Gr1^{high} (induite par une injection de LPS, et non associée à l'hypercholestérolémie et/ou au fond génétique Apoe^{-/-}) est suffisante pour induire une exacerbation et un prolongement de la phase I, un retard dans la

mise en place de la phase II et conduire à l'insuffisance cardiaque. Les mécanismes exacts qui relient une expansion plasmotique de monocytes Gr1^{high} à un retard et une diminution de cicatrisation du ventricule gauche cardiaque ne sont pas connus. Les auteurs proposent comme hypothèse que l'expansion plasmotique de Gr1^{high} augmente leur recrutement sur le site agressé, et que leur présence en grand nombre et de façon prolongée empêche la transition vers un microenvironnement local propice à la cicatrisation tissulaire. Dans le modèle de lésion du muscle squelettique, le Dr. Arnold et ses collaborateurs observent de la même façon que ce sont spécifiquement et séquentiellement les monocytes Gr1^{high} qui sont recrutés les premières heures après la nécrose musculaire ¹⁰⁰. Dans le muscle agressé, ces Gr1^{high} deviennent des macrophages pro-inflammatoires et ne se divisent pas. Là encore, 24 heures après la lésion, des macrophages ayant des propriétés anti-inflammatoires, de phagocytose des débris nécrotiques et de régénération musculaire et se divisant, sont retrouvés dans le muscle agressé. Par contre, contrairement aux travaux du Dr. Narhendorf, les auteurs concluent que ces macrophages anti-inflammatoires et « réparateurs » tissulaires proviennent d'une différenciation intramusculaire des macrophages Gr1^{high} pro-inflammatoires et ne sont pas recrutés dans la circulation (les auteurs ne retrouvent pas les billes fluorescentes qui marquaient spécifiquement les Gr1^{low}, dans le muscle lésé).

Pour conclure, les travaux du groupe de Narhendorf démontrent qu'après un IDM, les deux sous-populations monocytaires sont recrutées de façon spécifique et séquentielle dans le tissu agressé : phase I inflammatoire : recrutement de Gr1^{high} proinflammatoires dépendant de CCR2 suivie d'une phase II cicatricielle : recrutement de Gr1^{low} anti-inflammatoires et « réparateurs tissulaires » dépendant de CX3CR1 ⁷¹. Par contre, les travaux sur le muscle squelettique sont plutôt en faveur d'un recrutement sélectif des Gr1^{high}, puis d'un switch en macrophages M2 pour faire de la réparation tissulaire ¹⁰⁰.

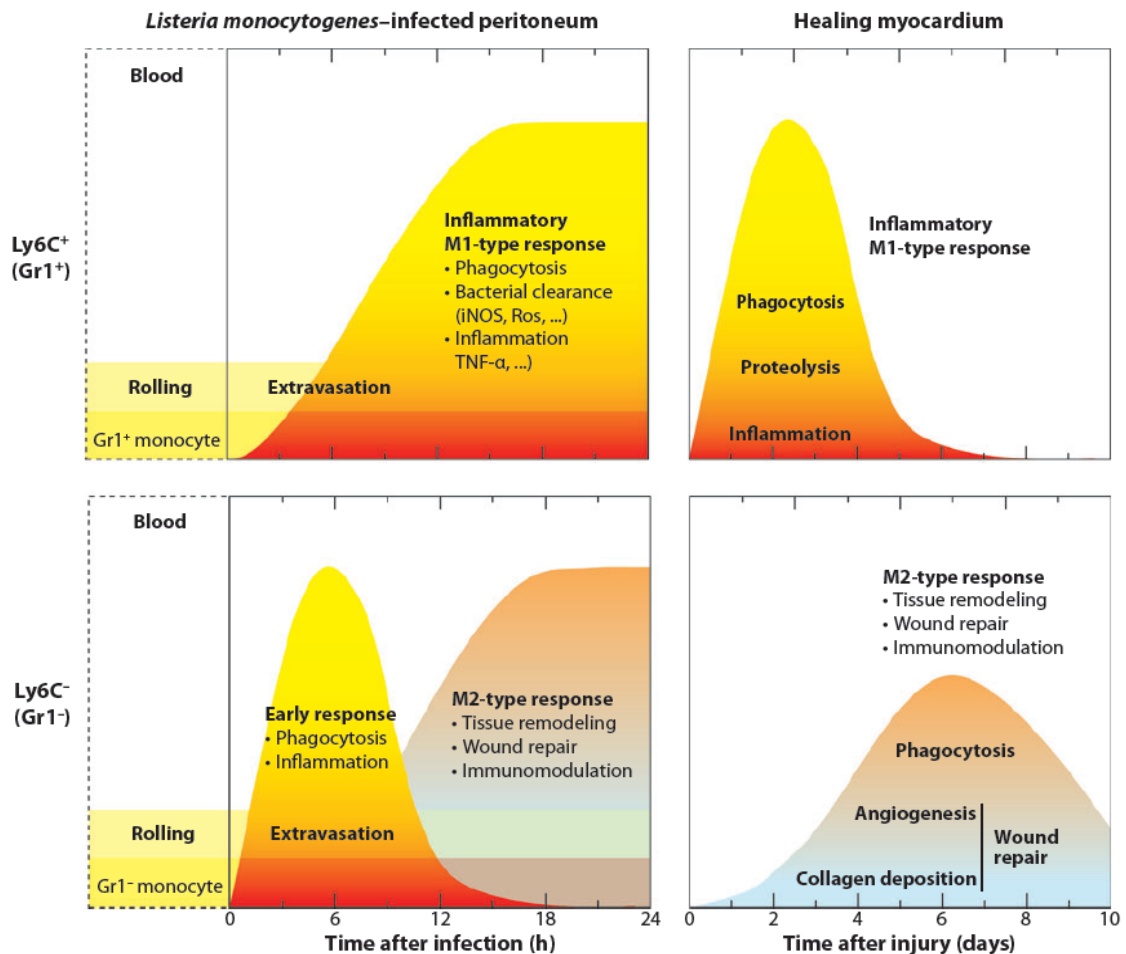


Figure 6 : Différenciation et fonctions effectrices des sous-populations monocytaires Ly6c^{high} (Gr1^{high}) (en haut) et Ly6c^{low} (Gr1^{low}) (en bas) au cours de l'infarctus du myocarde (panel droit) et de l'infection à *Listeria Monocytogenes* (panel gauche). D'après Auffray, Sieweke and Geissmann, *Nature review Immunology*, 2009⁷.

(2) Inflammations aseptiques chroniques

Le modèle d'inflammation aseptique chronique, dans lequel le rôle joué par les différents sous-groupes de monocytes qui a été le mieux étudié à ce jour est celui de l'athérosclérose. Les monocytes sont des médiateurs majeurs de l'athérosclérose^{101 102 103}. En réponse à un gradient de cytokines, les monocytes adhèrent fermement à l'endothélium activé, le traversent, se différencient en macrophages spumeux (chargés de lipides) puis vont participer à la formation et au développement des lésions. Les modèles murins d'athérosclérose

présentent une monocytose prédominant sur la sous-population des Gr1^{high} ³³. Dans certaines études d'athérosclérose, seuls les monocytes Gr1^{high} sont augmentés ^{33 83}, alors que dans d'autres études, les deux sous populations de monocytes Gr1^{high} et Gr1^{low} sont augmentées ⁷⁰. Jusqu'à très récemment, il était admis que c'était l'hypercholestérolémie qui était responsable de cette monocytose ³³. Or, les modèles murins utilisés pour étudier l'athérosclérose sont, dans la majorité des cas, des souris déficiente pour l'Apoe, glycoprotéine impliquée dans le transport et le métabolisme des lipides. Le Dr Murphy et ses collaborateurs viennent de démontrer que la déficience en Apoe était aussi responsable d'une monocytose ⁹⁹. Au total, l'hypercholestérolémie et la déficience en Apoe entraînent une monocytose dans les modèles murins d'athérosclérose.

Il a été montré que les monocytes Gr1^{high} adhèrent à l'endothélium activé, extravasent dans la paroi artérielle et deviennent des macrophages spumeux ³³. Par contre, on ne connaît pas à l'heure actuelle la participation exacte des Gr1^{low} dans la genèse des plaques d'athérome. Cependant, deux études ont récemment apporté des éléments de réponse. La première est celle du groupe du Dr. Randolph qui a mis au point le marquage sélectif des Gr1^{high} et des Gr1^{low} par des billes inertes (cf. plus haut) et qui a ensuite pu suivre leur devenir dans un modèle murin Apoe^{-/-} en régime hypercholestérolémique ⁸³. Les auteurs observent dans leur modèle, que les Gr1^{low} entrent aussi dans la paroi artérielle mais à un moindre degré et plus tardivement que les Gr1^{high}. Ils démontrent aussi que, de façon étonnante, le recrutement des Gr1^{low} (qui sont CX3CR1^{high}CCR2^{neg}) n'est pas dépendant de CX3CR1 mais de CCR5 et que le recrutement des Gr1^{high} (qui sont CCR2⁺CX3CR1^{low}) dépendait surtout de CCR2 et aussi de CX3CR1. La deuxième étude est celle du groupe du Dr. Mallat ⁷⁰. Les auteurs démontrent que la monocytose est un facteur important dans la formation des plaques d'athérome et que la taille des lésions artérielles corrèle fortement avec le taux de monocytes circulants, essentiellement les Gr1^{low} (figure7).

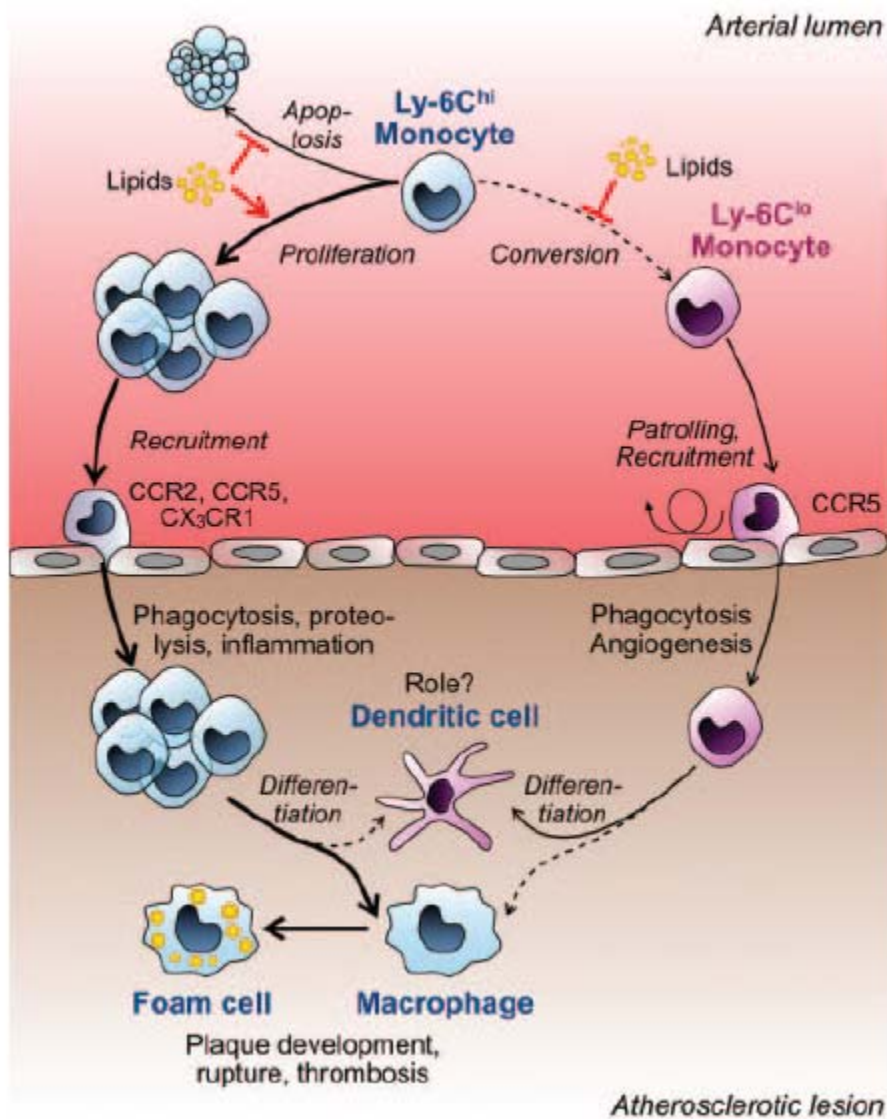


Figure 7 : Modèle du rôle des sous-populations monocytaires au cours de l'athérosclérose expérimentale chez la souris. D'après Swirski, Weissleder et Pittet, *ATVB* 2009¹⁰³.

Pour conclure, les monocytes Gr1^{low} entrent dans les plaques d'athérome, leur entrée est dépendante de CCR5 et non de CX3CR1, mais on ne sait pas si ils exercent un rôle spécifique, différent de celui des Gr1^{high}. On ne sait pas non plus si chaque sous-population monocyttaire se différencie spécifiquement en un type de macrophage ou de cellules dendritiques.

II. L'INFLAMMATION AU COURS DE L'OBESITE

A. Introduction sur l'obésité et l'insulinorésistance

En médecine, l'obésité se définit par un excès de masse grasse pouvant entraîner des inconvénients pour la santé. Pourtant l'obésité ne se résume pas à une notion quantitative de masse grasse : les dépôts ectopiques de graisses ont des conséquences délétères, indépendamment de l'obésité en elle-même, et les anomalies structurelles et fonctionnelles de la graisse sont responsables des nombreuses complications. C'est une maladie grave, non seulement à cause des nombreuses complications physiques associées, mais aussi à cause des souffrances psychologiques et sociales secondaires. C'est une maladie chronique, qui commence souvent dès l'enfance, et évolutive. C'est une maladie dans laquelle le système de contrôle des réserves énergétiques est dépassé (A. Basdevant. Traité de médecine et de chirurgie de l'obésité, Flammarion 2011). Au centre de l'obésité et de ses complications se situe un organe qui va être le siège de nombreux remaniements tout au long de l'histoire de la prise (et de la perte) de poids : le tissu adipeux. Le tissu adipeux obèse se caractérise par une hypertrophie (augmentation de la taille) et une hyperplasie (augmentation du nombre) des adipocytes. A côté de ces anomalies adipocytaires vont se constituer une inflammation et une fibrose. La pathologie du tissu adipeux, caractérisée entre autres par ses capacités de stockage dépassées et la sécrétion de cytokines et d'hormones pro-inflammatoires, va se répercuter sur d'autres organes et entraîner des dysfonctionnements systémiques comme l'insulinorésistance. L'insulinorésistance est définie par une diminution de l'action de l'insuline au niveau de ses tissus cibles. Essentiellement, l'insuline contrôle l'utilisation musculaire du glucose, freine la production hépatique de glucose et inhibe la lipolyse. L'insulinorésistance peut se compliquer d'un diabète de type 2 si les cellules β pancréatiques

sont déficientes et n'arrivent plus à fournir assez d'insuline pour maintenir une glycémie normale. Dans les modèles animaux d'obésité, il est clair que l'inflammation du tissu adipeux peut générer une insulino-résistance systémique, notamment par le biais du TNF- α et de l'IL-6¹⁰⁴. Cependant, le lien de causalité entre inflammation du tissu adipeux et insulino-résistance généralisée, même si il est suspecté, n'est pas démontré formellement chez l'homme.

B. Nature de l'inflammation au cours de l'obésité

L'inflammation de bas grade observée au cours de l'obésité se différencie de l'inflammation aiguë classique. Premièrement, sur le plan clinique, aucun symptôme de l'inflammation classique (fièvre, douleur, chaleur, rougeur) n'est observé au cours de l'obésité. La nature des stimuli est elle aussi différente puisqu'il ne s'agit pas d'agents bactériens, viraux ou parasitaires, ou encore auto-immuns mais de nutriments (bien que la participation d'une cause bactérienne issue de la flore intestinale soit aussi très probable). L'inflammation liée à l'obésité est déjà présente chez les enfants souffrant d'obésité¹⁰⁵ et peut donc exister tout au long de la vie. Enfin, la « métainflammation » liée à l'obésité est caractérisée par l'atteinte de multiples organes dont la liste actuelle n'est probablement pas définitive. Par exemple, la notion d'inflammation hypothalamique au cours de l'excès d'acides gras alimentaires est très récente¹⁰⁶ et vient ajouter un niveau de complexité quand aux mécanismes de l'obésité, notamment ceux liés à la prise alimentaire.

Depuis très longtemps on sait que certains médiateurs de l'inflammation sont élevés dans le sang des patients obèses et diabétiques de type 2¹⁰⁷. Cependant, c'est seulement depuis une dizaine d'années que les mécanismes de l'inflammation liée à l'obésité sont

disséqués à de multiples niveaux : à l'échelle tissulaire (cellules impliquées, rôle de la matrice extra-cellulaire, échanges inter-cellulaires...), à l'échelle cellulaire (nature des stimuli, récepteurs des stimuli, stress du réticulum endoplasmique, stress oxydatif etc...) et enfin à l'échelle moléculaire (voies de signalisation sous les récepteurs impliqués).

L'excès d'apports en glucose et en acide gras entraîne une l'inflammation en augmentant le stress oxydatif et la transcription de facteurs pro-inflammatoires (NF-κB, AP-1) ^{3 2}. Il a été montré chez l'homme que des infusions de triglycérides augmentaient l'inflammation (activation de la voie NF-κB dans les leucocytes) et le stress oxydatif ¹⁰⁸. De façon très intéressante, la nature des acides gras influence la réponse inflammatoire (Beliard, Lesnik. Abstract Atherosclerosis, N°16, 2010). Les acides gras de type oméga-3 ont un effet anti-inflammatoire et insulinosensibilisateur via le récepteur GPR120 ¹⁰⁹. Par ailleurs, des restrictions caloriques diminuent l'inflammation systémique ^{110 111}. A côté de ces stimuli inflammatoires nutritionnels, de nombreux travaux ont récemment mis en évidence que les endotoxines provenant de la flore microbienne intestinale participaient à la méta-inflammation chronique chez l'homme et dans des modèles animaux ^{112 113}. Le Dr. Cani et ses collaborateurs ont d'ailleurs mis en évidence que l'infusion de faibles doses d'endotoxines plasmatiques pouvait en soi être responsable d'une prise de poids ¹¹⁴. Ces travaux sont très intéressants car ils démontrent qu'une inflammation chronique induite par une endotoxémie peut générer un excès de poids. Les mécanismes sous-tendus ne sont pas encore bien compris mais il apparaît que le lien obésité-inflammation ne soit pas unidirectionnel.

Au total, l'inflammation au cours de l'obésité est chronique, de bas grade, touche de nombreux organes et les stimuli initiateurs sont mal connus. A côté des apports nutritionnels, il est très probable que la flore microbienne intestinale joue un rôle

important. D'autres stimuli ont aussi été incriminés dans l'inflammation du tissu adipeux (cf plus bas).

C. Les tissus inflammés au cours de l'obésité

De nombreux tissus sont touchés par l'inflammation au cours des régimes riches en graisse et en sucres, et la liste ne cesse de s'allonger (figure 8). Cependant, c'est le tissu adipeux qui a fait l'objet de la majorité des travaux de recherche depuis la publication en 2003 de deux articles princeps majeurs^{115 104}. Ces travaux démontrent, chez l'homme et chez la souris, que le tissu adipeux est le siège d'une réaction inflammatoire avec une expansion de macrophages pro-inflammatoires et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires pouvant générer une insulino-résistance.

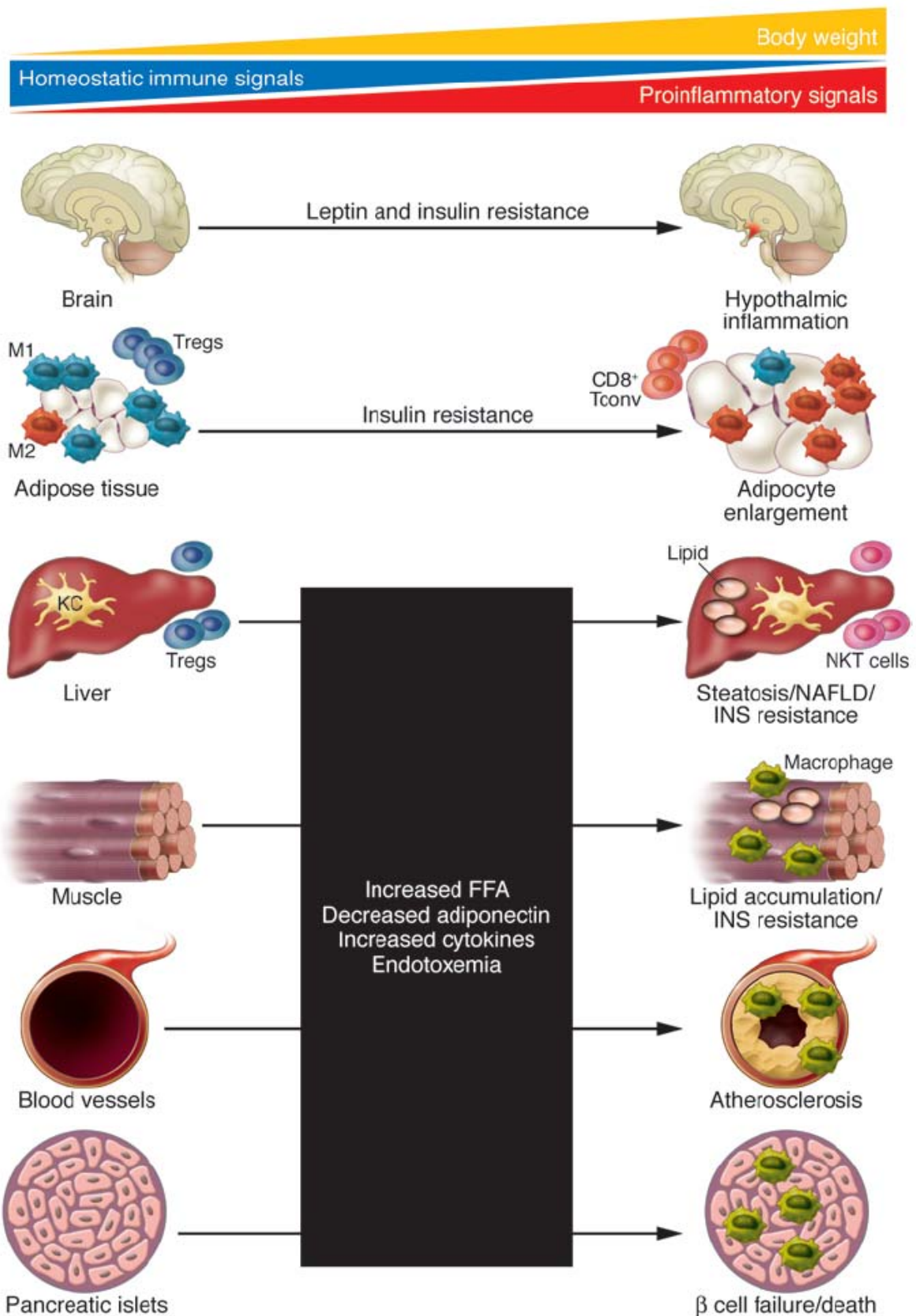


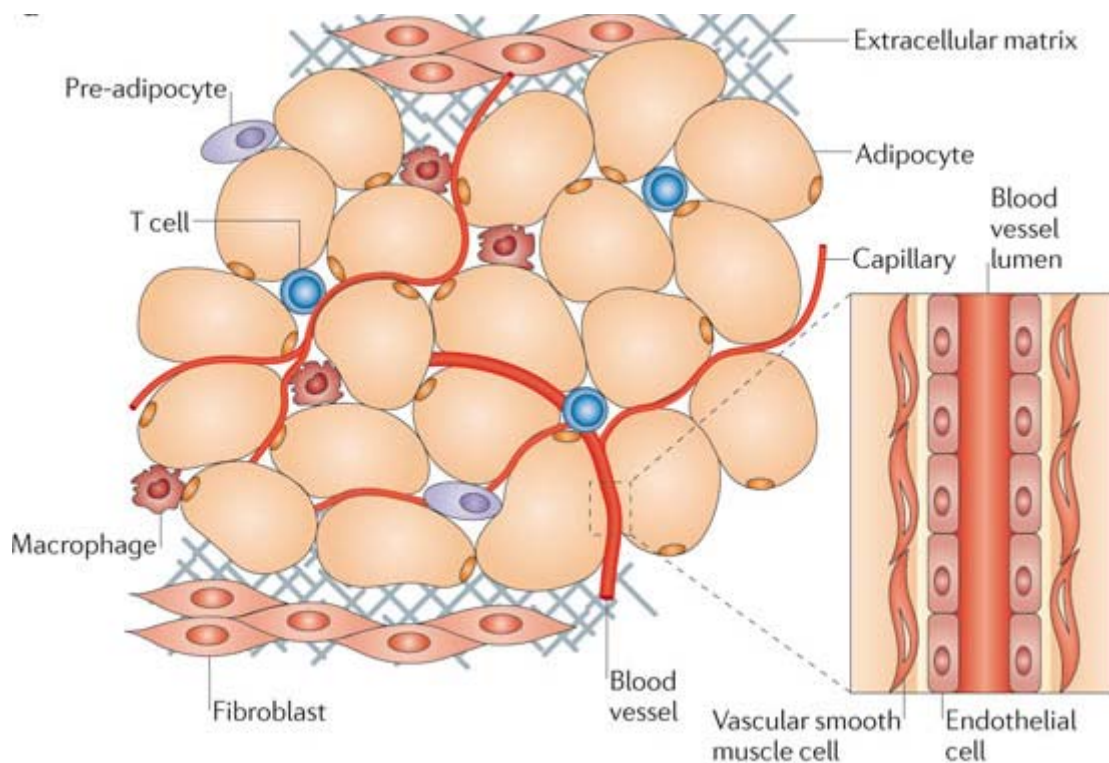
Figure 8 : Inflammation multi-tissulaire au cours de l'obésité. D'après Lumeng et Saltiel, *Journal of Clinical Investigations* 2011².

1. Le tissu adipeux

Contrairement à ce qu'on a longtemps cru, le tissu adipeux n'est pas un simple lieu de stockage des acides gras, mais un tissu très complexe au sein duquel des échanges intercellulaires très finement régulés ont lieu. Ainsi, le TA est capable de sécréter des hormones, des cytokines et des adipocytokines qui vont agir localement et à distance (A. Basdevant. Traité de médecine et de chirurgie de l'obésité, Flammarion 2011, chapitres 8 à 13) ¹¹⁶. Il est très probable que des dérégulations de l'homéostasie du TA, notamment en cas d'obésité, puissent induire une insulino-résistance généralisée (du tissu adipeux mais aussi hépatique et musculaire).

a) Le tissu adipeux en condition homéostatique

En condition homéostatique, le TA est constitué d'adipocytes et d'une fraction cellulaire stromale composée de cellules endothéliales, de fibroblastes, de pré-adipocytes mais aussi de cellules immunes, le tout enchâssé par une matrice extra-cellulaire (figure 9).



.Figure

Figure 9: Structure du tissu adipeux en conditions homéostatiques. D'après Ouchi, Lugus, Parker et Walsh, *Nature Reviews Immunology* 2011 ¹¹⁶.

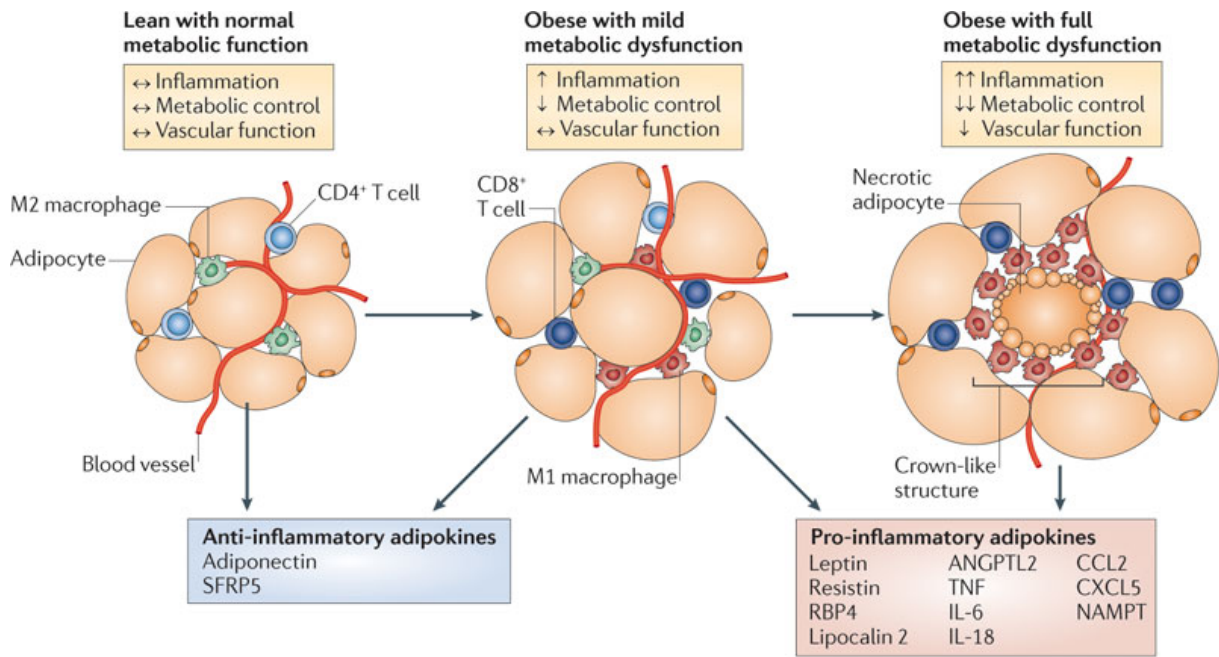
Depuis 2003, de nombreux travaux ont révélé le rôle majeur joué par les cellules immunes dans le TA que ce soit en conditions normales ou au cours de l'obésité ^{117 118}. En l'absence d'obésité, les cellules immunes se composent essentiellement de macrophages de type M2 (cf chapitre précédent), de lymphocytes T et aussi de quelques mastocytes. Chez l'homme mince et dans les modèles animaux en conditions normales, les macrophages résidents du tissu adipeux ont principalement une activité de réparation tissulaire. En effet, ces macrophages de type M2 cicatriciels produisent peu de cytokines pro-inflammatoires, et ont une forte activité arginase. Les macrophages résidents en conditions homéostatiques constituent la population dominante et sont dispersés au sein du tissu interstitiel. Toutefois,

chez l'homme, il semblerait que les macrophages résidents aient un phénotype mixte de macrophages M1 et de macrophages M2 ¹¹⁹. Ces macrophages supportent la fonction des adipocytes et l'insulinosensibilité ¹²⁰. Des lymphocytes T et notamment des T régulateurs (LTreg) sont aussi présents au sein de la fraction stromale du TA en conditions normales ¹²¹. Comme pour les macrophages M2, les LTreg sont importants pour maintenir l'homéostasie du TA en exerçant des fonctions anti-inflammatoires et insulinosensibilisatrices sur les adipocytes ¹²¹. Un article récent a aussi révélé, de façon étonnante, la présence de mastocytes dans le tissu adipeux de sujets minces dont la fonction en conditions homéostatiques est à ce jour incomprise ¹²².

Il existe des interconnexions et des échanges très fins entre les cellules immunitaires et les adipocytes et entre les différentes cellules immunitaires pour maintenir le TA en conditions homéostatiques ¹¹⁶.

b) Modifications du TA au cours de l'obésité

Au cours de l'obésité, de nombreuses modifications du TA vont avoir lieu : hypertrophie des adipocytes, recrutement de cellules immunitaires essentiellement des monocytes/macrophages et des lymphocytes T, remaniement de la matrice extracellulaire (figure 10).



Nature Reviews | Immunology

Figure 10: Evolution structurale du tissu adipeux lors de l'obésité. D'après Ouchi, Lugus, Parker et Walsh, Nature Reviews Immunology 2011 ¹¹⁶.

Lors d'un excès chronique de nutriments, le TA va s'expandre pour stocker les acides gras. Les mécanismes qui vont ensuite conduire à l'inflammation du TA sont mal connus. Plusieurs phénomènes peuvent initier cette inflammation :

- excès d'acides gras et/ou d'endotoxines via l'activation des TLRs
- déficit local en oxygène ¹²³
- nécrose adipocytaire ¹²⁴
- sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires et baisse de l'adiponectine anti-inflammatoire ¹¹⁶
- dysfonction endothéliale ¹²⁵
- changement phénotypique des M2 en M1 ^{126 120}.

Ces phénomènes vont entraîner le recrutement de cellules immunes qui vont amplifier la réponse inflammatoire. Des études cinétiques de prise de poids ont montré que c'étaient les lymphocytes qui étaient recrutés en premier au sein du TA chez des souris sous régime riche en graisses^{127 128 129}. Dans un deuxième temps, des monocytes circulants vont être recrutés et se différencier en M1 pro-inflammatoires (figure 11). Les macrophages M1 sont situés au sein des structures de corps nécrotiques (« crown like structures »)¹²⁰. Ces macrophages pro-inflammatoires vont sécréter du TNF- α , de l'IL-1 et de l'IL-6 qui vont altérer les voies de signalisation de l'insuline et donc l'insulinosensibilité. Les macrophages et les adipocytes sécrètent du CCL2, chemoattractant des monocytes pour amplifier le recrutement de ces derniers¹²⁶.

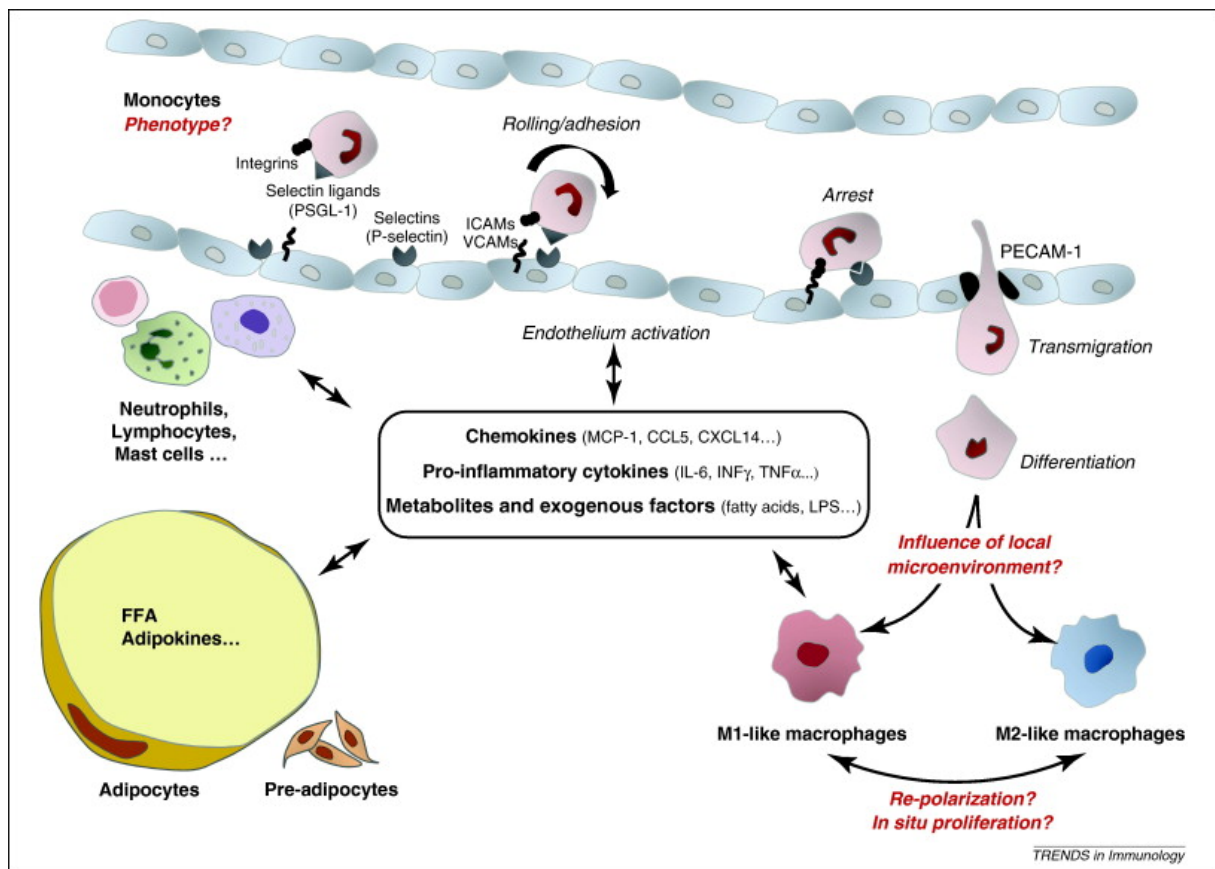


Figure 11: Recrutement des monocytes au sein du TA au cours de l'obésité. D'après Dalmas, Clément, Guerre-Millot, Trends in Immunology 2011¹³⁰.

Cependant, plusieurs points clé sur le fonctionnement des macrophages dans le tissu adipeux sont à ce jour non résolus.

Premièrement, on ne sait pas actuellement quelle(s) sous-population(s) monocyttaire(s) spécifique(s) est(sont) recrutée(s) au cours de l'obésité. Deux études ont récemment démontrés chez la souris, grâce à un système de billes fluorescentes, que les monocytes circulants étaient bien les précurseurs des macrophages infiltrant le TA lors d'un régime riche en graisses^{131 132}. Il s'agit d'une technique indirecte puisque les auteurs injectent des billes qui marquent uniquement les macrophages et non les monocytes. Ils comptent ensuite les macrophages, marqués ou non, au sein du TA après 28 jours de régime gras (les macrophages non marqués étant assimilés aux macrophages recrutés, les cellules marquées étant les résidentes). Dans l'étude du Dr. Shaul, les auteurs montrent de façon très intéressante que les M1 et les M2 sont renouvelés à partir des monocytes périphériques. Les deux études concordent pour dire que les M2 sont renouvelés plus lentement que les M1 après un mois de régime riche en graisses. Il faut noter cependant qu'il n'est pas exclu qu'il puisse exister parallèlement une prolifération locale et/ou un changement phénotypique des M2 en M1. Deux études menées chez la souris montrent une monocytose lors du régime riche en graisse, avec une expansion similaire des Gr1^{high} et des Gr1^{low}^{133 86}. Deux études chez l'homme mettent en évidence une corrélation entre les CD14^{dim}CD16⁺ (population similaire aux monocytes Gr1^{low}, cf chapitre précédent) et l'obésité et l'insulinorésistance^{134 135}. Il semble donc probable que les deux sous-populations monocytaires interviennent au cours de l'inflammation liée à l'obésité.

Identifier les différentes populations monocytaires recrutées, leur cinétique de recrutement, et leur devenir est primordial pour envisager des cibles thérapeutiques précises.

Deuxièmement, pour cibler spécifiquement les M1 et les M2 du TA, il faut les identifier correctement. Or, de très récents travaux ont mis en évidence que la dichotomie M1/M2 n'était pas aussi simple que ce que l'on pensait initialement^{132 136}. Jusqu'à ce jour, les macrophages M2 sont identifiés par la présence du marqueur de surface Mgl-1 (Macrophage galactose type-C Lectin) (ou du CD206, récepteur au mannose) et l'absence de l'intégrine CD11c¹²⁶. Les macrophages M1 sont quant à eux identifiés par la présence à leur surface de l'intégrine CD11c et l'absence de Mgl-1 (ou de CD206). En 2010, deux études ont identifiées deux nouvelles populations de macrophages au sein du TA dans des modèles murins d'obésité^{132 136}. Le Dr Zeyda et ses collaborateurs ont démontré l'existence d'une population négative pour les deux marqueurs CD11c et Mgl-1 exprimant plutôt des gènes de macrophage M2 (Ym1 et arginase). Le Dr Shaul et ses collaborateurs décrivent une autre population, quant à elle positive pour ces deux mêmes marqueurs, de phénotype mixte avec une prédominance d'expression de gènes de type M2. De façon très intéressante, le Dr Shaul et ses collaborateurs observent que les macrophages M2 du TA des souris obèses sont différents des macrophages M2 résidents du TA des souris minces : ils ne sont plus restreints aux espaces interstitiels mais sont aussi présents dans les « crown-like-structures » et expriment un panel de gènes pro et anti-inflammatoires. Ces résultats se rapprochent des travaux faits chez l'homme qui montraient que les macrophages M2 avaient un phénotype mixte M1 et M2¹¹⁹. Dans une revue récente, le Dr Lumeng propose une nouvelle classification des macrophages du tissu adipeux¹³⁷. Les macrophages de type 1a sont les M1 classiques, les macrophages de type 1b ont un phénotype mixte M1/M2 mais plutôt orienté M2, les macrophages de type 2 sont les M2 classiques. Enfin, les macrophages de type 3 ayant aussi une expression de gènes d'orientation mixte M1/M2 (table 3).

	Type 1a ATMs	Type 1b ATMs	Type 2 ATMs	Type 3 ATMs
Surface markers	CD11c ⁺ CD206 ⁻ MGL1 ⁻	CD11c ⁺ CD206 ⁺ MGL1 ^{mid}	CD11c ⁻ CD206 ⁺ MGL1 ^{hi}	CD11c ⁻ CD206 ⁻
Change with obesity	↑	↑	↓ or =	↑
Gene expression	<i>Tnfa, Il6, Nos2, Ccr7</i>	<i>Il12, Arg1</i>	<i>Arg1, Mgl1/2, Il10, Ccl8, Cx3cl1, Ccl2</i>	<i>Arg1, Chi3l3, Ccr2, Cx3cr1, Ccr1, Ccr9</i>
Localization	CLS	CLS	Interstitial	CLS
Recruitment kinetics in obesity	Fast	n.d.	Slow	n.d.
Lipid content	High	High	Low	n.d.

Table 3: Proposition d'une nouvelle classification des macrophages du tissu adipeux. D'après Morris, Singer et Lumeng, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2011 ¹³⁷. CLS : Crown Like structure, n.d.: not done, ATM: adipose tissue macrophages.

Troisièmement, identifier les macrophages du TA des sujets obèses par deux marqueurs de surface semble aujourd'hui illusoire. Depuis quelques années, l'intégrine CD11c est utilisée comme marqueur des M1. En effet, les M2 résidents du TA en l'absence d'obésité ne l'expriment pas, par contre les M1 pro-inflammatoires ont une forte expression de surface de CD11c ¹²⁶. De plus, dans un modèle murin CD11c-DTR en obésité, c'est-à-dire utilisant la toxine diphtérique pour dépler spécifiquement les cellules CD11c⁺ (cellules exprimant le transgène du récepteur à la toxine derrière le promoteur CD11c), le Dr Patsouris et ses collaborateurs montrent que la déplétion en cellules CD11c⁺ après 16 semaines de régime gras améliore l'insulinosensibilité ¹³⁸. Cependant, dans une autre étude, le Dr Li. et ses collaborateurs observent chez des souris rendues obèses par un régime riche en graisses puis remises en régime normal, que malgré la perte de poids et l'insulinosensibilité retrouvée, les macrophages du tissu adipeux conservent le marqueur CD11c ¹³⁹. De plus, l'étude d'expression de gènes du TA révèle une expression prédominante de gènes M2, malgré la présence de l'intégrine CD11c. Ces travaux mettent en lumière la plasticité des macrophages et donc la difficulté de ségréger clairement les différentes sous-populations.

Pour conclure, on ne sait pas quelle population spécifique de monocytes est recrutée dans le TA au cours de l'obésité et si chaque population va donner des macrophages de phénotype différent. Les macrophages étant les acteurs majeurs du maintien du TA en conditions normales et de l'inflammation du TA au cours de l'obésité, il existe actuellement un réel challenge thérapeutique pour favoriser les M2 et inhiber les M1.

Au total, au cours de l'obésité, le TA est le siège d'un remaniement structural et cellulaire qui va conduire au développement d'un microenvironnement pro-inflammatoire. Cette inflammation va avoir des conséquences locales et systémiques comme l'insulinorésistance. Identifier les acteurs clés de cette inflammation permettrait d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques.

2. Le foie

Des apports nutritionnels trop riches en graisses peuvent entraîner une surcharge en graisse du foie appelée stéatose. La stéatose peut être isolée ou compliquée d'une inflammation locale, on parle alors de stéatohépatite (NASH en anglais pour *Non Alcoholic steatohepatitis*). Les macrophages hépatiques (cellules de Kuppfer) ont été beaucoup moins étudiés que les macrophages du TA, mais il semblerait qu'ils communiquent de la même façon avec les hépatocytes pour la maintenance de conditions homéostatiques favorables¹⁴⁰. De la même façon que dans le tissu adipeux, la stéatohépatite s'accompagne d'un recrutement de cellules immunes (surtout des lymphocytes T) et d'une polarisation de la réponse immune vers une réponse de type Th1¹⁴¹. De plus, ce sont les mêmes voies de signalisation pro-inflammatoires (TLR4, JNK, Nf-κB, stress du réticulum endoplasmique) qui sont activées au

cours de la stéatohépatite ^{142 143}. Les cellules de Kupffer sont activées en réponse à la surcharge lipidique du foie essentiellement par la voie TLR-4 ¹⁴⁰. Le Dr Obstfel et ses collaborateurs ont récemment publié que les monocytes circulants étaient recrutés dans le foie en cas de stéatohépatite chez des souris obèses, en partie par le récepteur CCR2, et participaient à la réaction pro-inflammatoire ¹⁴⁴. Les rôles respectifs des cellules de Kupffer activées ou des cellules recrutées dans ce processus inflammatoire ne sont pas actuellement établis.

Le foie est donc également le siège d'une inflammation locale au cours de l'obésité. Cependant, les cellules et les voies d'activation mises en jeu ont peu été explorées à ce jour.

3. Le muscle

Le muscle est également le siège de dépôts lipidiques ectopiques lors de régime hypercaloriques ainsi que d'une inflammation. Des monocytes/macrophages sont recrutés au sein du muscle (autour des dépôts lipidiques, entre les fibres musculaires) et présentent un profil pro-inflammatoire. Ils sont supposés participer à l'insulinorésistance musculaire mais aucune preuve directe n'a été apportée ³. Il faut cependant noter que le nombre de macrophages infiltrant le muscle est bien plus faible que celui des macrophages du TA ou encore que des monocytes/macrophages hépatiques. Les travaux de deux équipes ont récemment mis en évidence, chez la souris, que les macrophages infiltrant le muscle lors d'un régime riche en graisse expriment le même marqueur d'activation CD11c que les macrophages M1 du TA ^{138 145}. De plus, ces travaux démontrent que ces macrophages M1 expriment des gènes proinflammatoires et sont activés par les voies JNK kinases. Hong et collaborateurs ont également montré qu'une augmentation de l'expression de l'IL-10

spécifiquement dans le muscle diminue l'infiltration musculaire de monocytes/macrophages¹⁴⁶. De façon intéressante, cette baisse de l'infiltration cellulaire s'accompagne d'une diminution de l'inflammation locale et d'une amélioration de l'insulinosensibilité systémique.

Plusieurs études s'accordent pour dire que le muscle est aussi le siège d'une inflammation et d'un recrutement de cellules immunitaires lors de l'obésité. L'infiltrat cellulaire est tout de même d'un degré bien moindre que dans le TA.

4. L'hypothalamus

L'hypothalamus est le siège privilégié des interactions entre des signaux environnementaux et les systèmes neuroendocriniens qui vont réguler la prise alimentaire (A. Basdevant. Traité de médecine et de chirurgie de l'obésité, Flammarion 2011, chapitre 20, L. Pénicaud). Pour la première fois en 2004, des auteurs démontrent, chez des rats soumis à un régime riche en graisse pendant 20 semaines, que le cortex cérébral est le site d'une inflammation¹⁴⁷. Puis il apparaît que c'est l'hypothalamus qui est le siège d'une inflammation lors du régime gras avec une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α ¹⁴⁸. Les auteurs montrent en plus que l'inflammation hypothalamique secondaire à l'excès d'apports en graisses est associée à une insulino-résistance et une leptino-résistance locale. L'insulino-résistance et la leptino-résistance se traduisent par une augmentation de la balance énergétique, une augmentation de la prise alimentaire, une augmentation du stockage des graisses et par conséquent une prise de poids. Différents modèles de délétion de voie de signalisation pro-inflammatoires spécifiquement dans les neurones^{149 150} (et même spécifiquement dans les neurones hypothalamiques)¹⁴⁹ ont mis en évidence que la diminution de l'inflammation neuronale diminuait la prise alimentaire et le poids lors d'un régime gras. De plus, des auteurs qui ont au contraire stimulé les voies

inflammatoires dans l'hypothalamus (par des perfusions locales chez des rats) ont démontré que l'inflammation était suffisante pour augmenter la prise alimentaire et la prise de poids ¹⁴⁹.

Pour conclure, plusieurs études convergent pour dire que l'excès calorique chronique est responsable d'une inflammation de l'hypothalamus, qui est suffisante pour entraîner une leptino- et une insulino-résistance locales, responsables d'une prise de poids ¹⁰⁶.

Cependant, de nombreuses questions restent encore sans réponse actuellement ¹⁵¹: comment les neurones hypothalamiques peuvent répondre à une inflammation aiguë (comme un sepsis par exemple) en donnant des signaux en faveur d'une balance énergétique négative et d'une perte de poids, alors qu'ils vont répondre, au contraire, à une inflammation chronique de bas grade secondaire à un régime gras par une prise de poids ? Quelles sont les cellules impliquées dans l'inflammation hypothalamique : les neurones et/ou les cellules de la microglie (les macrophages du système nerveux central) comme dans le tissu adipeux et le foie ?

5. Le pancréas

Comme dans le tissu adipeux et le foie, le pancréas va être le siège d'une infiltration de macrophages lors d'un régime riche en gras. Ces macrophages vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires pouvant entraîner une dysfonction des cellules β pancréatiques et altérer la sécrétion d'insuline ¹⁵². De façon étonnante, très peu d'études se sont intéressées à ce sujet ².

OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE

Il y a actuellement peu de données fonctionnelles sur le rôle des monocytes Gr1^{low}. Cependant, comme je l'ai évoqué précédemment, il semble probable que les monocytes Gr1^{low} aient une fonction régulatrice négative au cours de l'inflammation et/ou une fonction de réparation tissulaire. L'hypothèse qui vient naturellement est celle d'une différenciation des monocytes Gr1^{low} en macrophages anti-inflammatoires et/ou en macrophages cicatriciels. Nous avons vu dans l'introduction que les différentes sous-populations de macrophages du tissu adipeux jouaient un rôle majeur pour maintenir des conditions homéostatiques d'une part, mais aussi dans l'inflammation du TA et ses complications d'autre part. Nous avons donc émis l'hypothèse que la population spécifique de Gr1^{low} circulants pouvait être à l'origine des macrophages M2 cicatriciels au cours de l'obésité et que moduler cette population pouvait modifier l'obésité et l'insulinorésistance.

Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à répondre à plusieurs questions non résolues actuellement :

- 1) Quelle est la contribution spécifique des différentes sous-populations de Gr1^{high} et Gr1^{low} dans la monocytose observée au cours d'un régime riche en graisses ?
- 2) Ces populations présentent-elles un phénotype particulier au cours du régime riche en graisses ?
- 3) Est-ce que les monocytes Gr1^{low} peuvent jouer un rôle au cours de l'obésité et l'insulinorésistance ? Pour répondre à cette question, nous avons étudié des modèles murins génétiquement modifiés dans lesquels la population de Gr1^{low} est modulée au cours de l'induction de l'obésité. Dans un premier temps, nous avons utilisé des souris déficientes pour le récepteur aux chimiokines CX3CR1 dans lesquelles la population des Gr1^{low} est fortement diminuée. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé

comme stratégie « miroir » le modèle murin CD11c-hBcl2, dans lequel la population de Gr1^{low} est augmentée au cours du régime riche en graisses. Nous avons alors étudié les phénotypes d'obésité et d'insulinorésistance ainsi que le tissu adipeux.

RESULTATS – ARTICLE

Alterations in Gr1^{low} Monocytes Subset upon Diet Induced Obesity Is Associated with Changes in Insulin Resistance and Body Weight

Sophie Beliard^{1,2,3,4}, Flora Saint-Charles^{1,2,4}, Emmanuel L. Gautier¹, Geneviève Marcellin¹, Sophie Gilibert^{1,4}, Virginie Deswaerte^{1,2,4}, Claire-Marie Vacher⁵, John Chapman^{1,2,3,4}, Wilfried Legoff^{1,2,3,4}, Thierry Huby^{1,2,3,4} and Philippe Lesnik^{1,2,3,4}.

¹ INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, F-75013, Paris, France

² UPMC Univ Paris 06, UMR-S 939, F-75013, Paris, France

³ AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Endocrinologie-Métabolisme, Paris, France

⁴ Institut of CardioMetabolism And Nutrition (ICAN), 75013 Paris, France

⁵ URM 8195, Centre de Neurosciences Paris-Sud, 91405 Orsay, France

Running title: Gr1^{low} monocytes in obesity

Key Words: Monocytes, obesity, insulin resistance, adipose tissue macrophages, inflammation.

Word count: body (6021) abstract (259)

Number of figures: 7

Address correspondence to:

Dr Philippe Lesnik, INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, Pavillon Benjamin Delessert, 83 Boulevard de l'hôpital, F-75013, Paris, France

Tel: (33)-1-42177860; Fax: (33)-1-45828198; e-mail: philippe.lesnik@upmc.fr

Abstract

Background- Obesity is associated with low grade inflammation. Blood monocytes, key players in innate immunity, are expanded during obesity. In mice, monocytes are divided in two main subsets, the Gr1^{high} and the Gr1^{low} monocytes. These two subsets are believed to have different functions, but their role in the physiopathology of obesity is still unknown.

Methods and Results- Here we show that High Fat Diet (HFD) induces a monocytosis in mice that is mainly due to Gr1^{low} monocytes expansion. Moreover, HFD induces a strong up-regulation of CD11c specifically on this cell subset. Using different mice models which differ in Gr1^{low} monocytes number, we found a striking correlation between the proportion of Gr1^{low} monocytes and the body weight or with the insulin resistance status. Indeed, CX3CR1 deficient mice, which have a reduced proportion of Gr1^{low} monocytes upon HFD, were more insulin resistant and have a lower body weight than control mice. Conversely, mice expressing the anti-apoptotic gene hBcl2 under the CD11c promoter control, which have an increased Gr1^{low} monocytes population, have higher insulin sensitivity upon HFD. Furthermore, in CD11c-hBcl2/CX3CR1 KI mice, a partial rescue of Gr1^{low} monocytes was associated with a total rescue of body weight. Our data also strongly suggest that, in CX3CR1 KI mice, an increased adipose tissue inflammation due to a defect of M2 macrophage functions is responsible for the metabolic alterations.

Conclusions- Our data strongly suggest that Gr1^{low} monocytes i) play a new key protective role against obesity induced insulin-resistance and ii) promotes body weight gain in mice fed a HFD. Indeed, this monocyte subset likely promotes M2 macrophage functions in adipose tissue, decreasing its inflammation and thus favoring its development and insulin sensitivity.

Introduction

Obesity and its associated complications such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, cancers and premature mortality, has become a worldwide health problem. Over the last decade, growing evidences have emerged bringing up a close link between obesity and immunity ¹. Obesity is characterized by a chronic low grade inflammation generating metabolic complications ². This low grade inflammation occurred at a systemic level as well as in different tissues. Indeed, in adipose tissue as well as in liver and muscles, inflammation-linked-obesity is characterized by an infiltration of pro-inflammatory macrophages (called M1) secreting pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 ^{3 4 5}. These pro-inflammatory cytokines are thought to be responsible for insulin resistance locally and at distance ^{6 7}. On the other hand, in lean subjects, alternatively activated macrophages (called M2) are important for maintaining homeostasis in adipose tissue ⁸.

Blood monocytes, the precursors of macrophages, play a pivotal role in innate immunity ⁹. They are key actors in septic and aseptic inflammation diseases. Monocytes are divided into at least three functional subsets in humans and two functional subsets in mice. These subsets differ in their surface expression of chemokine receptors and adhesion molecules. They also differ in the cytokines they produce and in their functions ^{10 11 12}. In mice, one subset of monocytes, characterized by their surface expression of Gr1^{high}, CCR2, and a low level of CX3CR1, are selectively recruited in inflammatory sites. They are called “inflammatory” or “classical” monocytes. The other subset of monocytes, (characterized as Gr1^{low}, CX3CR1^{high} and CCR2⁻) was initially called “resident monocytes” due to their ability to replenish tissues in resting conditions after adoptive transfer ¹⁰. However, recent data showed that Gr1^{low} monocytes are also actively recruited to inflammatory sites ^{13 14 15}. Indeed, following myocardial infarction, Gr1^{low} monocytes are recruited into damaged tissues where

they differentiate in M2 macrophages which display anti inflammatory and tissue repair functions¹⁵. The recruitment and the survival of these two subsets of monocytes are differentially regulated. For instance, in damage tissues, Gr1^{high} monocytes are recruited early after the injury whereas Gr1^{low} are recruited few days after^{13 14 15}. Moreover CX3CR1, a chemokine receptor highly expressed on Gr1^{low} monocytes, is a key factor for Gr1^{low} survival¹⁶. Indeed, CX3CR1 deficiency in mice results in a strong decrease in Gr1^{low} monocytes population^{16 17}.

Inflammation is clearly associated to the physiopathology of obesity and insulin resistance. However, the relative contribution of the different subsets of monocytes in the development of adipose tissue inflammation is still poorly understood. Recently, in human, two clinical studies have revealed an increase of a specific subset of monocytes associated to obesity^{18 19}. An expansion of the CD14^{dim}CD16⁺ monocytes subset in human, corresponding to Gr1^{low} monocyte subset in mice²⁰, was found to be correlated with increased fat mass and glycemia¹⁸.

In the present study, we wanted to understand the relative contribution of the different monocytes subsets in obesity and insulin-resistance in mice. We found that Diet Induced Obesity (DIO) promotes a large expansion of the specific Gr1^{low} monocyte subset. It also increases the expression of CD11c integrin, a molecule involved in the homing of monocytes in inflamed tissue, specifically on this monocyte subset. Using different animal models allowing the modulation of the proportion of GR1^{low} monocytes in blood (namely CX3CR1 KI mice, CD11c-hBcl2 mice, and the double transgenic CX3CR1 KI/CD11c-hBcl2 mice), we found a striking correlation between the level of circulating Gr1^{low} monocytes and the body weight. We also provide data supporting a new key protective role for Gr1^{low} monocytes against insulin-resistance associated with obesity. Indeed, Gr1^{low} monocytes seem to promote

M2 recruitment in adipose tissue during DIO. It leads to a decrease of the inflammation of adipose tissue and thus, protects against insulin-resistance.

Results

High-fat diet induces a marked increase of the Gr1^{low} monocyte subset:

Previous studies have documented monocytosis in mice fed a high-fat enriched diet (HFD) ²¹ ²². To better characterize the different populations of monocytes modified during diet-induced-obesity, we analyzed changes in white blood cell populations in C57BL/6 mice during standard chow diet or HFD with 60% of Kcal from fat. The percentage of blood monocytes (defined by expression of CD115 and CD11b) were more than doubled in mice maintained on HFD for 30 weeks consistently with previous studies ²¹ ²³ (Fig1.A). This monocytosis was mainly due to a 3-fold increase of Gr1^{low} population (Fig1.B). As a consequence, relative proportions of the two subsets of monocytes was changed under HFD conditions, leading to a 2-fold increased of the Gr1^{low}/Gr1^{high} ratio (0.90 ± 0.34 on chow diet versus 1.83 ± 0.69 on HFD, $p=0.008$) (Fig1.C. D). Recently, Huaizhu Wu and colleagues have observed in both human and mice that obesity was associated with a strong expression of the integrin CD11c on monocytes ²². We therefore evaluated the expression levels of CD11c on Gr1^{low} and Gr1^{high} monocytes during standard diet and HFD. As shown in figure 1.E, we observed that Gr1^{low} monocytes expressed more CD11c than Gr1^{high} subset in mice maintained in chow diet (respectively 358 ± 130 MFI versus 186 ± 71 MFI, $p < 0.001$), while in HFD, the expression levels of CD11c were strongly up-regulated only in Gr1^{low} subset (respectively 904 ± 145 MFI on Gr1^{low} subset versus 178 ± 124 MFI on Gr1^{high} subset, $p < 0.001$) (Fig.1F).

To conclude, HFD induced monocytosis is mainly associated with a 3-fold expansion of the Gr1^{low} monocytes subset that express high level of CD11c integrin.

CX3CR1 deficiency is associated with a significant decrease of Gr1^{low} monocytes subset in HFD conditions

Monocytes subsets differ in their level of CX3CR1 cell-surface expression¹⁰. Indeed, Gr1^{low} monocytes are CX3CR1^{high} whereas Gr1^{high} are CX3CR1^{low}. Recently, Landsman and colleagues have shown that CX3CR1-CX3CL1 interaction is critically involved in cell survival of the Gr1^{low} subset¹⁶. Moreover, CX3CR1 deficiency was shown to be associated with a specific reduction of the Gr1^{low} monocyte population^{16 17}. Therefore, we hypothesized that CX3CR1 deficiency would balance out the monocytosis of Gr1^{low} monocytes associated with HFD. We thus evaluated blood monocytes subsets in CX3CR1 KI mice fed with HFD containing 60 % of Kcal from fat (Fig. 2). The percentage of blood monocytes was unchanged between CX3CR1 KI mice and control mice maintained on a chow diet or a HFD (Fig. 2 A). As previously described, the specific population of Gr1^{low} monocytes was markedly reduced in CX3CR1 KI mice fed a chow diet^{16 17} (Fig. 2B and C). Similarly, in CX3CR1 KI mice under HFD conditions, we showed that Gr1^{low} monocytes were also significantly reduced (Fig. 2B and C). As a consequence, the Gr1^{low}/Gr1^{high} ratio was found to be decreased by 2-fold in CX3CR1 KI mice fed a HFD as compared to control mice (respectively 1.01 ± 0.50 and 1.83 ± 0.69 , $p=0.02$) (Fig. 2D).

To conclude, these data illustrate that CX3CR1 deficiency is associated with a large decrease of the Gr1^{low} monocytes subset (-35%, $p=0.02$) under HFD conditions. Interestingly, it shows that the Gr1^{low}/ Gr1^{high} ratio in CX3CR1 KI mice under DIO conditions is very similar to the Gr1^{low}/ Gr1^{high} ratio of C57BL/6 mice fed a normal chow diet, therefore suggesting that CX3CR1 deficiency neutralize the HFD-dependant change on the Gr1^{low}/ Gr1^{high} ratio.

CX3CR1 KI mice fed a high-fat diet display reduce bodyweight but increase insulin resistance

Inflammation has been associated with metabolic disorders in human and mice ⁷. We thus hypothesized that an imbalance in Gr1^{low} population may influence the metabolic phenotype of mice fed a HFD. To test this, we placed CX3CR1 KI and control mice in HFD with 40 % of Kcal from fat during 18 weeks. This resulted in a slightly lower body weight in CX3CR1 KI mice as compared to C57BL/6 controls (Fig.3A). Then, we further challenged these mice with a more inflammatory HFD containing 60 % of Kcal from fat for 12 more weeks. With this HFD, CX3CR1 deficient mice showed a significant lower body weight as compared to WT controls (Fig.3A). Evaluation of the weight of white adipose tissue revealed that CX3CR1 KI mice had a mild decrease of total fat mass due to a reduction of visceral fat (peri-ovarian) and sub-cutaneous fat (Fig.3 B). Surprisingly, despite a lower body weight, glucose tolerance tests (GTT) and insulin tolerance tests (ITT) evaluated in body weight-matched mice, demonstrated that CX3CR1 KI mice fed a HFD were significantly more insulin resistant than WT controls fed with the same diet (Fig.3 C and D).

To conclude, DIO is associated with a lower weight gain in CX3CR1 deficient mice even though these mice display impaired insulin sensitivity.

Hematopoietic cells are responsible for the lower bodyweight gain and the increased insulin resistance observed in CX3CR1 deficiency upon HFD

In order to confirm that the metabolic phenotype observed in CX3CR1 KI mice fed a HFD was restricted to the hematopoietic system, we generated bone marrow (BM) chimeras by adoptive transfer of lethally irradiated C57BL/6 mice with BM of C57BL/6 or CX3CR1 KI mice. Five weeks after transfer, all mice were fed with a HFD containing 60 % of Kcal from

fat for 22 weeks. Then, blood monocytes populations were analyzed by flow cytometry and the monocytosis was found to be unchanged between mice receiving CX3CR1 KI or C57BL/6 donor cells (Fig.4A). Interestingly, upon exposure to HFD, a significant decrease of the Gr1^{low} monocytes subset was observed in mice deficient for CX3CR1 in the hematopoietic system (-41%, p= 0.0014) (Fig 4 B) comparable to that observed in mice totally deficient for CX3CR1 (-35%, p=0.02) (Fig 2 B), when compared with the respective fed control mice (Fig.4B and C). Consistent with these data, the Gr1^{low}/ Gr1^{high} monocytes ratio was decreased by 2-fold in the recipients of CX3CR1 KI BM mice as compared with controls (respectively 0.89±0.26 versus 1.71±0.19 p=0.00001) (Fig.4D). Further evaluation of the metabolic phenotype revealed lower bodyweight in the recipients of CX3CR1 KI BM cells than in the recipients of C57BL/6 BM cells (Fig.4E). Examination of the weight of white adipose tissue revealed that recipients of CX3CR1 KI BM cells had decrease of total fat mass (-25.6 %, p=0.054) due to a concomitant decrease of visceral and sub-cutaneous fat mass (Fig.4F). Likewise, when expressed as a percentage of total body weight, adipose tissue weight was subject to a significant decreased in recipients of CX3CR1 KI mice compared to controls (Fig 4 G). In accordance with the phenotype observed in mice totally deficient for CX3CR1, and despite a lower bodyweight, mice deficient for CX3CR1 in the hematopoietic compartment display increase insulin resistance as assessed by glucose tolerance tests (GTT) compared with control mice (Fig.4H). Consistently, circulating NEFA levels were significantly increased in irradiated C57BL/6 reconstituted with BM cells of CX3CR1 KI mice as compared to WT controls (Fig.4I). Remarkably, we found a positive correlation between levels of circulating Gr1^{low} monocytes and bodyweight ($r^2=0.4$, $p<0.0001$) (Fig. 4J). We also found a strong inverse correlation between numbers of circulating Gr1^{low} monocytes and insulin resistance evaluated using the HOMA index (Fig.4K).

All together, our data indicate that the metabolic effects of CX3CR1 deficiency on bodyweight gain and on insulin resistance is supported by BM-derived hematopoietic progenitor cells. Moreover, these findings strongly suggest that Gr1^{low} monocytes level is linked to bodyweight gain and to insulin sensitivity.

CX3CR1 deficiency exacerbates high-fat diet-induced inflammation within adipose tissue and is associated with a decreased number of M2 macrophages

During obesity, monocytes are recruited in AT²⁴ and participate to the AT inflammation by secreting proinflammatory cytokines⁸. It has been proposed that the specific population of Gr1^{low} monocytes differentiate into alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in inflamed tissues, which display anti-inflammatory and repairing properties in inflamed tissues^{12 15 25}. We therefore hypothesized that the insulin resistance observed in mice deficient for CX3CR1 (in which the circulating Gr1^{low} subset is decrease) might be related to an increased AT inflammation due to a decreased number of M2 macrophages. To test this, we analyzed the different populations of adipose tissue macrophages (ATM) by flow cytometry using markers of pro-inflammatory M1 macrophages: CD11c⁺ Mgl1^{neg} and M2 macrophages: Mgl1⁺ CD11c^{neg} (Fig.5A). The cells expressing these markers were gated on macrophage population defined by the membrane co-expression of F4/80, CD11b and CD45. The percentage of ATM in visceral fat was similar in both CX3CR1 KI mice and controls (Fig.5B). However, the percentage of each subset of ATM (M1 and M2) was altered in mice lacking CX3CR1 (Fig 5 C-E). Indeed, in CX3CR1 KI mice, the % of M1 macrophages was increased (7.39±2.78 % M1 in CX3CR1 KI mice versus 5.19±2.59 % M1 in controls, p=0.2) (fig 5C), while the % of M2 was diminished (13.35±1.81 % M2 in CX3CR1 KI mice versus 11.11±2.43 % M1 in controls, p=0.08) (Fig 5D) resulting in reduction by an half of the M2/M1 ratio in mice

deficient for CX3CR1 as compared to controls (respectively 1.74 ± 0.84 versus 3.76 ± 2.44 , $p=0.07$) (Fig.5E). However, differences between the two groups did not reach the significance probably as a consequence of the high variability observed after 30 weeks of diet.

In order to study the functional consequences of changes in cell population, we examined inflammatory gene expressions in visceral adipose tissues of CX3CR1 KI mice and controls by RT-q PCR (Fig.5F). We specifically looked at an array of M1 macrophage specific genes and an array of M2 macrophage specific genes. We found an up-regulation of M1 macrophage genes in mice deficient for CX3CR1 compared to control. In particular, CCL2, IL-1 β and TLR-4 mRNA were significantly increased by about 4 fold. However, some M2 gene mRNAs seemed to be also increased in CX3CR1 KI mice but to a lower extend than M1 gene.

Altogether, these data support a close relationship between the % of M2 macrophage in visceral adipose tissue and the expression of pro-inflammatory genes as highlighted in CX3CR1 deficient mice challenged for DIO. Collectively, these data suggest that increased levels of Gr1^{low} monocytes upon HFD-induced obesity has a protective effect against insulin resistance by increasing M2 macrophage number in AT, hence controlling AT inflammation.

Expression of the anti-apoptotic gene hBcl-2 under the CD11c promoter increases Gr1^{low} monocytes levels in DIO conditions and promotes insulin sensitivity

To further support our model proposing that Gr1^{low} monocytes are protective against insulin resistance under DIO conditions, we decided to use a complementary strategy using a mice model in which Gr1^{low} monocytes population in blood is increased. As shown in Fig. 1, the integrin CD11c is specifically express on Gr1^{low} monocytes in DIO conditions, and to a lesser

extent on Gr1^{high} monocytes (Fig. 1E and 1F). We thus hypothesized that in a transgenic mice model in which the anti-apoptotic gene hBcl-2 is expressed under the specific promoter CD11c, the relative proportion of circulating Gr1^{low} monocytes would be increased in DIO conditions.

We generated bone marrow chimeric mice by reconstructing lethally irradiated C57BL/6 mice with BM isolated from CD11c-hBcl2 or C57BL/6 mice. We then placed the mice upon HFD with 60 % of Kcal from fat, five weeks after transplantation. We found that recipients of CD11c-hBcl2 BM cells displayed a significant increase of monocyte levels compared to controls both in chow diet but also in HFD (Fig.6 A). On chow diet, this monocytosis was due to an expansion of both populations of Gr1^{low} monocytes and Gr1^{high} monocytes. By contrast, the monocytosis upon HFD was restricted to the solely expansion of the Gr1^{low} population (Fig 6B). Accordingly, the Gr1^{low}/Gr1^{high} ratio was significantly increased in the recipients of CD11c-hBcl2 BM cells mice compared to controls (respectively 2.11±0.19 and 1.71±0.19, p=0.02) in DIO conditions (Fig 6C).

We next investigated the metabolic status, i.e. weight gain and insulin resistance state in CD11c-hBcl2 transgenic mice. Thus we placed BM chimeric C57BL/6 mice, lethally irradiated and reconstructed with C57BL/6 or CD11c-hBcl2 mice BM cells, in HFD with 60 % of Kcal from fat. After 22 weeks of HFD, no differences were found in the weight gain between the recipients of CD11c-hBcl2 mice BM cells mice and controls (Fig.6 D). However, insulin tolerance tests demonstrated that HFD-fed CD11c-hBcl2 BM Tg mice were significantly more insulin sensitive than WT controls (Fig.6E). Consistent with these data, circulating triglycerides levels were significantly reduced (-13.2%, p=0.02) as well as non-esterified-free-fatty-acids (NEFA) (-15.2%, p=0.053) (Fig.6F). Then, we studied quantitative ATM content in visceral fat and found that the percentage of macrophages was significantly decreased in recipients mice transferred with BM of CD11c-hBcl2 mice compared to controls

(Fig.6G). Furthermore, the % of M2 macrophages was increased in recipients of CD11c-hBcl2 mice BM while the % of M1 macrophages was unchanged (Fig.6H and I). Accordingly, the M2/M1 ratio was increased in CD11c-hBcl2 mice BM compared to controls (respectively 6.06 ± 6.12 versus 3.12 ± 2.48 , $p=0.3$) (Fig.6J).

We then analyzed inflammatory genes expression in visceral fat by RT-qPCR. We confirmed that M2 genes were more expressed in recipients of CD11c-hBcl2 mice BM compared to controls (Fig.6K). In particular, Arginase-1 mRNA level appeared more than 12 fold higher in CD11c-hBcl2 transgenic mice than in control. Of note, CCL5 expression is also increase by 2-fold.

To conclude, our results showed that in CD11c-hBcl2 BM Tg mice, DIO induced an expansion of the Gr1^{low} monocytes subset which was associated with a higher insulin sensitivity. Interestingly, using these two mice models, we provide evidence that CX3CR1 deficiency and enforced expression of hBcl2 in CD11c⁺ monocytes act in opposite ways on Gr1^{low} monocytes levels. This resulted in inverse phenotype at a cellular level (ATM populations), at the tissue level (M2 gene expression increase) and at a physiological level (insulin sensitivity). These observations reinforce the idea that Gr1^{low} monocytes might impact insulin sensitivity under DIO conditions.

Enforced expression of hBcl-2 in Gr1^{low} monocytes partially rescue the Gr1^{low}/Gr1^{high} ratio and fully rescue the weight loss in CX3CR1 deficient mice upon HFD

Given the opposite phenotype observed in CX3CR1 deficient mice and CD11c-hBcl2 transgenic mice, we hypothesized that the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 under the control of CD11c in CX3CR1 deficient mice, might rescue the Gr1^{low} cells number, the Gr1^{low}/Gr1^{high} ratio and accordingly the metabolic phenotype in DIO conditions. To test this,

we generated mice BM chimeras by reconstructing lethally irradiated C57BL/6 mice with BM cells isolated from 3 groups of mice with the following phenotype: i) CX3CR1 KI ii) CD11c-hBcl2/CX3CR1 KI and iii) C57BL/6. After 5 weeks of recovery, the animals were fed a HFD with 60 % of Kcal from fat. After 22 weeks on HFD, Gr1^{low} monocytes levels were found to be significantly increased in recipients of CD11c-hBcl2/CX3CR1 BM cells compared with recipients of CX3CR1 KI BM cells (Fig.7A). However, these Gr1^{low} monocytes levels did not reach those of the recipients of C57BL/6 BM cells. Accordingly, we observed that the Gr1^{low}/Gr1^{high} ratio of recipients of CD11c-hBcl2/CX3CR1 KI BM cells was augmented as compared to recipients of CX3CR1 KI BM cells (Fig 7B). Hence, the expression of the anti-apoptotic hBcl-2 gene under the control of CD11c, partially rescue the Gr1^{low} monocytes levels and the Gr1^{low}/Gr1^{high} ratio in blood. We further investigated the weight gain of HFD-fed recipients of CD11c-hBcl2/CX3CR1 KI BM cells and observed that it was similar to the one observed in control mice (Fig.7C and D). These result shows that expression of hBcl2 under the promoter of CD11c totally rescue the phenotype of lower bodyweight gain in CX3CR1 KI mice upon HFD. Moreover, if we considered all the different mice models used in this study, we found a strong reverse correlation between the % of Gr1^{low} monocytes and the insulin resistance evaluated with the HOMA index ($r^2=0.24$, $p=0.0059$).

To conclude, these results strongly suggest that the partial rescue of the Gr1^{low}/Gr1^{high} ratio in HFD-fed recipients of CD11c-hBcl2/CX3CR1 KI BM is responsible for the reversion of the lower body weight gain and observed in CX3CR1 KI mice.

Overall, this study put forward a new and crucial function for Gr1^{low} monocytes in the control of the physiological parameters under DIO condition. Indeed, this cell subset appears to play important roles in adipose tissue: first, they are protective against HFD induced insulin resistance and second, they promote adipose tissue expansion and weight gain.

Discussion:

In this study, we demonstrate how DIO leads to a specific expansion of Gr1^{low} monocyte subset and induces an increased surface expression of the integrin CD11c specifically on Gr1^{low} monocytes. Using transgenic mouse models which differ in the proportion of Gr1^{low} monocytes in blood under HFD, we have established a strong correlation between the number of circulating Gr1^{low} monocytes and two different phenotypes: the body weight, and insulin sensitivity. Moreover, our data indicates that Gr1^{low} monocytes can decrease the DIO-induced inflammation of adipose tissue by favoring M2 macrophage function in this tissue. All together, our data support the idea that upon HFD, Gr1^{low} monocytes are recruited in AT where they differentiate in M2 macrophages and decrease AT inflammation, thus preventing insulin resistance.

It is well established that obesity is associated with a leukocytosis in human. Recently, clinical studies have associated an increase of CD14^{dim}CD16⁺ monocytes subset, corresponding to Gr1^{low} monocyte subset in mice²⁰, with an increased fat mass and glycemia,^{18 19}. In mice, few studies described the monocytosis associated with DIO. Westcott et al revealed a clear increase of both Gr1^{low} and Gr1^{high} monocytes population in DIO with a comparable extent²¹. Similarly, Tsou et al. also found an expansion of both monocyte populations during HFD²³. Consistently, we also found a HFD- induced expansion of both monocyte subsets, but a larger one for Gr1^{low} subset. Interestingly, the decrease of Gr1^{low} monocytes in CX3CR1 KI mice under DIO compared to control mice was associated with an increased insulin-resistance. On the contrary, the increase of Gr1^{low} monocytes observed in CD11c-hBcl2 mice was associated with insulin sensitivity. In the same way, the decrease of Gr1^{low} monocytes in CX3CR1 KI mice under DIO was associated with a lower weight gain.

This phenotype was fully rescued by promoting Gr1^{low} survival through the expression of the CD11c-hBcl2 transgene in CX3CR1 background. Altogether, these data strongly suggest that Gr1^{low} monocytes are involved in HFD induced weight gain and play a protective role against insulin resistance. These results also show that CX3CR1 is central in this process. Consistently, two polymorphisms altering CX3CR1 function in human have been correlated to insulin resistance^{26 27}. Concerning our mice model, we had to point out that CX3CR1 is also expressed on other hematopoietic cells such as NK cells, dendritic cells, T cells or microgliaocytes, and plays a complex role in immune system^{28 29 30 31 32 33}. However, we did not detect any significant change in the number of dendritic cells, nor T cells in blood (sup Fig 1). Nevertheless, we found a not significant decrease percentage of NK cells in blood (10.09±4.41 % of CD45 in CX3CR1 KI mice versus 13.16±4.02 % of CD45 in WT mice, NS) (sup Fig 1), however, when comparing the number of NK cells in AT between CX3CR1 KI and controls, we did not find any significant differences (sup Fig 2A). In addition, the CD11c promoter, which drives hBcl2 expression in our second mice model, is not specific of Gr1^{low} monocytes in DIO, but is also expressed on other cell types such as dendritic cells, macrophages, neutrophils and some B cell subsets. This means that we cannot exclude that in these different mouse models, other hematopoietic actors influence the physiopathology observed under DIO. However, the strong correlation we obtained pooling our 4 different mice models between the proportion of Gr1^{low} monocyte subset and insulin-sensitivity, strongly support an active role for this cell subset in the control of metabolic homeostasis.

The insulin resistance observed in CX3CR1 KI mice under HFD is of particular interest. In mice, obesity induced insulin-resistance is triggered by a low grade inflammation. In particular, inflammation of adipose tissue, liver and muscles promotes this physiological defect. Here we demonstrate that CX3CR1 deficiency in mice led to an increased

inflammation of adipose tissue under HFD. This phenomenon is likely to be responsible for the insulin-resistance observed in this mouse model. Adipose tissue inflammatory status is strongly influenced by the local macrophage populations. Indeed, M1 macrophages display proinflammatory functions whereas M2 macrophages show anti-inflammatory and tissue repair functions. Interestingly, in CX3CR1 KI mice, M2 macrophage population seemed to be reduced whereas M1 population was increased. This change in ATM populations could explain AT inflammation and thus insulin resistance. Consistently, the mirror experiment using CD11c-hBcl2 transgenic mice showed that increased circulating Gr1^{low} monocyte population is associated with an increased M2 ATM population, an increased tissue repair function and higher insulin sensitivity.

Both M1 and M2 AT macrophages derive from blood monocytes^{34 24}. Recently, a study analyzing the monocytes recruitment following heart infraction showed that in this model, M1 macrophages derived from Gr1^{high} monocytes, whereas M2 macrophages derived from Gr1^{low} monocytes¹⁵. Furthermore, the recruitment of Gr1^{low} monocytes in this model was dependent of CX3CR1, whereas the one of Gr1^{high} monocytes was dependent of CCR2. These data allowed us to propose the following model: Gr1^{low} monocytes defect, as observed in CX3CR1 deficient mice, is responsible for a decreased M2 macrophages population in AT. As a consequence, under HFD, it leads to a stronger inflammation of AT and therefore, promotes insulin-resistance.

As well as for insulin-resistance, this study stresses a crucial role for Gr1^{low} monocytes in the weight gain during HFD. The transfer of CX3CR1 KI bone marrow in WT irradiated mice experiments clearly demonstrated that a hematopoietic defect influences weight gain during HFD. Moreover, the striking correlation we showed between the circulating Gr1^{low} monocytes proportion and the body weight confirmed a role for Gr1^{low} monocytes in weight gain and obese adipose tissue expansion. Consistently, the CD11c-hBcl2 driven Gr1^{low}

monocyte subset rescue in CX3CR1 deficient background totally restores the body weight, although CD11c-hBcl2 expression in WT mice has no impact on this parameter. The mechanistic role involving blood monocytes in weight gain is still poorly understood and necessitates further studies. We showed that CX3CR1 deficiency led to a decreased adipose tissue weight and to a lower percentage of fat mass in mice which indicates that adipose tissue development is impaired in CX3CR1 deficient mice fed a HFD. As insulin-resistance state, the defect in fat mass could be related to the increased inflammation of adipose tissue. Indeed, it has been shown that during weight gain in mice, an inflammatory peak is associated with a decrease of peri-gonadic fat pad weight³⁵. Moreover, inflammation has been reported to decrease adipogenesis³⁶. Therefore, the M2 macrophage defect and the associated increased inflammation of AT could be responsible for the defect in weight gain observed in CX3CR1 deficient mice.

In CX3CR1 deficient mice, ATM populations were strongly altered compared to control during HFD. Indeed, in addition to M1 and M2 macrophages, two newly described ATM populations were also modified in mice CX3CR1 KI^{37 34 38}. We observed a threefold increase of a macrophage population negative for CD11c and Mgl1 (called M3), and oppositely, a decrease of macrophage population positive for CD11c and Mgl1 (called M1b) (Sup Fig 2B and C). The functions of these two macrophage populations are still unknown but they both express pro and anti-inflammatory genes, with a majority of M2 genes for M1b population^{37 34}. This data demonstrate a new role for CX3CR1 in supporting M1b macrophage population in obese AT. It is therefore tempting to speculate that Gr1^{low} monocytes differentiate in M1b macrophages in obese AT. Overall, in DIO, the global change of ATM population induced by CX3CR1 deficiency led to a defect in anti inflammatory macrophage function. This observation supports the hypothesis that Gr1^{low} monocytes give rise to anti inflammatory ATM subsets.

In the present study, it is interesting to note that the decreased body weight in CX3CR1 KI mice as well as in recipients of CX3CR1 KI BM mice was observed lately, after 18 weeks of HFD. Similarly, when we studied insulin resistance with GTT and ITT before 18 weeks of diet, we did not find any difference between the 2 phenotypes (data not shown). Recently, Strissel et al. demonstrated in a kinetic study, that inflammation of AT was increasing during the first 16 weeks of HFD, and decreasing on later time points⁽³⁵⁾. Hence, it is tempting to speculate that, as in heart infraction model, during DIO, Gr1^{low} monocytes colonize adipose tissue at late time point to differentiate in M2 macrophages and down-modulate inflammation. This hypothesis would explain the late appearance of weight and insulin resistance phenotype in CX3CR1 deficient mice.

Low grade inflammation is a key event in the physiopathology associated with obesity. Understanding the relative role of the different monocyte subsets in the induction of this meta-inflammation is crucial to better understand the development of the metabolic alteration linked to obesity. Our study put forward that the selective modulation of one or the other monocyte population could represent a new therapeutic challenge.

Materials and Methods

Animals and animal care

CX3CR1 KI mice were a gift from Dr. Aucouturier. Littermate female CX3CR1 KI and WT controls on a C57BL/6 background were housed 4 per cage and were maintained under specific pathogen-free conditions on a 12-h light/dark cycle. Mice were fed either a normal chow diet either a HFD with 40% or 60% of Kcal from fat starting at 6-8 weeks of age for 30 weeks or indicated time. CD11c-hBcl2 mice were generated in our laboratory by E. Gautier³⁹. For bone marrow transplantation, female mice on a C57BL/6 background were obtained from the Janvier Laboratories. Mice were subjected to medullar aplasia with 9 Gray lethal total body irradiation. The next day, femora bone marrow was isolated from donors CX3CR1 KI, CD11c-hBcl2, CD11c-hBcl2/CX3CR1 KI or C57BL/6 mice and 6×10^6 bone marrow cells were i.v injected into the irradiated mice to rescue their hematopoietic system. Mice were housed in cages under air-filtered conditions with antibiotics in water (pénicilline 100 U/ml + streptomycine 100 µg/ml) for 5 weeks. They were then placed on HFD with 60% of Kcal from fat. All animal procedures were performed with accreditation from the French government and under strict compliance with Animal Welfare Regulations.

Flow cytometry

For blood cells analyses, cells were resuspended in PBS containing 1% BSA and incubated 15 min with Fc blocker (Miltenyi) and then 30 min at 4°C with antibodies directed against CD45 (horizonV450, clone 30F11, BD Pharmingen), CD11c (Biotin-PE-Texas Red, clone N418, eBiosciences), CD11b (APC-Cy7, clone M1/70, BD Pharmingen), anti-CMH-II IA/IE (Alexa 700, clone M5:114, eBiosciences), CD115 (PE-YG, AFS98, eBiosciences), mPDCA (APC,

clone JF05-1C2.4.1, Miltenyi), Gr1 (PerCy5.5, clone RB6-8C5, BD Pharmingen), CD8a (PE-Cy5, clone 53-6.7, eBiosciences) for circulating monocytes and dendritic cells. CD45 (horizonV450, clone 30F11, BD Pharmingen), CD3 (Biotin-PE-Texas red, clone 145-2C11, BD Pharmingen), CD4 (FITC, clone RM4-5, eBiosciences), CD44 (PE-Cy5, clone IM7, eBiosciences), FR4 APC (clone 12A5, BD Pharmingen), CD62-L Alexa 700 (clone MEL-14, BD Pharmingen) for circulating lymphocytes. CD45-horizonV450 (clone 30F11, BD Pharmingen), NK1.1 (biotin-streptavidine-PC5, clone PK136, eBiosciences) for circulating NK. Erythrocytes were lysed with Optilyse C (Beckman Coulter). Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde. For analyze of adipose tissue stromal vascular fraction (SVF), peri-ovarian fat pads were excised and minced in PBS. Tissue suspension was incubated with collagenase D (Roche) at 2.5mg/ml at 37° C for 1 hour with shaking. After digestion, adipose tissue cells suspensions were spun at 200 G for 10 minutes to separate floating adipocytes to SVF pellet. The cell suspension was filtered throught a 100µm filter and then spun at 700 G for 5 minutes. Then, cells were resuspended in PBS containing 1% BSA and pre-incubated 15 min with Fc blocker (Miltenyi) and 30 min at 4°C with antibodies directed against CD45 (horizonV450, clone 30F11, BD Pharmingen), F4/80 (PE-Cy5, clone BM8, eBiosciences), CD11c (PE-Cy7, clone HL3, BD Pharmingen), CD11b (APC-Cy7, clone M1/70, BD Pharmingen), anti-CMH-II IA/IE (Alexa 700, clone M5:114, eBiosciences), Mgl-1 (CD301) (Biotin-PE-Texas Red, clone ER-MP23, Serotec). Erythrocytes were lysed with Optilyse C (Beckman Coulter). The cells were then fixed with 2% paraformaldehyde. Data were acquired on LSRFortessa cell analyzer (Becton, Dickinson) and analyzed with FACSDiva Software.

Metabolic evaluation

Glucose tolerance tests were performed after IP injection of 1mg/g body dextrose after overnight fast. Glucose measurements were made with a glucometer (One Touch®, Lifescan). Insulin tolerance tests were performed after IP injection of 1.5 mUI/g body insulin after overnight fast (Actrapid®, Novo Nordisk). Homeostasis model assessment (HOMA) of insulin resistance was calculated by multiplying fasting insulin levels by fasting glucose levels divided by 22.5. Plasma insulin levels were evaluated with Ultrasensitive mouse Insulin ELISA (Mercodia).

Analysis of adipose tissue gene expression by Real-time Q-PCR

RNA extraction from 100 mg sample of peri-ovarian adipose tissue was performed with a RNeasy® Lipid Tissue Mini kit (QIAGEN). Each RNA preparation was hybridized with random hexamer (Promega) and reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was done with SensiMixPlus SYBR (Bioline). HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) and RPS3 (Ribosomal Protein S3) were used as housekeeping gene to account for variability in the initial quantities of cDNA. In all PCR assays and for each primer set, expression of a control cDNA (pool of reverse transcribed-RNA prepared from different mouse tissues) was included and used as an inter-run calibrator. Expression data were based on the crossing points calculated from LightCycler data analysis software and corrected for PCR efficiencies of both the target and the reference genes.

Plasma lipid analyses

Blood samples were collected at sacrifice following an overnight fast in Microvette tubes (Sarstedt) by retro-orbital bleeding under isoflurane anaesthesia (isoflurane (1.5%)/oxygen (0.4 L/min.)). Triglyceride (Biomérieux) and Non Esterified Free fatty Acids concentrations were measured by enzymatic colorimetric assays using an automatic system (Konelab).

Statistical analysis

Data are represented as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using Prism software (Graphpad). The statistical significance of the differences between groups was evaluated using the Mann-Whitney *U* test for unpaired comparisons. A difference was considered statistically significant when $P < 0.05$. The relation between Gr1^{low} circulating monocytes and bodyweight or HOMA-R was determined with a simple linear regression analysis.

Figures legends

Figure 1: Gr1^{low} monocytes are increased in DIO and the integrin CD11c is highly up-regulated on Gr1^{low} monocytes during HFD in C57BL/6 mice

(A) The frequency of monocytes was determined by flow cytometry in C57BL/6 female mice fed a standard chow (Chow) diet (white histograms) or a HFD containing 60 % kcal (black histograms) from fat for 30 weeks, based on the cell expression of CD45, CD11b and CD115. **, p<0.001. n =6 mice in Chow diet and n= 12 mice in HFD. (B) and (C) The relative frequencies of the 2 subsets of blood monocytes Gr1^{low} and Gr1^{high}, in percentage of leucocytes (CD45⁺)(B) or of monocytes (C). *, p<0.05. **, p<0.01. (D) Ratio of Gr1^{low} monocytes / Gr1^{high} monocytes. (E) and (F) Dot plots of the CD11c integrin expression on the cell surface of Gr1^{low} and Gr1^{high} monocytes in chow diet (E) and HFD (F). Histograms show the mean values (\pm SD).

Figure 2: Gr1^{low} monocytes are decreased in CX3CR1 KI HFD-fed mice

(A) The frequency of monocytes was determined in C57Bl6 or CX3CR1-KI female mice fed a standard chow diet (white histograms) or a HFD containing 60 % kcal from fat (black histograms) for 30 weeks, as in Figure 1. **, p<0.01. n =9 mice in C57Bl6 and n= 12 CX3CR1 KI. (B) and (C) The relative frequencies of the 2 subsets of blood monocytes Gr1^{low} and Gr1^{high}, in percentage of leucocytes (CD45⁺)(B) or of monocytes (C). *, p<0.05. **, p<0.01. (D) Ratio of Gr1^{low} monocytes / Gr1^{high} monocytes. Plots show the mean values (\pm SD).

Figure 3: CX3CR1 deficiency impacts on body weight gain and insulin-sensitivity in mice fed a high fat diet

(A) Weight gain in CX3CR1 KI mice and control. Mice were fed a diet of 40 % kcal from fat until 18 weeks of DIO and a diet of 60 % kcal from fat after 18 weeks. *, p<0.05. n =10 CX3CR1 KI and 6 controls. (B) Adipose tissue weights in CX3CR1-KI and control mice fed 30 weeks with the HFD described in A. (C) and (D) Plasma glucose during Glucose tolerance test (GTT) (C) and Insulin tolerance test (ITT) (D) after 12 hrs fasting at 28 weeks HFD for GTT (C) and 30 weeks HFD for ITT (n=5/4) (D). Plots show the mean values (\pm SD).

Figure 4: The same effect of DIO is observed on mice transferred with bone marrow of CX3CR1 KI mice.

(A) The frequency of monocytes was determined as described in Fig1 in CX3CR1 KI donor mice (black histograms) and WT donor mice (white histograms) fed a HFD containing 60 %

kcal from fat for 22 weeks. **, $p < 0.01$. ***, $p < 0.001$. $n = 12$ C57Bl6 donors and $n = 11$ CX3CR1 KI donors. **(B-D)** Relative frequencies of the 2 subsets of blood monocytes Gr1^{low} and Gr1^{high}, in percentage of leucocytes (CD45⁺) **(B)** or of monocytes **(C)** and the ratio of Gr1^{low} / Gr1^{high} monocytes **(D)** are shown. **(E)** Weight gain in CX3CR1 KI donor mice and WT donor mice fed a diet of 60 % kcal. *, $p < 0.05$. $n = 11$ CX3CR1 KI donor and 12 WT donor. **(F)** Adipose tissue weights in mice fed a HFD 22 weeks. **(G)** Percentage of AT weight over total weight in mice described in **F**. **(H)** Plasma glucose during GTT after 12 hrs fasting at 40 weeks HFD 40%. $n = 8$ CX3CR1 KI donor and 7 WT donor matched to the weight. **(I)** Nonesterified FFA levels (NEFA). Fasting serum were collected and NEFA were measured in mice fed a HFD for 22 weeks, ***, $p < 0.001$. $n = 11$ CX3CR1 KI donor and 10 WT donor. Plots show the mean values (\pm SD). **(J)** Correlation between bodyweight and the rate of circulating Gr1^{low} monocytes (%CD45) in recipients of CX3CR1 KI and controls BM fed a HFD for 22 weeks ($r^2 = 0.4$, $p < 0.0001$, $n = 32$ mice). **(K)** Correlation between insulin resistance evaluated with HOMA-R indice and the rate of circulating Gr1^{low} monocytes in mice treated as in **J** (%CD45) ($r^2 = 0.33$, $p = 0.018$).

Figure 5: Characterization of adipose tissue macrophage in CX3CR1 KI fed a HFD

(A) Dot plots of macrophages (F4/80⁺ CD11b⁺ CD45⁺ cells) in adipose tissue in CX3CR1 KI and control mice fed a diet of 60 % kcal from fat for 30 weeks. **(B)** Histograms represent ATM content assessed by flow cytometry in CX3CR1 KI mice ($n = 9$) and WT controls ($n = 8$) treated as in **A**. **(C)** and **(D)** Characterization of M1 macrophages based on the cell surface expression of CD11c⁺ Mgl1^{neg} **(C)** and M2 macrophages based on the cell surface expression of CD11c^{neg} Mgl1⁺ **(D)**. **(E)** Ratio of M2 / M1 macrophages in mice described in **B**. Plots show the mean values (\pm SD). **(F)** The indicated M1 and M2 genes mRNA concentrations were analyzed by Real time Q PCR in adipose tissue from mice described in **A** ($n = 4$ control and 4 CX3CR1-KI mice, representative of 2 independent experiments) Plots show the mean values (\pm SD).

Figure 6: Bcl2 expression in CD11c+ cells increases Gr1^{low} monocytes level and insulin sensitivity in DIO conditions.

(A) Blood monocytes levels characterized as in figure 1 in irradiated C57Bl6 mice recipients of WT (white histograms, $n = 8$) or transgenic CD11c-hBcl2 BM cells (grey histograms, $n = 9$) fed a chow diet or a HFD for 22 weeks. **(B)** Relative frequencies of the 2 subsets of blood monocytes Gr1^{low} and Gr1^{high} in mice described in **A**. **(C)** Histogram shows the ratio Gr1^{low} / Gr1^{high} monocytes in mice described in **A-C**. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$. ***, $p < 0.001$ Plots show the mean values (\pm SD). **(D)** Weight gain in irradiated C57Bl6 mice transferred with Tg CD11c-hBcl2 BM cells (grey) or with wt BM cells (white). Mice fed a diet of 60 % kcal from fat. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$. $n = 10$ Tg CD11c-hBcl2 and 10 controls. **(E)** Plasma glucose during ITT in mice described in **D** fed a HFD for 17 weeks and after 12 hrs fasting ($n = 6/6$). **(F)** Fasting serum from mice described in **D** fed a HFD 22 weeks were collected and triglycerides

(upper panel) and NEFA (lower panel) were measured, *, $p < 0.05$. $n = 10$ Tg CD11c-hBcl2 and 10 controls. **(G)** Histograms represent ATM content assessed by flow cytometry in mice treated as in **F**. **(H)** and **(I)** Characterization of M1 macrophages based on the cell surface expression of CD11c⁺ Mgl1^{neg} **(H)** and M2 macrophages based on the cell surface expression of CD11c^{neg} Mgl1⁺ **(I)**. **(J)** Ratio of M2 / M1 macrophages in mice described in **F**. Plots show the mean values (\pm SD). **(F)** The indicated M1 and M2 genes mRNA concentrations were analyzed by Real time Q PCR in adipose tissue from mice described in **A** ($n = 10$ control and 7 CD11c-hBcl2 transgenic mice). Plots show the mean values (\pm SD).

Figure 7 Expression of hBcl2 in Gr1^{low} monocytes partially rescue the ratio Gr1^{low}/Gr1^{high} and totally rescue the weight loss in CX3CR1 deficient mice in HFD conditions.

(A) Histogram shows the proportion of Gr1^{low} monocytes on total blood monocytes in irradiated C57Bl6 mice transferred with WT BM cells (white) or CX3CR1 KI BM cells (black) or CX3CR1 KI-CD11c-hBcl2 Tg BM cells (grey) fed a HFD for 22 weeks (60 % kcal from fat). *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$. ***, $p < 0.001$. ($n = 10$ wt, 10 CX3CR1 KI and 10 CX3CR1 KI-CD11c-hBcl2 Tg). Plots show the mean values (\pm SD). **(B)** Histogram shows the ratio Gr1^{low} / Gr1^{high} monocytes in mice described in **A**. **(C-D)** the Weight gain **(C)** and weights at 22 weeks of HFD **(D)** in mice treated as in **A**. **(E)** Correlation between insulin resistance evaluated with HOMA-R indice and the rate of circulating Gr1^{low} monocytes in mice recipients transferred with WT BM cells or CX3CR1 KI BM cells, or CD11c-hBcl2 Tg BM cells or CX3CR1 KI-CD11c-hBcl2 Tg BM cells and fed a HFD for 22 weeks (%CD45) ($n = 5$ C57Bl6, $n = 8$ CX3CR1 KI, $n = 8$ CD11c-hBcl2, $n = 9$ CD11c-hBcl2-CX3CR1 KI ($r^2 = 0.24$, $p = 0.0059$)).

References

1. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2011;121:2111-7.
2. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444:860-7.
3. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-46.
4. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011;121:2094-101.
5. Dalmas E, Clement K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2011;32:307-14.
6. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821-30.
7. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007;132:2169-80.
8. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117:175-84.
9. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:762-74.
10. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19:71-82.
11. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327:656-61.
12. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009.
13. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317:666-70.
14. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 2007;117:185-94.
15. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204:3037-47.
16. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood.* 2009;113:963-72.
17. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, Mallat Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation.* 2008;117:1649-57.
18. Poitou C, Dalmas E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdennour M, Kahn JF, Veyrie N, Rizkalla S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Clement K, Cremer I. CD14dimCD16+ and CD14+CD16+ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2322-30.

19. Rogacev KS, Ulrich C, Blomer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Kohler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010;31:369-76.
20. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010;33:375-86.
21. Westcott DJ, Delproposto JB, Geletka LM, Wang T, Singer K, Saltiel AR, Lumeng CN. MGL1 promotes adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating 7/4hi monocytes in obesity. *J Exp Med.* 2009;206:3143-56.
22. Wu H, Perrard XD, Wang Q, Perrard JL, Polsani VR, Jones PH, Smith CW, Ballantyne CM. CD11c expression in adipose tissue and blood and its role in diet-induced obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:186-92.
23. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007;117:902-9.
24. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes.* 2007;56:16-23.
25. Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, Nahrendorf M. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardio* 2010;55:1629-38.
26. Sirois-Gagnon D, Chamberland A, Perron S, Brisson D, Gaudet D, Laprise C. Association of common polymorphisms in the fractalkine receptor (CX3CR1) with obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19:222-7.
27. Shah R, Hinkle CC, Ferguson JF, Mehta NN, Li M, Qu L, Lu Y, Putt ME, Ahima RS, Reilly MP. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 2011;60:1512-8.
28. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-30.
29. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 1998;273:23799-804.
30. Nishiyori A, Minami M, Ohtani Y, Takami S, Yamamoto J, Kawaguchi N, Kume T, Akaike A, Satoh M. Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Lett.* 1998;429:167-72.
31. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 2000;20:4106-14.
32. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 2005;307:254-8.
33. Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol.* 2007;178:2000-7.
34. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes.* 2010;59:1171-81.
35. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes.* 2007;56:2910-8.

36. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*. 2007;148:868-77.
37. Zeyda M, Gollinger K, Kriehuber E, Kiefer FW, Neuhofer A, Stulnig TM. Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34:1684-94.
38. Morris DL, Singer K, Lumeng CN. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14:341-6.
39. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Pirault J, Deswaerte V, Ginhoux F, E.R. M, Witztum JL, Chapman MJ, Lesnik P. Conventional Dendritic Cells at the Crossroads between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis. *Circulation*. 2009;119 accepted February 2009.

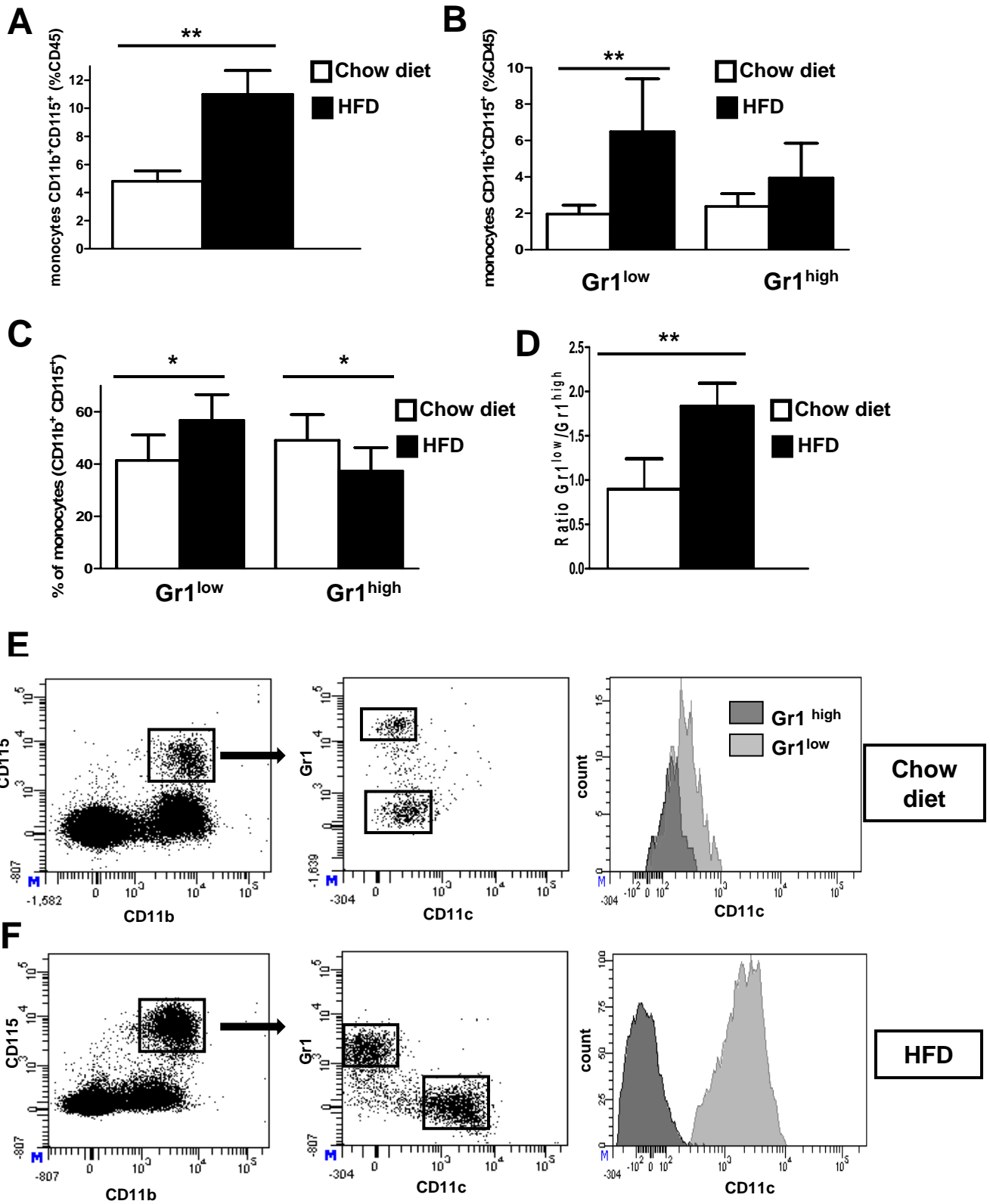


Figure 1

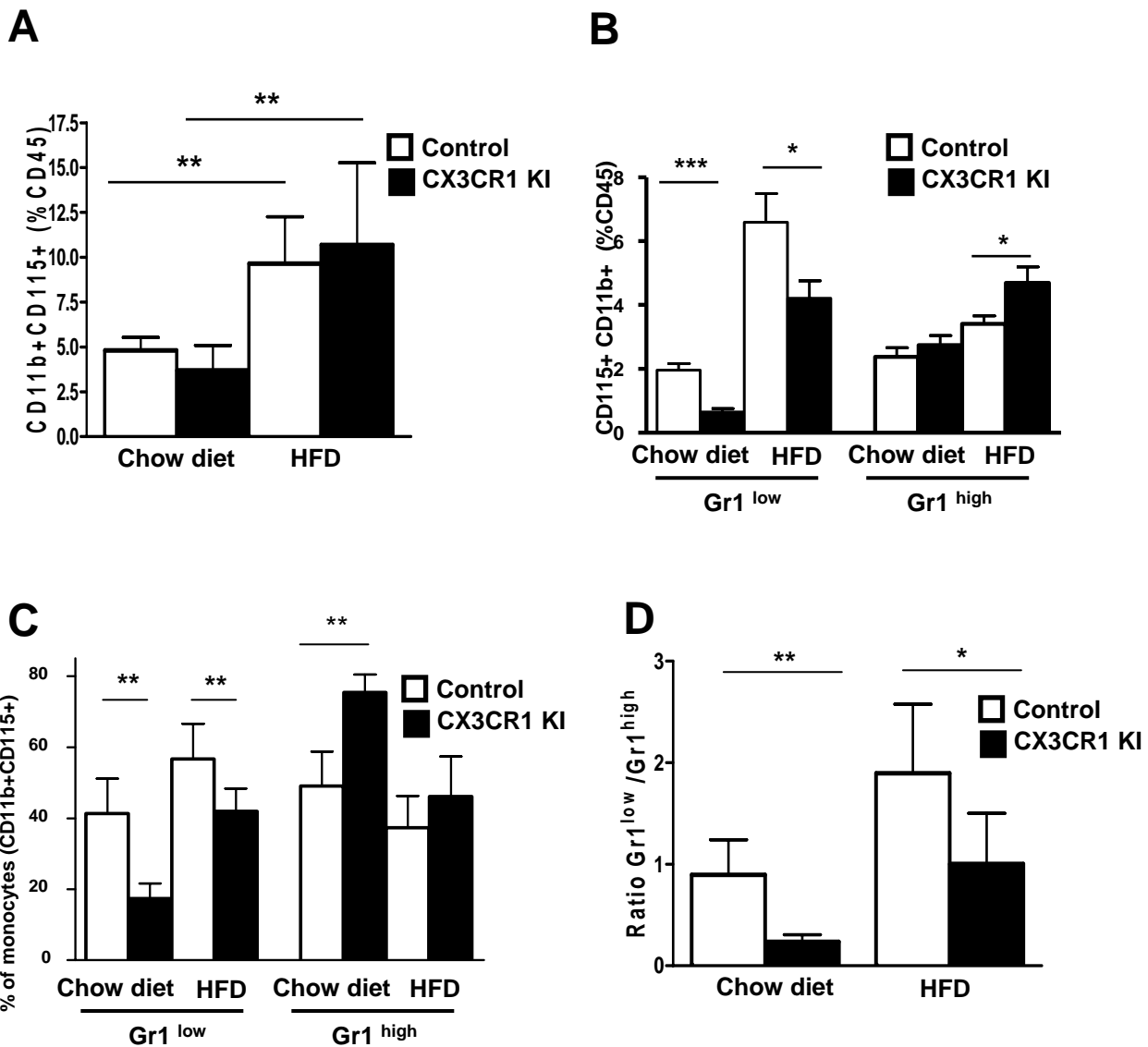


Figure 2

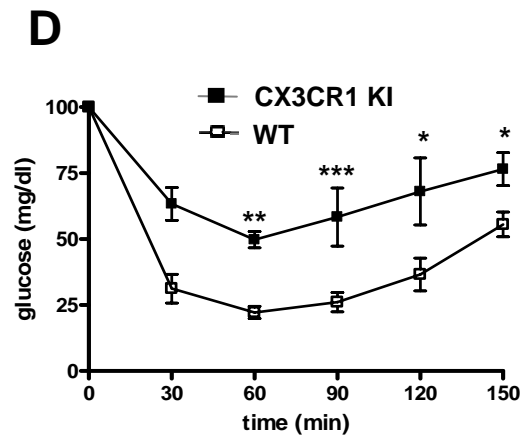
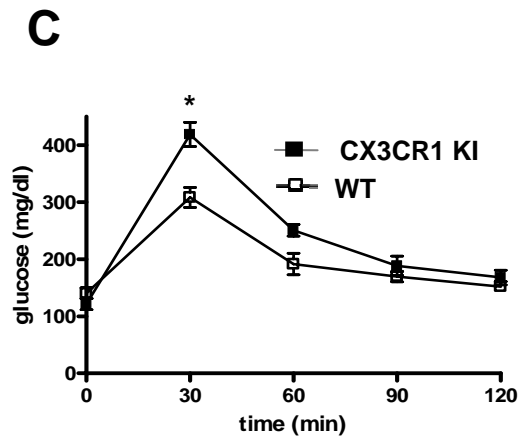
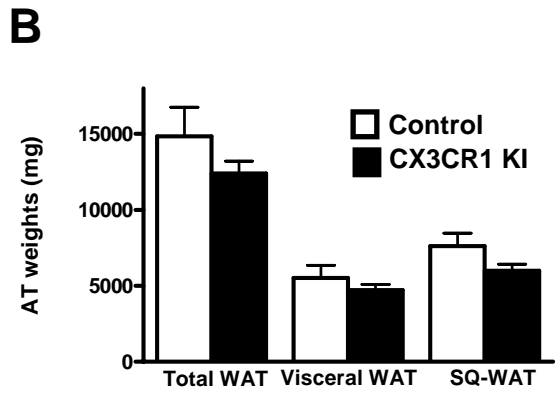
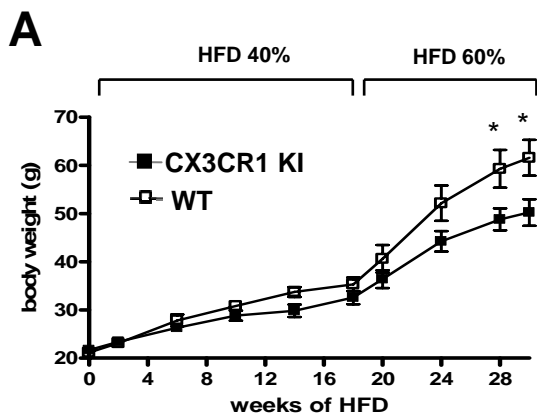


Figure 3

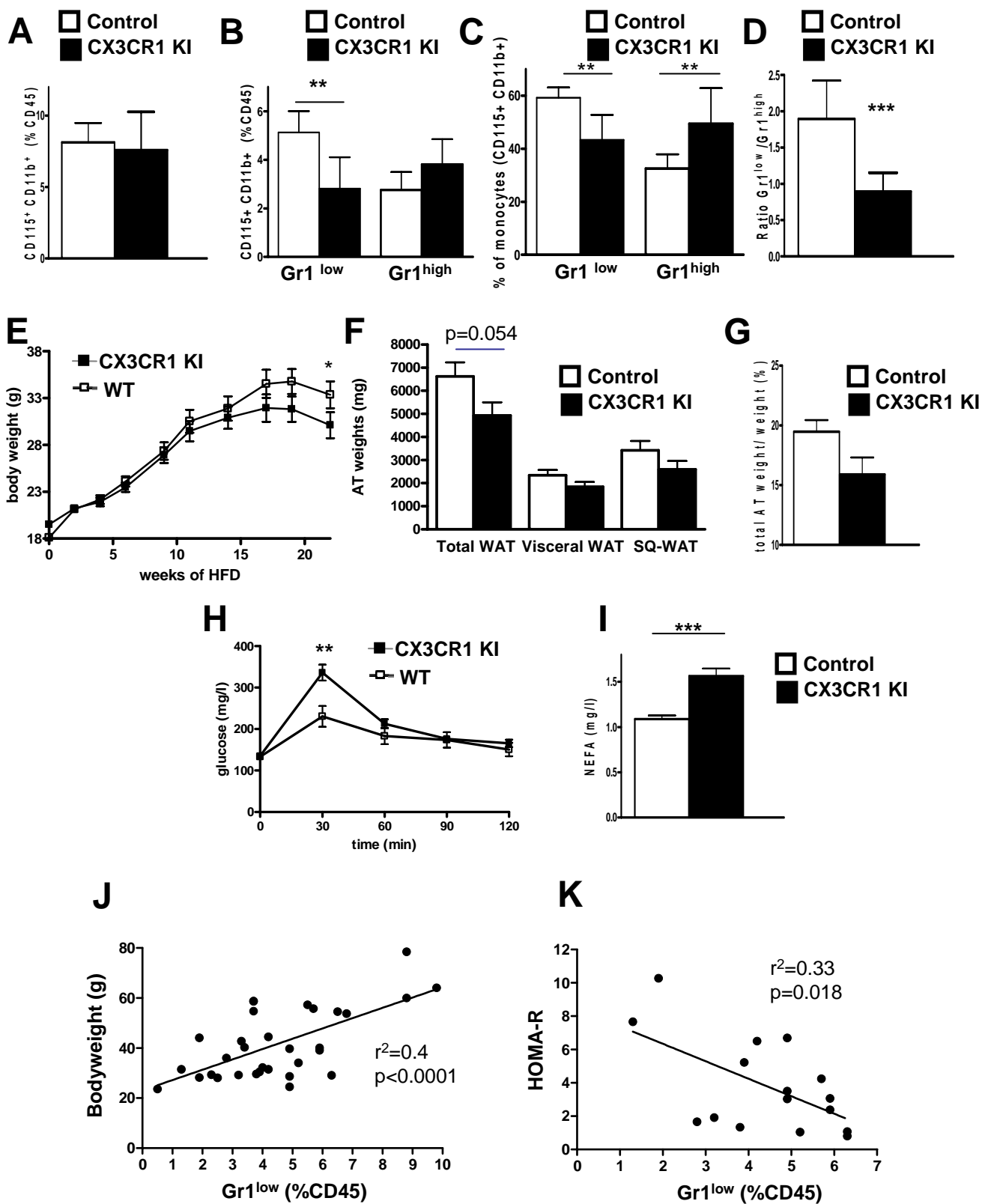


Figure 4

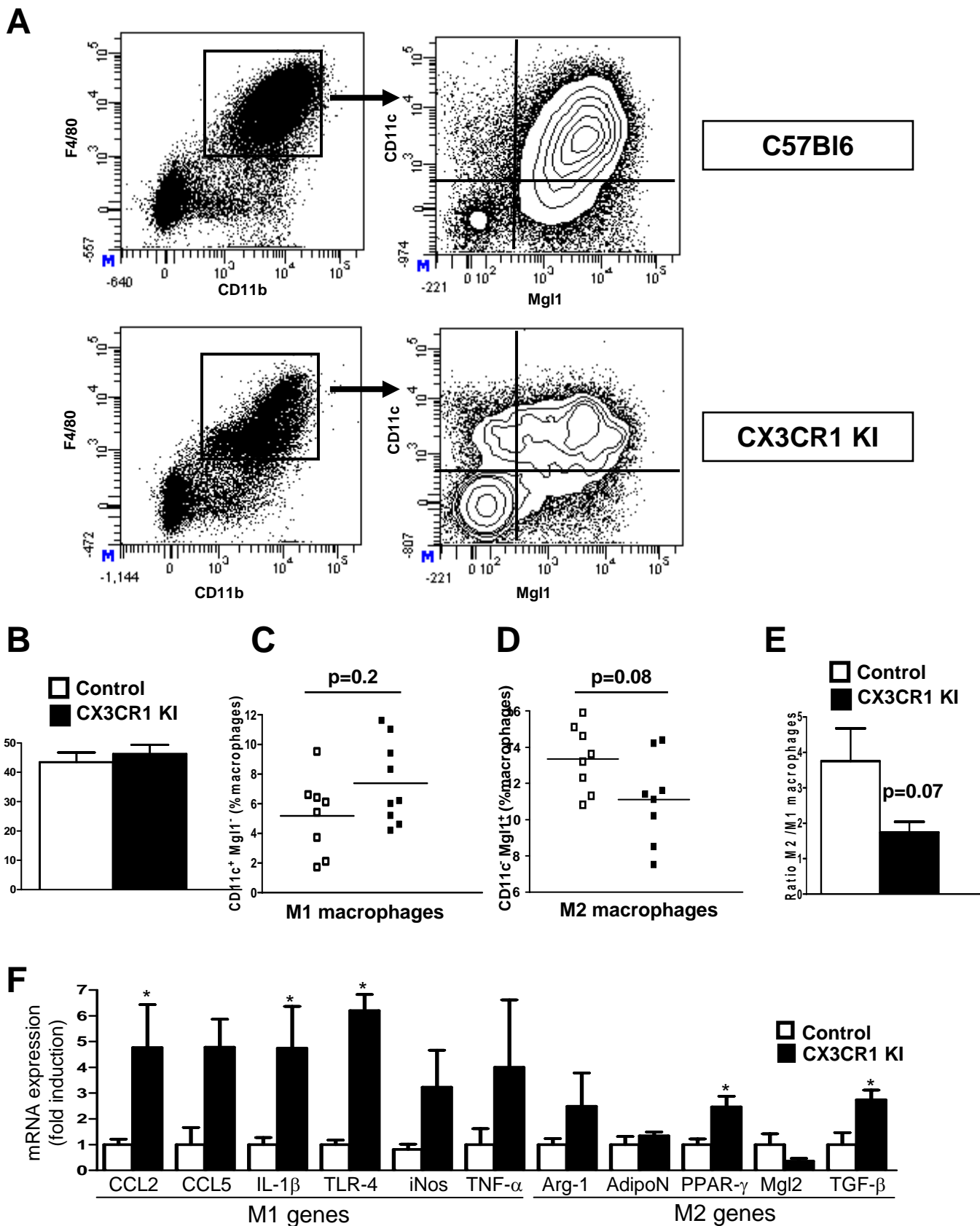


Figure 5

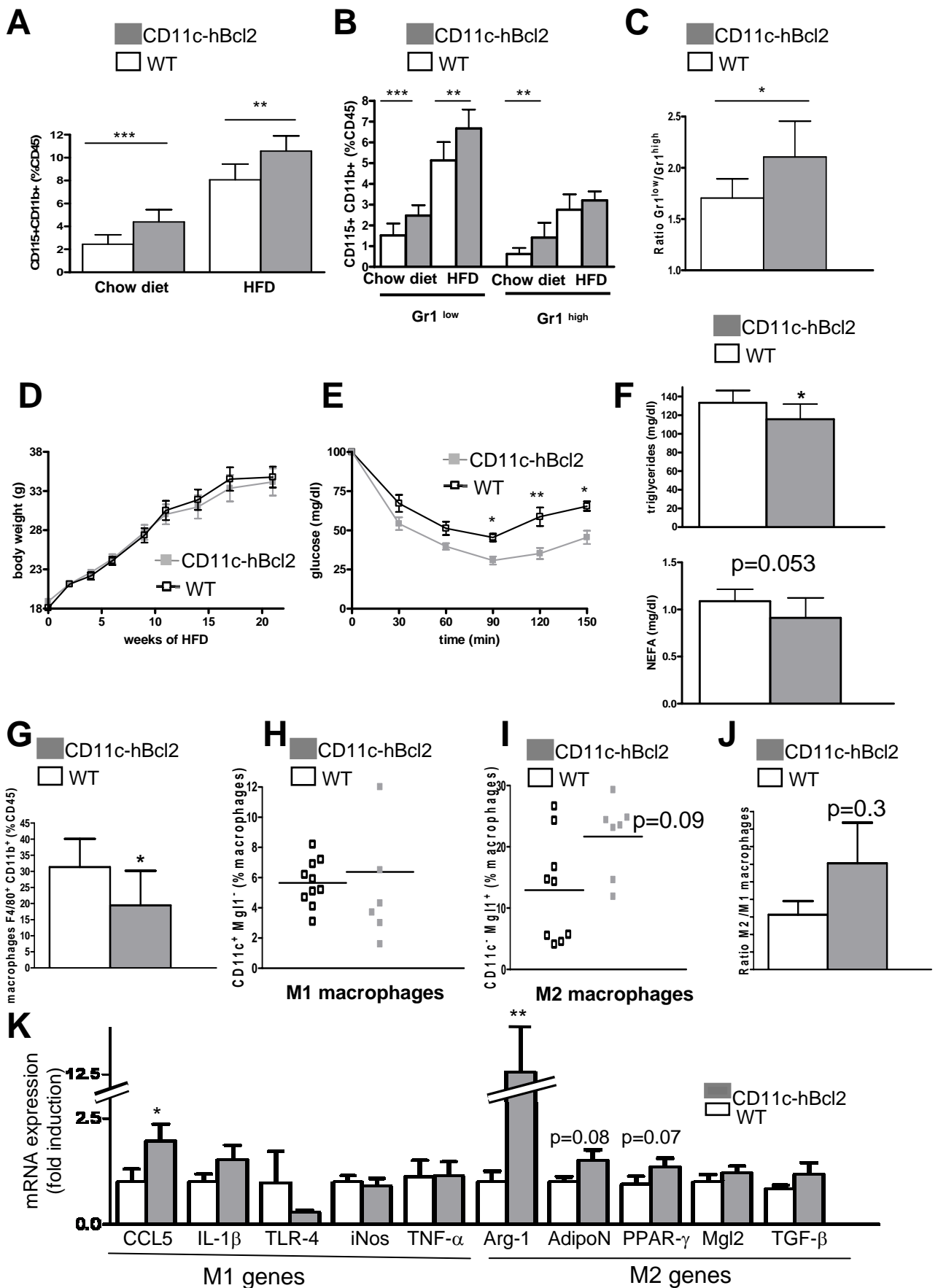


Figure 6

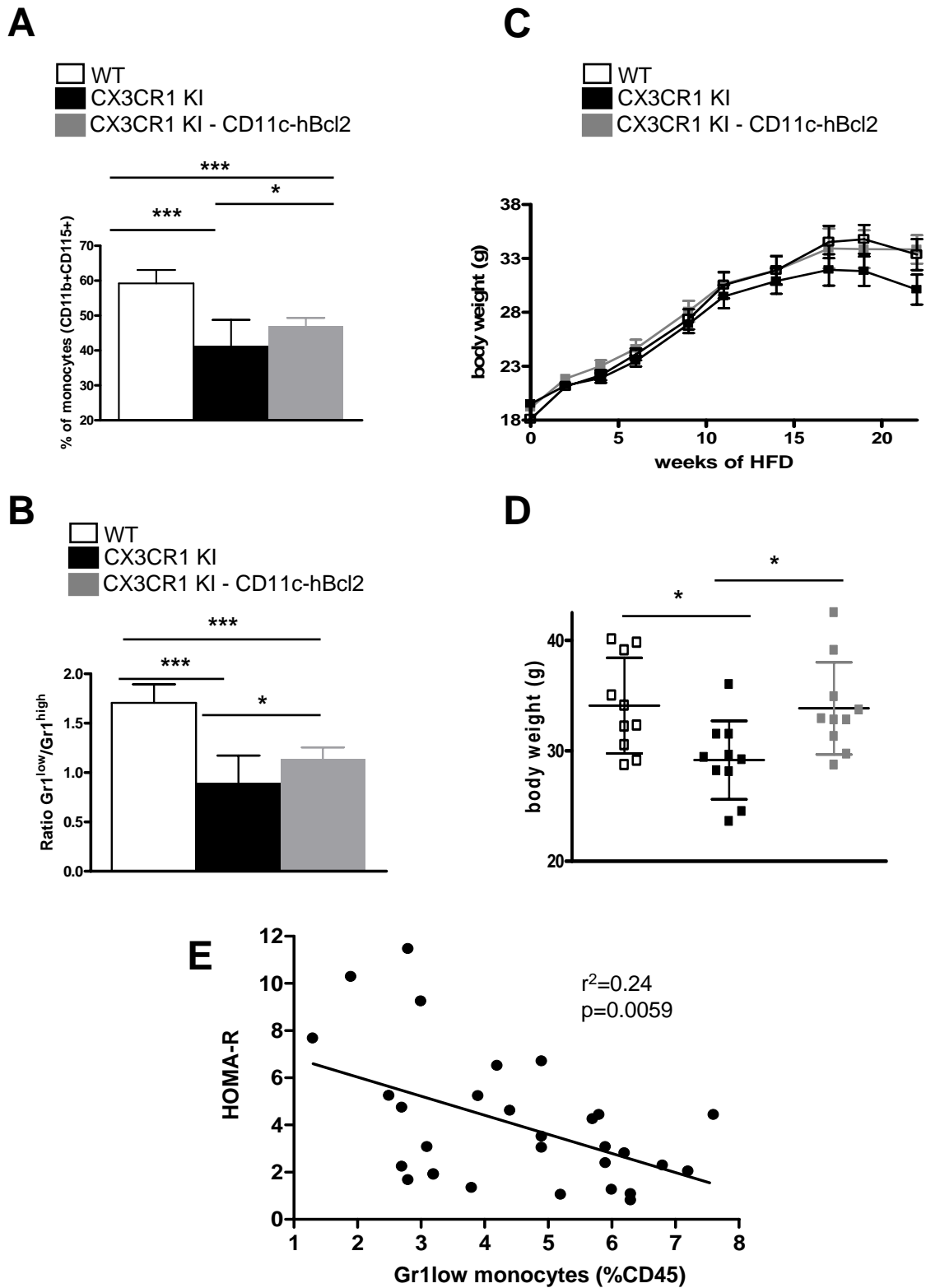
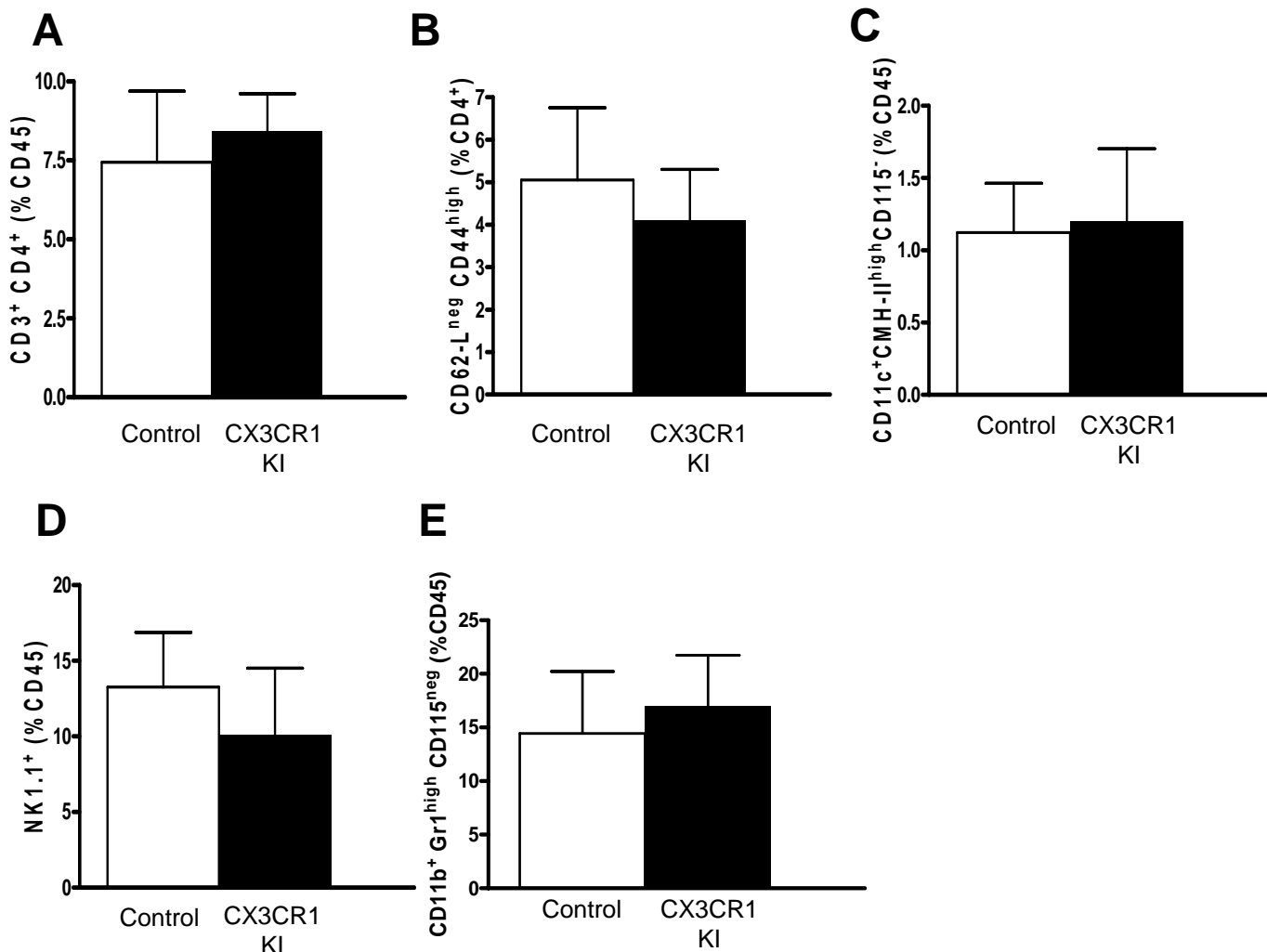
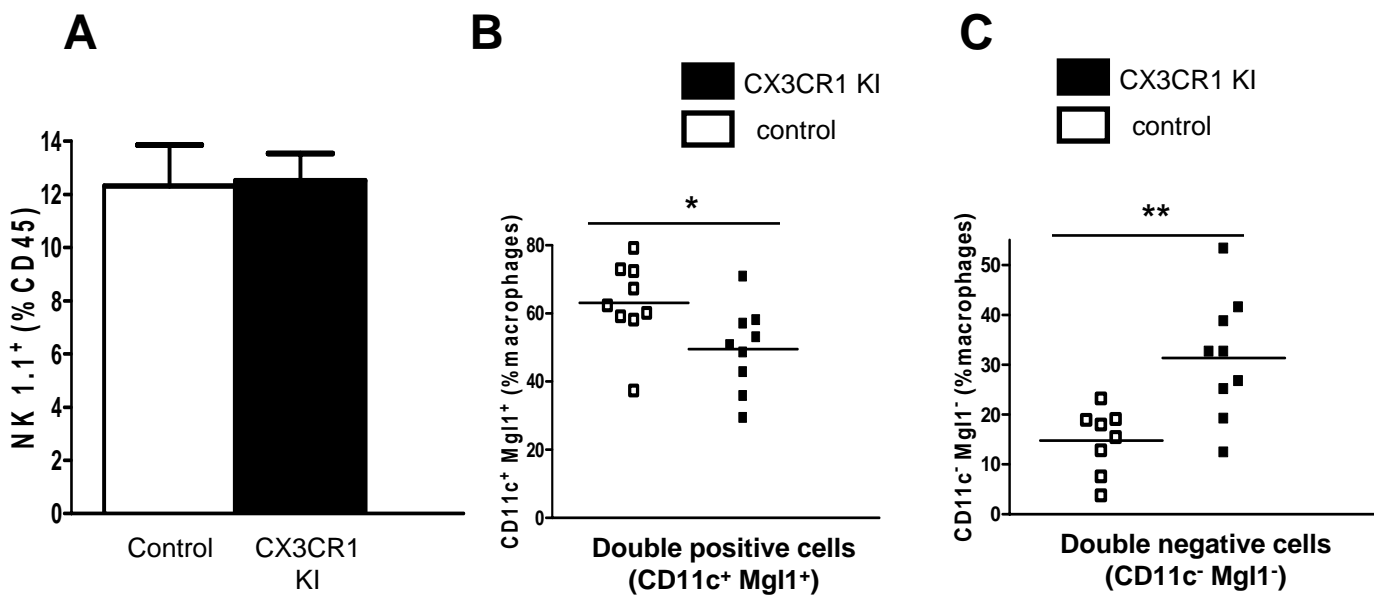


Figure 7



Supplementary Figure 1 : Other circulating cells in CX3CR1 KI mice (CD4⁺, activated CD4⁺, NK, dendritic cells and neutrophils)

(A) The frequency of T lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺) was determined by flow cytometry in C57Bl6 (white histograms) or CX3CR1-KI mice (black histograms) fed a HFD containing 60 % kcal from fat for 30 weeks, as in Figure 1. **, p<0.01. n =9 mice in C57Bl6 and n= 12 CX3CR1 KI. (B) The frequency of activated T lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺, CD62⁻ and CD44^{high}) was determined in the same mice than in A. (C) The frequency of circulating dendritic cells (CD11c⁺, CMH-II⁺, and CD115⁻) was determined in the same mice than in A. (D) The frequency of circulating NK cells (NK1.1⁺, CD45⁺) was determined in the same mice than in A. (E) The frequency of circulating neutrophils (CD11b⁺, Gr1⁺ and CD115⁻) was determined in the same mice than in A. Plots show the mean values (±SD).



Supplementary Figure 2: NK and newly described macrophage populations in CX3CR1 KI and control mice adipose tissue.

(A) The frequency of adipose tissue NK cells (NK1.1⁺, CD45⁺) was determined by flow cytometry in CX3CR1 KI and control mice fed a HFD containing 60 % kcal from fat for 30 weeks. (B) The frequency of adipose tissue CD11c⁺, Mgl1⁺ double positive macrophages was determined as in A. (C) The frequency of adipose tissue CD11c⁻, Mgl1⁻ double negative macrophages was determined as in A.

Résultats supplémentaires :

I STATUT INFLAMMATOIRE DES AUTRES ORGANES IMPLIQUES DANS L'INSULINORESISTANCE

Le foie et le muscle sont deux organes clés dans la réponse à l'insuline. Afin de déterminer si les différences d'insulinorésistance systémique observées entre les souris CX3CR1 KI et les contrôles ainsi qu'entre les souris CD11c-hBcl2 et les contrôles étaient secondaires à des modifications du tissu adipeux, ou bien si d'autres organes étaient impliqués, nous avons étudié le foie et le muscle des souris sous régime riche en graisses.

A Le foie

L'étude d'expression de gènes pro et anti-inflammatoires du foie des souris CX3CR1 KI montre que l'expression des gènes codant pour CCL5 (Rantes) et pour l'IFN- γ est diminuée dans le foie des souris CX3CR1 KI comparées au contrôles (figure 1 A). CCL5 est impliqué dans le chimiotactisme des leucocytes (lymphocytes, monocytes, éosinophiles, basophiles). L'IFN- γ est sécrété par les NK et les cellules T et participe à la polarisation des macrophages en macrophages M1 pro-inflammatoires et à l'orientation de la réponse immunitaire de type Th1. Leur baisse d'expression est en faveur d'une diminution de l'inflammation du foie des souris CX3CR1 KI. Par contre, l'expression du récepteur CCR2 est augmentée par 3 chez les souris CX3CR1 KI par rapport aux souris contrôles, ce qui pourrait être secondaire à une augmentation du pourcentage de monocytes/macrophages Gr1^{high} du foie (figure 1 B). Néanmoins, une analyse par cytométrie révèle que le pourcentage des macrophages et des cellules dendritiques du foie (en pourcentage des leucocytes) des souris CX3CR1 KI et des souris CD11c-hBcl2 sous régime riche en graisses est inchangé entre les 2 génotypes (figure 1 B). De façon très intéressante, l'expression du gène PPAR- γ est très augmentée dans le foie

des souris CX3CR1 KI, mais aussi dans le tissu adipeux et le muscle de ces souris. Or PPAR- γ est un régulateur important de l'insulinosensibilité et de la différenciation adipocytaire. Ces résultats sont en faveur d'un rôle inhibiteur de la voie CX3CR1-fractalkine sur le récepteur nucléaire PPAR- γ . L'ensemble de ces données montrent 1) Qu'il semble exister une baisse de l'inflammation hépatique chez les souris déficientes pour CX3CR1. Cette donnée suggère que l'augmentation des monocytes Gr1^{low} est plus importante pour contrôler l'inflammation du tissu adipeux, et non du foie des souris obèses. 2) Que l'effet inhibiteur de la voie CX3CR1-fractalkine sur PPAR- γ met en lumière la multiplicité des rôles de cette voie et peut expliquer en partie la complexité du phénotype des souris déficientes pour CX3CR1.

Chez les souris CD11c-hBcl2, l'analyse de l'expression de gènes montre une augmentation des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 et de la protéine d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) en faveur d'un statut pro-inflammatoire hépatique dans ces modèles animaux (figure 2 A). Cependant le pourcentage de macrophages et de cellules dendritiques mesuré par cytométrie de flux est identique entre les 2 génotypes (figure 2 B). L'expression des gènes des chimiokines CCL5 et fractalkine n'est pas modifiée chez les souris CD11c-hBcl2. L'expression du gène CD80 est multipliée par 600 chez les souris CD11c-hBcl2 en faveur d'une forte activation des cellules dendritiques. Cette activation des DC est décrite également dans la rate de ces souris, probablement en rapport avec l'augmentation de leur survie ¹⁵³. Cependant, dans le foie, le pourcentage des cellules dendritiques examiné en cytométrie de flux est inchangé. Par ailleurs, l'expression du gène PPAR- γ est multipliée par 2 dans le foie des souris CD11c-hBcl2, ainsi que dans le tissu adipeux, mais non significativement ($p=0.07$) et inchangée dans le muscle. L'ensemble de ces résultats est à nouveau en faveur d'un effet métabolique protecteur tissu spécifique (tissu adipeux) des monocytes Gr1^{low}.

B Le muscle

Les souris CX3CR1 KI ont une expression des gènes de la lipoprotéine lipase (LPL) et de PPAR- γ augmentée dans le muscle, en faveur d'une insulinosensibilité musculaire augmentée. Ces résultats mettent en valeur une nouvelle fois la complexité du phénotype des souris déficientes pour CX3CR1 et l'action spécifique des monocytes Gr1^{low} dans le tissu adipeux. Aucune différence n'est retrouvée dans l'expression des gènes pro-inflammatoires du muscle des souris CD11c-hBcl2 en comparaison des contrôles.

Pour conclure, l'insulinorésistance systémique observée chez les souris CX3CR1 KI est associée à une inflammation du tissu adipeux et non du foie ni du muscle. De même, l'insulinosensibilité systémique observée chez les souris CD11c-hBcl2 est associée à une baisse de l'inflammation du tissu adipeux alors que le foie semble au contraire plus inflammatoire et que le statut inflammatoire du muscle ne semble pas modifié. De plus, la voie CX3CR1-fractalkine semble inhiber l'expression du gène du récepteur nucléaire PPAR- γ .

II MISE EN PLACE DE L'ETUDE DU ROLE DE CX3CR1 DANS L'OBESITE

Lorsque j'ai débuté mon stage doctoral en novembre 2007, mon projet initial de travail concernait l'étude du rôle de CX3CR1 dans le recrutement monocytaire, d'une part dans un modèle murin d'athérosclérose (souris déficientes pour le récepteur aux LDL (Low Density Lipoproteins)) et d'autre part dans un modèle murin d'obésité induite par un régime riche en graisse. L'hypothèse initiale de travail était que CX3CR1 était impliqué dans le recrutement monocytaire dans les plaques d'athérome ainsi que dans le tissu adipeux, et par conséquent que la déficience en CX3CR1 serait responsable d'une diminution de l'infiltration des monocytes dans ces tissus et donc d'une diminution de la maladie. Le Dr Lesnik avait déjà

travaillé sur des souris déficientes pour CX3CR1 en fond ApoE^{-/-} et avait démontré une diminution de l'athérosclérose chez les souris CX3CR1 KI⁷³. Cependant, le fond LDL-R^{-/-} constituait un modèle plus physiologique que le fond ApoE^{-/-} car la cholestérolémie et la monocytose sont plus basses. J'ai effectué les croisements murins CX3CR1 et LDL-R^{-/-} mais ce pan du projet a été rapidement stoppé car l'étude sur l'obésité s'est avérée plus complexe qu'initialement prévu et nécessitait un travail à temps plein. J'ai alors choisi de focaliser mon étude sur l'obésité.

A- INFLUENCE DE L'ORIGINE DES SOURIS SUR LES ETUDES SUR L'OBESITE

Lorsque les études d'obésité ont débuté, nous avons complété les groupes de souris contrôles (C57BL6) de notre animalerie avec des souris de même fond génétique C57BL6 mais provenant d'une animalerie extérieure (laboratoire Jackson). Cependant, j'ai pu observer que les souris provenant de l'extérieur prenaient systématiquement moins de poids que les souris provenant de notre animalerie (figure 4). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette différence dans la prise de poids. Le premier est celui de l'impact du métabolisme fœtal et néonatal dans le développement ultérieur de l'obésité¹⁵⁴. Il est actuellement admis que le métabolisme fœtal et néonatal influence le poids et l'insulinorésistance à l'âge adulte. Notamment, chez l'homme comme dans les modèles animaux, les sujets de petit poids de naissance ont un risque plus élevé de développer une obésité à l'âge adulte. Des modifications épigénétiques sont probablement à l'origine de ces anomalies métaboliques¹⁵⁵. Deuxièmement, concernant les animaux, la flore intestinale peut aussi varier selon les animaleries (cf discussion), et peut avoir une influence majeure sur la prise de poids. Au final, ces différences ont eu pour conséquence d'apporter un biais expérimental majeur dans mes

études et m'ont incité à les reprendre depuis le début. Par conséquent, j'ai conduit les études métaboliques ultérieures chez des animaux provenant des mêmes parents.

B- INFLUENCE DE L'EFFET CAGE SUR LES ETUDES SUR L'OBESITE

Par la suite, alors que les différents groupes de souris nécessaires à mon étude était en régime obesogène, j'ai pu observer qu'un autre paramètre expérimental influençait significativement la prise de poids : l'effet cage. En effet, j'ai pu observer que des souris de même génotype avaient une prise de poids significativement différente selon la cage où elles se trouvaient (figure 5). Cet effet est observé entre des cages contenant le même nombre de souris et qui sont voisines (même étagère). Bien que ne connaissant pas la raison exacte de ce phénomène, il apparaît probable que les relations sociales des souris au sein d'une cage et plus particulièrement les rapports de dominance, puissent influencer la prise de poids de l'ensemble des souris d'une même cage. Cette source de variabilité a été délétère dans le déroulement de mon étude. En effet, l'impact de la déficience en CX3CR1 sur la prise de poids étant modéré, cette source de variabilité l'a en partie masqué. Afin de mettre en évidence le rôle de CX3CR1 dans la prise de poids, j'ai dû réaliser mon étude en mélangeant les différents modèles de souris transgéniques dans les mêmes cages. Il a donc été impossible dans ce contexte d'effectuer des mesures simples de prise alimentaire par cage. Cette expérience est néanmoins édifiante. En effet, elle met en évidence le nombre de paramètres pouvant influencer la prise de poids. Elle souligne aussi l'importance de la démarche expérimentale pour caractériser les acteurs impliqués dans l'obésité, et plus particulièrement ceux dont l'influence est significative mais modérée.

C- DIMORPHISME SEXUEL CHEZ LES SOURIS CX3CR1 KI

Les études métaboliques ont été initialement réalisées en parallèle chez des mâles et chez des femelles. Cependant, le phénotype de diminution de la prise de poids et de l'insulinorésistance n'a été observé que chez les femelles déficientes pour le récepteur CX3CR1. Les mâles ne présentaient aucune différence dans la prise de poids, même dans les études tardives. La mesure de la masse grasse et de la masse maigre par la technique de résonance magnétique nucléaire (laboratoire du Dr Christophe Magnan, Paris VII) a confirmé une absence de différence de masse grasse entre les mâles CX3CR1 KI et les mâles contrôles. Les tests d'insulinorésistance (test de tolérance au glucose et test de tolérance à l'insuline) n'ont pas révélé de différence significative d'insulinosensibilité chez les mâles CX3CR1 KI et les contrôles. La prise alimentaire était aussi inchangée entre les groupes de souris mâles CX3CR1 KI et les contrôles.

Le dimorphisme sexuel au cours des maladies métaboliques est bien connu. Il est secondaire à des différences génétiques et hormonales entre les sexes, responsables des différences d'incidence et de sévérité de multiples maladies métaboliques. Chez l'humain, les femmes ont un pourcentage de masse grasse plus élevé que les hommes mais ont une répartition différente de la graisse : plus de graisse sous-cutanée et moins de graisse viscérale^{156 157}. Ces différences s'estompent après la ménopause, mettant en lumière le rôle prédominant des œstrogènes dans la répartition différentielle des graisses¹⁵⁸. L'accumulation de graisse viscérale est associée à l'insulinorésistance et aux complications cardiovasculaires contrairement à l'accumulation de graisse sous-cutanée¹⁵⁶. Par conséquent, les femmes avant la ménopause ont un risque moindre de développer un diabète de type 2 ou des maladies cardiovasculaires que les hommes. De la même façon, dans les études de modèles murins d'obésité, les femelles prennent moins de poids et sont plus insulinosensibles que les mâles¹⁵⁹¹⁶⁰. Les stéroïdes sexuels jouent un rôle prédominant dans ce dimorphisme sexuel, tant au

niveau périphérique que central. Pour exemples, l'œstradiol améliore la sensibilité à l'insuline des adipocytes *in vitro*¹⁶¹ et les androgènes modulent la fonction des adipocytes en augmentant leur taille mais en inhibant leur différenciation¹⁶². Les hormones sexuelles contrôlent également le métabolisme énergétique et la prise alimentaire au niveau hypothalamique¹⁶³. A la lumière de ces données, il semble donc étonnant que le phénotype observé d'insulinorésistance chez les femelles déficientes pour CX3CR1 ne soit pas présent chez les mâles. Cependant, bien que les œstrogènes semblent protecteurs dans la prise de poids et l'insulinosensibilité, ils joueraient un rôle délétère dans l'inflammation et l'auto-immunité. Les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques expriment le récepteur aux œstrogènes ER α . Les œstrogènes *in vivo* augmentent le statut inflammatoire des macrophages¹⁶⁴ et des cellules dendritiques¹⁶⁵. Récemment, le Dr Riant et ses collaborateurs ont démontré que la complémentation chronique en œstrogènes entraînait une inflammation au niveau du tissu adipeux et du foie de souris soumises à un régime riche en graisses. En utilisant des modèles murins femelles ovariectomisés puis supplémentés chroniquement en œstrogènes, les auteurs démontrent que les œstrogènes augmentent l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages et augmentent l'expression de gènes pro-inflammatoires hépatiques et adipeux lors du régime riche en graisses. Ils démontrent aussi, grâce à des souris chimériques, que ces effets pro inflammatoires des œstrogènes sont dépendant des cellules hématopoïétiques, contrairement aux effets protecteurs sur le poids et l'insulinorésistance. De même, il a été montré que les œstrogènes augmentent l'inflammation des cellules de la microglie en réponse au LPS¹⁶⁶. Par ailleurs, dans les modèles animaux, les œstrogènes entraînent une polarisation de la réponse immunitaire de type Th1¹⁶⁷. Le rôle pro inflammatoire des œstrogènes, dépendant des cellules hématopoïétiques, pourrait expliquer le dimorphisme sexuel inattendu dans le modèle murin déficient pour CX3CR1 soumis à un régime riche en graisses. Il serait très intéressant de reproduire nos travaux chez des souris

femelles déficientes pour CX3CR1 et ayant subi une ovariectomie afin de déterminer si le phénotype d'insulinorésistance disparaît.

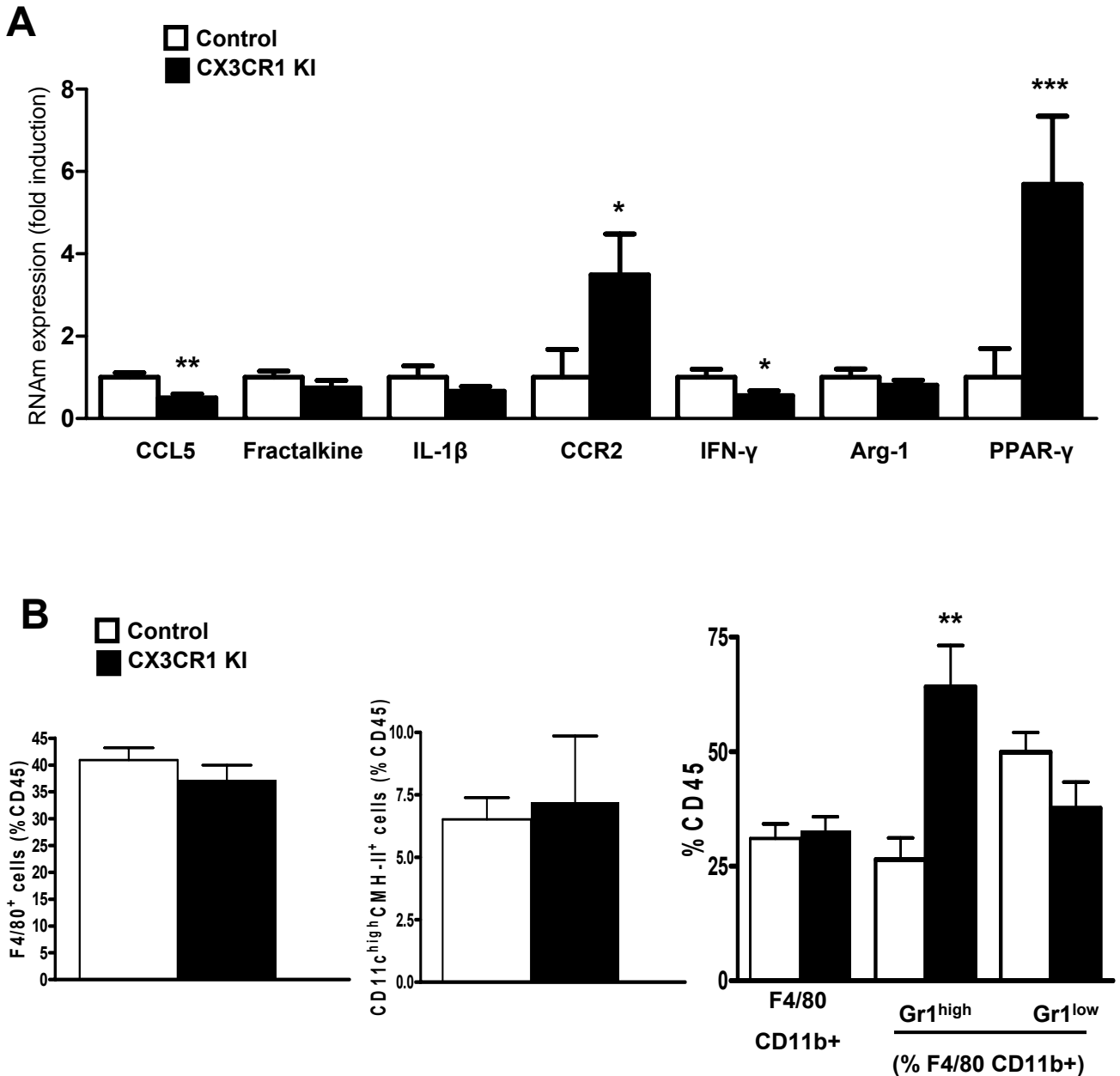


Figure 1: Analyse cellulaire et des marqueurs inflammatoires du foie des souris CX3CR1 KI sous régime riche en graisses. (A) Expression de gènes dans le foie de souris C57BL/6 et CX3CR1 KI après 22 semaines de régime riche en graisses (60 % des Kcal en lipides). n=9/7. *, p<0.05. **, p<0.01. *, p<0.001. (B) Histogrammes de marqueurs membranaires étudiés par cytométrie de flux. Les macrophages hépatiques à gauche (F4/80⁺) et les cellules dendritiques à droite (CD11c^{high} CMH-II⁺). n=6/11.**

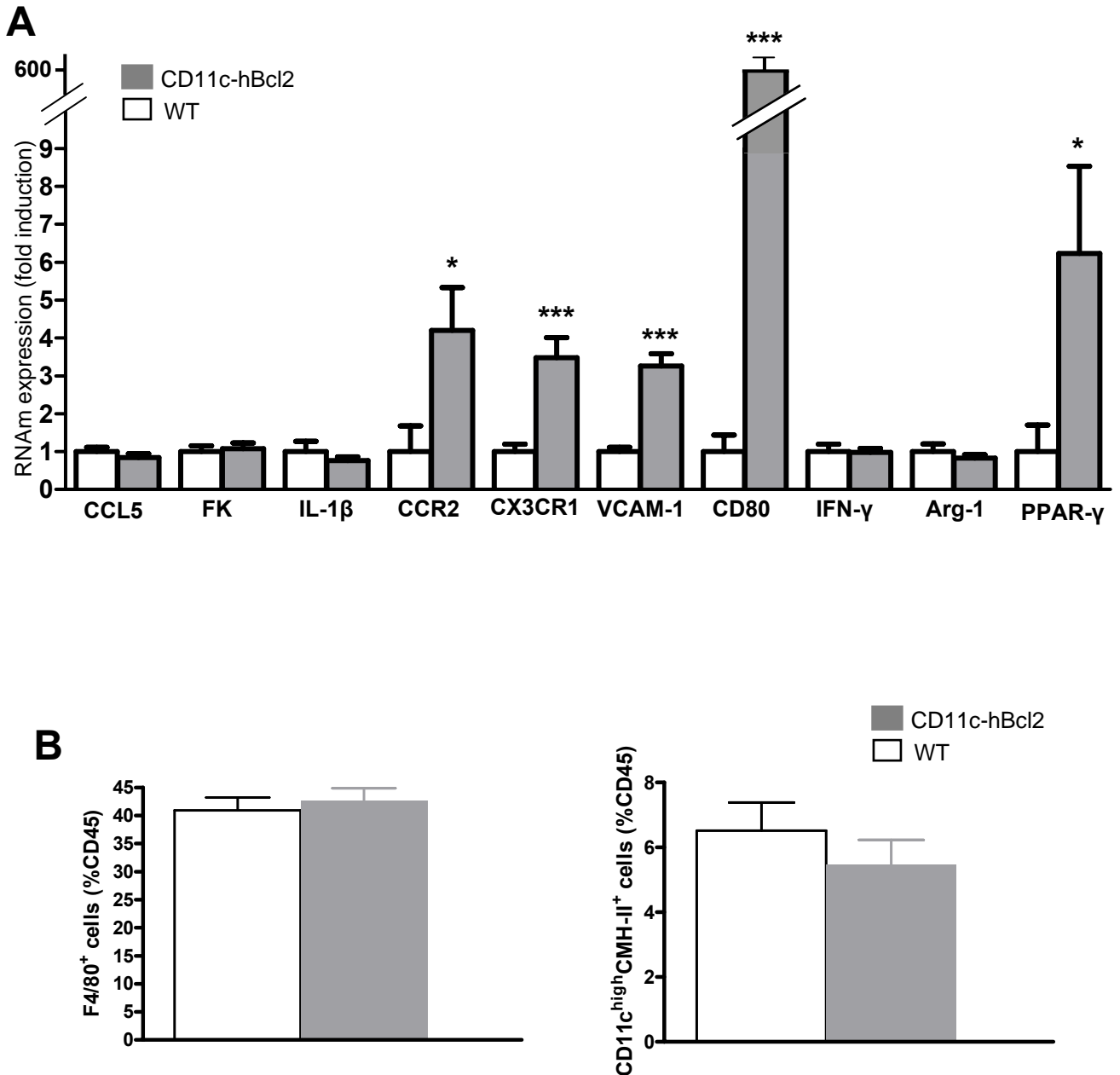


Figure 2: Analyse cellulaire et des marqueurs inflammatoires du foie des souris CD11c-hBcl2 sous régime riche en graisses. (A) Expression de gènes dans le foie de souris C57BL/6 et CD11c-hBcl2 après 22 semaines de régime riche en graisses (60 % des Kcal en lipides). n=10/7. *, p<0.01. *, p<0.001. (B) Histogrammes de marqueurs membranaires étudiés par cytométrie de flux. Les macrophages hépatiques à gauche (F4/80+) et les cellules dendritiques à droite (CD11c^{high} CMH-II⁺). n=6/11.**

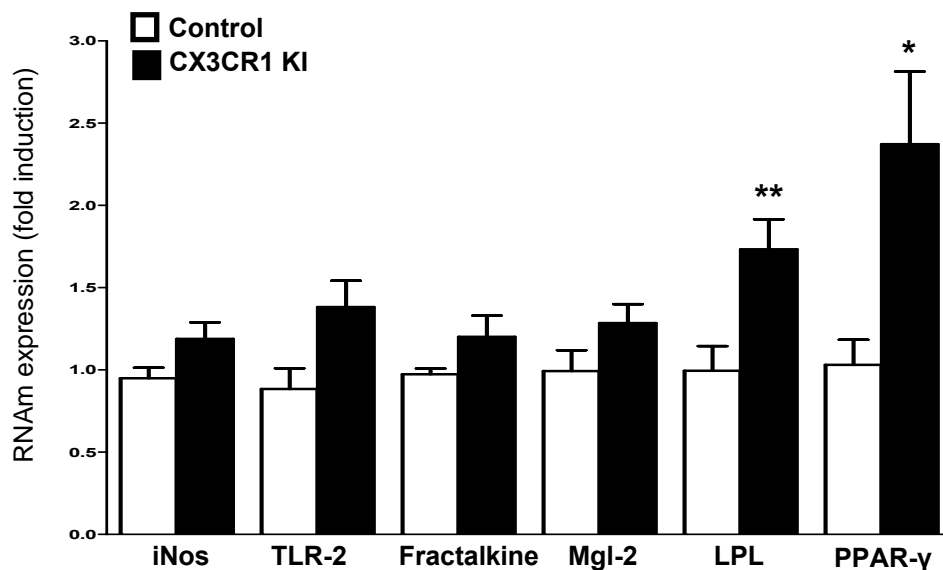
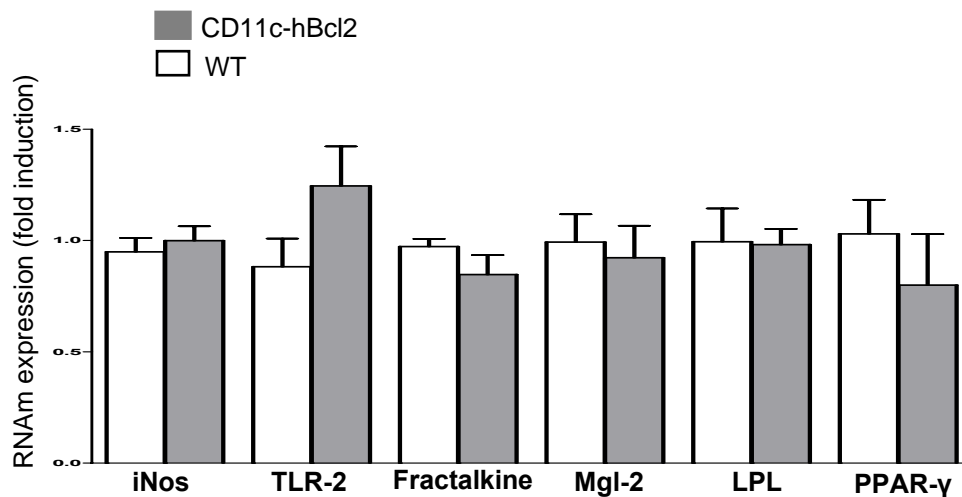
A**B**

Figure 3: Expression de gènes dans le muscle. (A) souris C57BL/6 et CX3CR1 KI après 22 semaines de régime riche en graisses (60 % des Kcal en lipides). n=10/10. *, p<0.05. **, p<0.01. (B) souris C57BL/6 et CD11c-hBcl2 après 22 semaines de régime riche en graisses (60 % des Kcal en lipides). n=10/7.

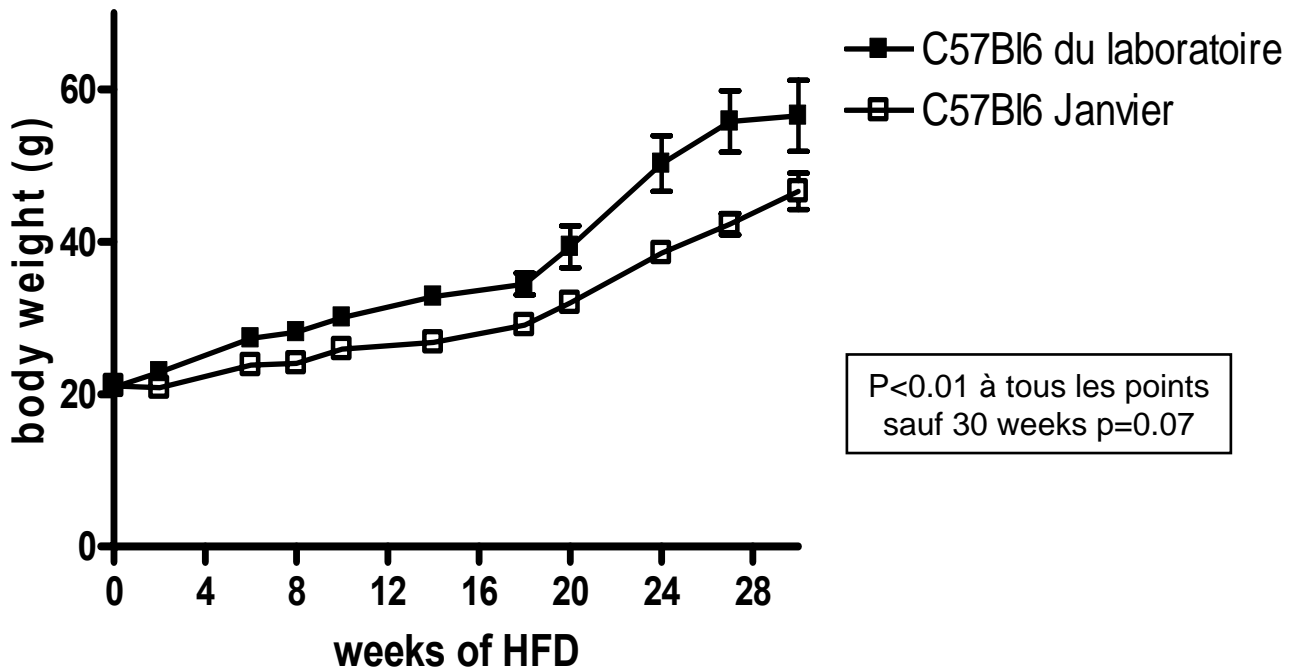


Figure 4: Prise de poids de souris C57BL/6 nées dans notre animalerie et de souris C57BL/6 nées dans une animalerie extérieure (Laboratoire Janvier) soumises à un régime riche en graisses (60 % des Kcal en lipides). N= 10/10.

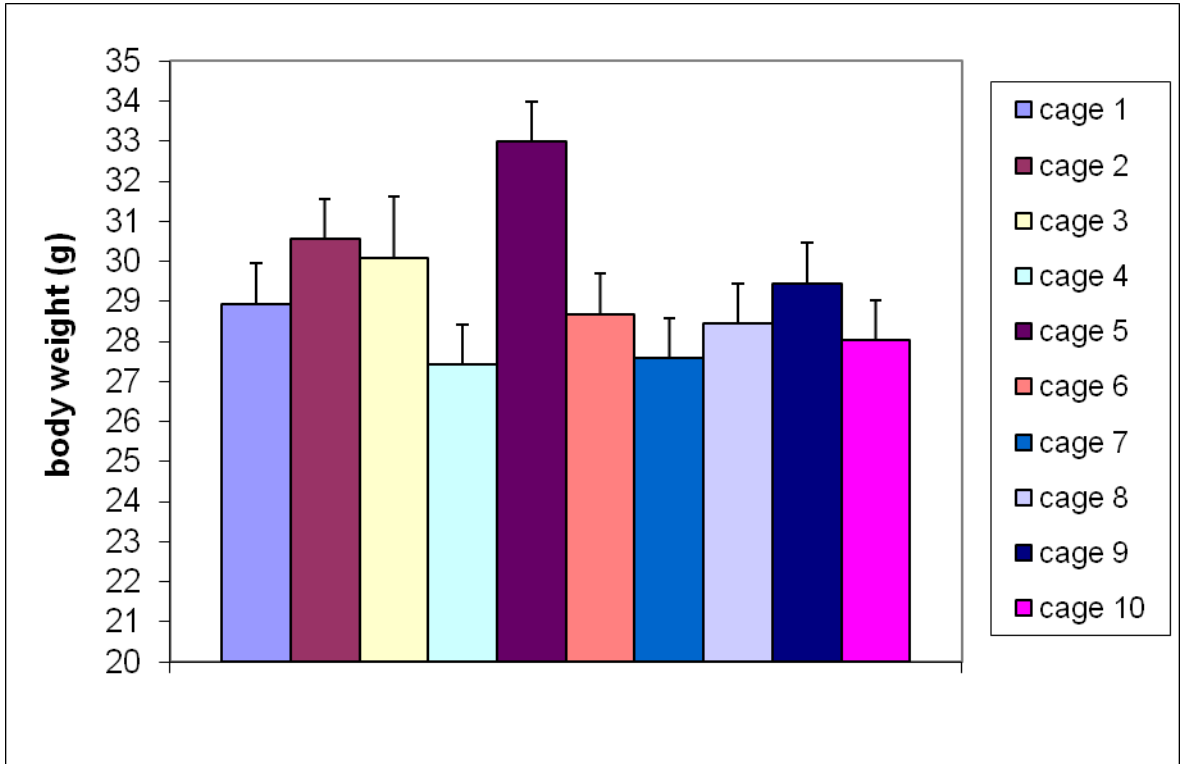


Figure 5: Effet cage: variabilité du poids entre les différentes cages contenant le même nombre d'animaux (n=4) et 4 génotypes différents dans chaque cage (C57BL/6, CX3CR1 KI, CD11c-hBcl2, CX3CR1 KI / CD11c-hBcl2) sous régime riche en graisses (60 % des Kcal en lipides).

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION

Ces travaux nous ont permis de démontrer, pour la première fois, que l'obésité induite par un régime gras chez la souris est associée à l'expansion de monocytes Gr1^{low} qui expriment à leur surface l'intégrine CD11c. De plus, nous démontrons que le récepteur aux chimiokines CX3CR1 joue un rôle important dans l'obésité et l'insulinorésistance. Par ailleurs, en utilisant des modèles murins génétiquement modifiés dans lesquels la population de monocytes Gr1^{low} est modulée, nous avons mis en évidence que cette population spécifique peut influencer d'une part la prise de poids et d'autre part l'insulinorésistance.

DISCUSSION SUR LE POIDS

Premièrement, nous avons retrouvé une corrélation positive forte entre le taux circulant de Gr1^{low} et la prise de poids ($p < 0.0001$, $n = 32$ souris). En effet, chez les souris déficientes pour le gène codant pour le récepteur aux chimiokines CX3CR1, modèle dans lequel les monocytes Gr1^{low} sont diminués, nous avons observé une diminution de la prise de poids sous HFD comparée à celle des contrôles. En plus de cette corrélation marquée, plusieurs arguments soutiennent l'implication des monocytes Gr1^{low} dans ce phénotype de baisse de prise de poids :

1) le même phénotype est retrouvé dans les souris irradiées et transférées avec de la moelle osseuse de souris déficientes pour CX3CR1, démontrant l'implication des cellules hématopoïétiques

2) Lorsqu'on croise les souris CX3CR1 KI avec des souris CD11c-hBcl2, la prise de poids des souris CX3CR1 KI/CD11c-hBcl2 se retrouve comparable à celle des souris

contrôles. Même si le taux de monocytes Gr1^{low} et le ratio Gr1^{low} /Gr1^{high} n'est que partiellement rétabli chez les souris CX3CR1 KI/CD11c-hBcl2, ces résultats sont en faveur d'un lien fort entre une population hématopoïétique exprimant CX3CR1 et CD11c, et le poids.

Il est intéressant de noter que la baisse de la quantité de masse grasse n'explique pas 100% de la baisse de poids. En effet, à 30 semaines de HFD, on observe une différence de poids total de près de 10 grammes entre les souris CX3CR1 KI et les contrôles (respectivement 49.48±8.2g et 59.13±10.51g) alors que la différence de poids du TA n'est que de 2.5g en moyenne (respectivement 12.4±2.4g et 14.8±5.1g). Plusieurs phénomènes peuvent rendre compte du fait que la diminution de la masse grasse n'explique qu'un quart environ de la diminution du poids chez les souris CX3CR1 KI :

1) la technique de la mesure de la masse grasse est loin d'être optimale car nous l'avons effectué lors du sacrifice par prélèvement du TA péri-ovarien, péri-rénal et sous-cutané. En effet, même si le prélèvement est fait de la façon la plus exhaustive possible, il est impossible d'être précis au gramme près. Il paraît donc évident qu'une étude de composition corporelle par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) devra être réalisée chez ces souris. Cette technique permettra en plus de fournir le poids de la masse maigre.

2) Une diminution de masse maigre paraît probable pour expliquer une partie de la diminution du poids dans le modèle CX3CR1 KI. L'analyse du phénotype devra aussi être complétée par une étude en chambres métaboliques. Ces chambres métaboliques permettront de mesurer la dépense énergétique et la prise alimentaire de nos souris génétiquement modifiées et d'avancer peut-être dans la compréhension du phénotype du poids.

Néanmoins, le fait que la déficience en CX3CR1 induit une diminution du pourcentage de masse grasse chez les souris indique que CX3CR1 est particulièrement

important pour le développement du tissu adipeux obèse (article figure 4G). Ce phénomène pourrait être lié à l'inflammation accrue du TA chez les souris déficientes pour CX3CR1. En effet, il a été démontré, lors d'une étude cinétique de la prise de poids chez la souris, que le pic de l'inflammation du TA s'associe à une baisse de poids du TA péri-gonadique ¹³². De plus, il a été montré que l'inflammation du TA inhibe l'adipogénèse ¹⁶⁸. Une augmentation de l'inflammation du TA des souris CX3CR1 KI, en comparaison des souris contrôles, pourrait donc être responsable, au moins en partie, de la diminution de la prise de poids.

On peut également envisager l'hypothèse de l'implication de CX3CR1 dans la prise alimentaire. En effet, le récepteur CX3CR1 est fortement exprimé par les cellules de la microglie, macrophages du système nerveux central, et son ligand la fractalkine est exprimé par les neurones ⁶⁴. Des expériences *in vitro* ont montré que l'axe CX3CR1-fractalkine est impliqué dans la survie microgliale et neuronale ¹⁶⁹. De plus, il a été montré que les souris déficientes pour le récepteur CX3CR1 présentent une neurotoxicité accrue dans un modèle infectieux aigu (injection de LPS) ainsi que dans des modèles de dégénérescence neuronale (Maladie de Parkinson et Sclérose latérale amyotrophique) ¹⁷⁰. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'hypothalamus est le centre de la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. On peut donc émettre l'hypothèse qu'une absence de CX3CR1 au niveau de la microglie hypothalamique puisse influencer sur le métabolisme énergétique. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré la prise alimentaire de souris CX3CR1 KI et de souris contrôles en cages individuelles. De façon étonnante, la prise alimentaire de souris CX3CR1 KI, soumises d'abord à un régime riche en graisses (60% des Kcal) pendant 32 semaines, est plus élevée que celle des souris contrôles (cf annexe 1). Cependant cette étude est préliminaire et sera renouvelée en chambre métabolique. De plus, nous avons vu dans l'introduction que l'obésité s'associe à une inflammation hypothalamique pouvant entraîner une insulino-résistance et une leptino-résistance locale, responsables d'une absence de frein de

la prise alimentaire par la leptine et d'une diminution de la dépense énergétique. Nous avons donc prélevé le noyau arqué et le noyau ventral hypothalamique de souris CX3CR1 KI et de souris contrôles soumises à un régime riche en graisses pendant 30 semaines. Nous avons ensuite étudié l'expression de gènes pro-inflammatoires par RT-qPCR sur les prélèvements hypothalamiques. Il apparaît que l'expression des gènes Aif-1 (marqueur d'activation de la microglie) et IL-1 β est significativement augmentée chez les souris CX3CR1 KI comparées aux souris contrôles (cf annexe 1). Ces résultats démontrent l'augmentation de l'inflammation hypothalamique chez les souris déficientes pour le gène CX3CR1, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la prise alimentaire. Une dépense énergétique plus élevée chez nos souris pourrait aussi expliquer la différence de poids.

Au regard de cette nouvelle donnée sur la prise alimentaire augmentée, il apparaît que l'effet observé de la diminution de la prise de poids chez les souris CX3CR1 KI est très fort. Ces observations mettent en lumière les interactions complexes entre le système immunitaire et le système neuroendocrinien.

Nos résultats montrent un lien étroit entre les monocytes, leurs récepteurs aux chimiokines et le poids. De façon consistante, d'autres études ont souligné l'importance des récepteurs aux chimiokines dans ce processus. En effet, les travaux du Dr. Weisberg et de ses collaborateurs ont mis en évidence une baisse de la prise de poids chez les souris déficientes pour un autre récepteur aux chimiokines, CCR2, et soumises à un régime riche en graisses¹⁷¹. Les mécanismes ne sont pas élucidés non plus. En revanche la prise alimentaire de leurs souris CCR2^{-/-} est diminuée contrairement à nos résultats. Il est intéressant de noter que dans les modèles murins déficients pour CCL2, le ligand de CCR2, les résultats concernant la prise de poids sont discordants selon les études. En effet, en 2006, le Dr. Kanda et ses

collaborateurs démontrent que des souris déficientes pour CCL2 ont le même poids et la même prise alimentaire que des souris contrôles en régime gras ¹⁷². En 2007, le Dr. Inouye et ses collaborateurs observent au contraire une augmentation significative de la prise de poids malgré une prise alimentaire identique chez leurs souris CCL2^{-/-} ¹⁷³. Finalement, en 2008, le Dr. Kirk et ses collaborateurs confirment les travaux du Dr. Inouye en observant que les souris CCL2^{-/-} sont plus grosses que leurs souris contrôles ¹⁷⁴. Même si ces résultats sont discordants (ce qui s'explique peut-être par le fait que CCR2 a plusieurs ligands (CCL2, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13)), ils confirment que des récepteurs aux chimiokines et/ou leurs ligands peuvent jouer un rôle dans la prise de poids.

Cependant, il faut garder un esprit critique vis-à-vis des études de modèles murins génétiquement modifiées soumis à un régime gras. En effet, les résultats discordants des études ci-dessus ont permis de révéler que les souris utilisées dans les travaux de Kanda *et al.* sont de fond génétique différent (C57BL/6N et C57BL6/J) et proviennent de fournisseurs d'animaux différents. Or, une très belle étude du groupe du Dr. D. Littman a récemment montré que les flores microbiennes intestinales diffèrent selon les fournisseurs animaliers et que ces différences peuvent être responsables d'une réponse immune différente ¹⁷⁵. En effet, le Dr. Ivanov et ses collaborateurs ont mis en évidence que les souris C57BL/6 en provenance du fournisseur « Taconic Farms » sont colonisées par une *bactérie filamentaire segmentée*, contrairement aux souris de même fond génétique C57BL/6 mais provenant d'un autre fournisseur (« Jackson »), et que la présence de cette seule bactérie induit une réponse immunitaire Th17 au niveau de la *lamina propria* intestinale. Si on étudie en parallèle les travaux du Dr. Cani ¹¹⁴ qui mettent en évidence le rôle joué par la flore microbienne intestinale et l'endotoxémie sur l'obésité, on comprend qu'il faut être rigoureux sur la provenance des souris, qu'il faut toujours garder les mêmes lots de nourriture pour une même expérience, et que certains résultats peuvent varier selon les animaleries et les fournisseurs

d'animaux. Pour nos études, nous n'avons utilisé uniquement que des souris de notre animalerie, croisées de multiples fois, et filles d'une même génération de frères et sœurs. Les études sur des souris irradiées retransplantées avec de la moelle osseuse permettent d'obtenir des souris en grand nombre et de s'affranchir de ces variabilités.

Pour conclure, nos résultats montrent une forte corrélation entre la population monocytaire de Gr1^{low} et le poids. Cependant, l'ensemble de ces données met en lumière la complexité de l'étude de l'obésité dans des modèles murins déficients pour des récepteurs aux chimiokines ou leurs ligands ainsi que la complexité des interactions système immunitaire/système neuroendocrine.

DISCUSSION SUR L'INSULINORÉSISTANCE ET LES MACROPHAGES DU TISSU ADIPEUX

Deuxièmement, nos travaux ont permis de mettre en évidence une nette corrélation négative entre le taux circulant de monocytes Gr1^{low} et l'insulinorésistance ($p=0.0059$, $n=30$ souris). En effet, chez les souris déficientes pour CX3CR1, la diminution des monocytes Gr1^{low} circulants est associée à une augmentation de l'insulinorésistance, alors que chez les souris CD11c-hBcl2 dans lesquelles les taux de monocytes Gr1^{low} sont augmentés, on observe une insulinosensibilité augmentée. Lorsque nous avons étudié le tissu adipeux des souris déficientes pour CX3CR1, nous avons observé que le nombre de macrophages infiltrant le tissu adipeux reste inchangé par rapport aux souris contrôles mais que les populations macrophagiques sont modifiées de façon marquée (cf figures de cytométrie de flux des macrophages du TA). Chez les souris CX3CR1 KI la proportion de macrophages M2 est

diminuée, celle de macrophages M1 augmentée et par conséquent le ratio M2/M1 diminué (1.74+/-0.84 chez les souris CX3CR1 KI versus 3.76+/-2.44 chez les souris contrôles, p=0.07) alors qu'on a observé une augmentation des macrophages M2 chez les souris CD11c-hBcl2. Ces résultats sont en faveur du modèle dans lequel les monocytes Gr1^{low} sont les précurseurs des macrophages M2 du TA et protègent de l'insulinorésistance en contrôlant l'inflammation du TA. Ces observations sont en accord avec celles du Dr. Narhendorf ⁷¹ qui démontrent, grâce à une technique de marquage spécifique des Gr1^{high} et des Gr1^{low}, que les Gr1^{low} sont recrutés dans le tissu myocardique pour se différencier en macrophages M2 qui vont exprimer des gènes anti-inflammatoires, de réparation tissulaire et d'angiogénèse. D'autre part, le Dr. Auffray a aussi démontré dans le modèle d'infection à *Listeria Monocytogenes* que les Gr1^{low} recrutés au sein du péritoine infecté développent un programme de différenciation génique anti-inflammatoire, de remodelage et de cicatrisation tissulaire ¹⁹. De plus, dans le modèle d'IDM, le Dr. Narhendorf et ses collaborateurs démontrent grâce à des modèles murins déficients pour CCR2 ou CX3CR1 que le recrutement de la population spécifique des monocytes Gr1^{low} dans le myocarde lors de la phase II de réparation tissulaire est dépendant de CX3CR1 et non de CCR2. De la même façon, dans un modèle de lésion minime de la peau (de type coupure), Le Dr. Hishida et ses collaborateurs observent que le recrutement des monocytes qui vont se différencier pour faire de la fibrose et permettre la cicatrisation dépend de CX3CR1 ⁷². On peut cependant noter que dans le modèle d'athérosclérose Apoe^{-/-}, l'équipe du Dr. Randolph a démontré que le recrutement dans la plaque des monocytes Gr1^{high} dépend de CCR2 et CX3CR1 alors que celui des Gr1^{low} dépendait de CCR5 ⁸³. Il paraît probable que le recrutement des différentes populations monocytaires diffèrent selon le type d'agression, le tissu lésé et le modèle animal. L'ensemble de ces résultats met en avant le rôle de CX3CR1 dans le recrutement des monocytes Gr1^{low} sur les sites agressés, et soutient l'hypothèse que ces Gr1^{low} se différencient en macrophages de type M2. Il apparait clairement

que CX3CR1, en plus de son rôle dans la survie, est impliqué dans le recrutement des monocytes Gr1^{low} dans certaines affections.

Pour aller plus loin sur le lien entre Gr1^{low} et macrophages M2 du TA au cours de l'obésité, plusieurs expériences sont possibles. La première, que nous avons prévu de réaliser, consiste à marquer les monocytes Gr1^{low} avec des billes de latex fluorescentes⁸³, puis de laisser les souris en HFD pendant un temps à déterminer, et ensuite de récupérer la fraction vasculaire stromale du TA. Le comptage de la fluorescence pourra être fait par cytométrie de flux ou par immunohistochimie. Cette expérience pourra démontrer le recrutement des monocytes Gr1^{low} dans le TA au cours de l'obésité. Récemment, un modèle murin dans lequel est supprimé un facteur de transcription essentiel pour les Gr1^{low} (Nur77) vient d'être créé¹⁷⁶. Une autre approche serait d'utiliser ces souris qui sont dépourvues de monocytes Gr1^{low}. Si les souris Nur77^{-/-} soumises à un régime riche en graisses présentaient une insulino-résistance augmentée avec diminution des macrophages M2 et inflammation du TA, ce serait un argument de plus pour pouvoir affirmer que les Gr1^{low} se différencient en macrophages M2 et protègent de l'inflammation du TA et de l'insulino-résistance.

D'autre part, il est intéressant de noter que le phénotype poids et insulino-résistance des souris CX3CR1 KI n'apparaît que tardivement après 18 semaines de régime riche en graisses et avec un régime très gras (60% des Kcal en graisses). Les ITT et les GTT réalisées avant 18 semaines de HFD ne montrent pas de différences significatives entre les génotypes (données non montrées). D'après une étude cinétique murine sur l'infiltration des macrophages du TA (et sur la nécrose adipocytaire), l'inflammation du TA est maximum à 16 semaines de régime riche en graisses puis décroît malgré la poursuite du régime¹²⁴. A 16 semaines de HFD (60%

de lipides), la nécrose adipocytaire, l'infiltration de macrophages et l'inflammation du TA sont maximales, et l'ensemble de ces caractéristiques s'accompagne d'une diminution du poids du TA péri-gonadique et d'une insulino-résistance. Alors qu'après 16 semaines de régime, la nécrose adipocytaire, la taille des adipocytes et l'inflammation du TA diminuent, en faveur d'un programme de remodelage qui se serait mis en place. De façon étonnante, cette phase II de remodelage du TA est associée à une insulinosensibilité augmentée comparée à la phase I pro-inflammatoire avant 16 semaines de HFD. De façon intéressante, la cinétique d'apparition du phénotype des souris CX3CR1 KI est identique à celle de cette étude. Il est donc tentant de spéculer que l'absence de monocytes Gr1^{low}, précurseurs des macrophages M2 du TA, altère la phase II de remodelage du TA et le contrôle de son inflammation. Ceci expliquerait que le phénotype ne soit visible qu'après 16 semaines de régime gras. De plus, dans ces travaux cinétiques, le pic de la phase I pro-inflammatoire s'associant à une baisse de poids du TA péri-gonadique, la diminution du poids des souris CX3CR1 KI serait expliquée par ce « blocage » en phase I pro-inflammatoire du TA.

Par ailleurs, lorsque nous avons étudié la polarisation des macrophages du TA des souris obèses en cytométrie de flux avec les marqueurs connus et spécifiques des macrophages M1 (CD11c) et des macrophages M2 (Mgl1), nous avons observé qu'il existe aussi une population double positive pour CD11c et Mgl1 et une population ne portant aucun de ces marqueurs. Il est intéressant de noter que nous avons aussi retrouvé ces populations au sein du TA en régime normal, dans tous les génotypes étudiés, avec les proportions suivantes en pourcentage des macrophages: 50 à 60% de cellules doubles négatives, 30 % de cellules doubles positives, 3 à 4 % de cellules CD11c+Mgl1- et 15 % de cellules Mgl1+CD11c-. Nous n'avons noté aucune différence entre tous les génotypes étudiés en régime normal. Le Dr. Zeyda et ses collaborateurs observent aussi une population double négative en l'absence

d'obésité (30% des macrophages) ¹³⁶ Le Dr. Shaul ne retrouve pas cette population double négative en régime normal (la fenêtre utilisée pour isoler les macrophages ne semble pas adéquat) mais retrouve une population positive pour les 2 marqueurs en régime normal et en HFD ¹³². Quoiqu'il en soit, il apparaît qu'il n'existe pas seulement deux populations bien nettes de macrophages M1 pro-inflammatoires et de macrophages M2 réparateurs tissulaires, mais un éventail de populations avec des polarisations variables. Grâce à une analyse d'expression de gènes sur cellules triées, le Dr Shaul retrouve que la population de macrophages CD11c⁺Mgl1⁺ chez des souris en régime gras exprime essentiellement des gènes de macrophages M2 (Arginase, MMP-12, VEGF) ¹³². Dans notre étude, nous avons observé que cette population double positive pour CD11c et Mgl1 est significativement diminuée chez les souris CX3CR1 KI soumises à un régime gras (supplemental data). Si on associe ces résultats à ceux de du Dr. Shaul, nous confirmons la baisse des macrophages M2 réparateurs tissulaires dans notre modèle murin CX3CR1 KI. Cependant, la fonctionnalité exacte de cette population nécessite d'être plus largement explorée. Nous avons aussi observé que la population CD11c-Mgl1- est augmentée par 3 fois chez les souris CX3CR1 KI. La fonctionnalité de cette population est également méconnue. La seule étude qui la décrit la présente comme une population exprimant beaucoup de gènes M2 (Arginase, Ym1, IL-10) mais aussi de l'IL-1 β ¹³⁶. Il est possible que CX3CR1 intervienne dans la différenciation de cette population qui s'accumule chez les souris CX3CR1 KI, mais cette observation nécessite une étude à part entière. Cependant, pour aller plus loin dans la description de notre phénotype observé chez les souris CX3CR1 KI, il serait intéressant de regarder l'expression de gènes de type M1 et M2 dans les populations triées de macrophages du TA.

Pour conclure, les macrophages présentent une grande plasticité permettant de s'adapter à leur environnement, mais leurs marqueurs membranaires utilisés aujourd'hui ne reflètent peut-être pas parfaitement leur polarisation ¹⁷⁷. A titre d'exemple, cette étude du

groupe du Dr. Olefsky qui démontre chez des souris en HFD qui repassent en régime normal que le marqueur pro-inflammatoire CD11c persiste au sein du TA après 4 semaines de changement de régime malgré une baisse de l'inflammation du TA évaluée par expression de gènes et une insulinosensibilité systémique retrouvée¹³⁹. L'état inflammatoire du TA doit être évalué aussi et surtout par de l'expression de gènes et des niveaux protéiques.

Au total, nos résultats démontrent que CX3CR1 est important dans l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité et dans l'insulinorésistance associée. De plus, nos données sont en faveur de l'hypothèse que les Gr1^{low} sont les précurseurs des macrophages M2 du TA et ont un rôle protecteur dans l'insulinorésistance. Nous projetons de marquer spécifiquement cette population et d'étudier leur recrutement au sein du TA lors de l'obésité. La cinétique de l'inflammation du TA et du recrutement des monocytes/macrophages au cours de l'obésité explique probablement la cinétique du modèle CX3CR1 KI en HFD.

DISCUSSION SUR LES MODELES MURINS

Nous avons utilisé des modèles murins dans lesquels la population de monocytes Gr1^{low} est modulée en HFD, cependant il est évident que d'autres populations cellulaires sont modifiées dans ces modèles. En ce qui concerne la déficience pour CX3CR1, nous avons regardé par cytométrie de flux si les autres types cellulaires circulants exprimant CX3CR1 sont modifiés au cours de l'obésité. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les lymphocytes T CD4 (activés ou non) ne sont pas modifiés chez les souris CX3CR1 KI en HFD (supplemental datas). Le taux circulant de NK est non significativement diminué chez les

souris déficientes pour CX3CR1 en comparaison aux souris contrôles (10.09+/-4.41 % et 13.16+/-4.02 % des leucocytes, respectivement). Cependant, nous avons tout de même vérifié si le taux de NK n'est pas modifié au sein du TA lors du régime gras chez les souris CX3CR1 KI, ce qui est le cas. Nous avons vu dans l'introduction que CX3CR1 est exprimé par certains types de cellules dendritiques, notamment des cellules dendritiques intestinales qui jouent un rôle dans la reconnaissance d'antigènes de la lumière bactérienne et dans la clairance d'antigènes bactériens intestinaux^{59 77}. Il est possible que la déficience de CX3CR1 affecte cette population de la *lamina propria*. On ne peut pas complètement exclure que des altérations de la fonction de ces cellules dendritiques intestinales participent au phénotype du poids et de l'insulinorésistance chez les souris CX3CR1 KI. Il faut donc rester critique quant aux études sur les récepteurs aux chimiokines (ou sur leurs ligands) qui peuvent avoir de multiples rôles, parfois différents, dans de multiples tissus. D'autant plus que l'obésité et l'insulinorésistance sont des pathologies complexes qui impliquent de nombreux tissus (TA, foie, muscle, hypothalamus, tractus digestif).

Dans le modèle murin utilisé pour augmenter la population de monocytes Gr1^{low} en HFD, le transgène humain anti-apoptotique Bcl2 est inséré sous le promoteur CD11c pour augmenter artificiellement la durée de vie des cellules exprimant l'intégrine CD11c. CD11c est habituellement utilisée pour marquer les cellules dendritiques. Cependant, conformément à nos résultats, plusieurs auteurs retrouvent aussi une expression de CD11c sur les monocytes Gr1^{low}^{83 34}. De plus, nous avons mis en évidence que l'expression de CD11c est fortement augmentée sur la sous-population de monocytes Gr1^{low}, ce qui constitue le rationnel de l'utilisation de ce modèle dans notre étude. Ce modèle, qui a déjà été décrit et utilisé dans notre laboratoire, présente un nombre de cellules dendritiques conventionnelles spléniques

augmenté, associé à une augmentation des lymphocytes T CD4 activés spléniques et de lymphocytes B activés spléniques et circulants¹⁷⁸.

Pour conclure, nous ne pouvons pas éliminer formellement le rôle joué par d'autres types cellulaires que les monocytes Gr1^{low} sur le phénotype observé (cellules de la microglie, cellules de la *lamina propria* par exemple). Il apparaît tout de même que les cellules impliquées expriment CX3CR1 et CD11c au cours de l'obésité, ce qui est restrictif. De plus, les corrélations marquées entre le taux de Gr1^{low} et le poids d'une part, et l'insulinorésistance d'autre part, sont en faveur d'un rôle prédominant de cette population dans le métabolisme des souris étudiées.

DISCUSSION ET APPLICATIONS A L'HOMME

La finalité des travaux sur les modèles animaux est de décortiquer les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu pour maintenir des conditions homéostatiques et de comprendre comment leur altération induit des pathologies. Il est difficile d'étudier la constitution de l'obésité et le TA chez l'homme. Les mécanismes cinétiques impliqués dans la constitution de l'obésité sont impossibles à étudier chez l'homme car l'obésité est souvent installée depuis très longtemps lorsque le patient est pris en charge. L'étude du recrutement des cellules immunes, de la dynamique et de la plasticité du TA ne peut donc être réalisée que dans des modèles animaux ou *ex-vivo*, à l'aide de cultures cellulaires. De plus, l'accès aux tissus humains impliqués dans l'insulinorésistance (adipeux, musculaires, hépatiques, intestinaux, hypothalamique) est évidemment difficile, voir impossible (hypothalamus). Les modèles murins sont utilisés car ils permettent la manipulation génétique, dans le but de cibler des questions précises sur le rôle de populations cellulaires par exemple. En ce qui concerne

l'obésité, il existe de nombreuses analogies entre les observations faites chez l'homme et celles faites chez les modèles murins. Premièrement il existe une analogie concernant l'hétérogénéité et les différentes fonctionnalités des monocytes circulants, avec notamment une forte analogie entre la sous-population spécifique de monocytes CD14^{dim} humains et celle de Gr1^{low} murins. Les récents travaux de l'équipe de Dr. Geissmann sont venus éclairer les discordances dans la classification et la fonctionnalité des populations monocytaires chez l'homme et la souris (cf introduction). Deuxièmement, chez l'homme obèse, le TA est aussi le siège d'une infiltration des cellules immunes et de macrophages pro-inflammatoires au cours de l'obésité ¹¹⁹. Jusque là, il était admis que les macrophages infiltrant le TA chez la souris présentaient un phénotype de M1 ¹²⁶, alors que les macrophages humains infiltrant le TA des patients obèses présentent un phénotype mixte de macrophages M1 et M2 ¹¹⁹. Cependant, les récentes données chez la souris ^{132,136} et les résultats de ces travaux de thèse démontrent que le phénotype des macrophages infiltrant le TA des souris obèses est également mixte, avec probablement un éventail de populations entre les macrophages M1 pro-inflammatoires et les macrophages M2 réparateurs tissulaires. En revanche, on peut noter que les cellules lymphoïdes présentes dans le TA humain diffèrent de celles du TA murin ¹²⁷. De toute façon, il est primordial de décortiquer les mécanismes de recrutement des différentes populations circulantes au sein du TA, de comprendre s'il existe une cinétique de recrutement parallèle à la cinétique de la maladie et de comprendre si chaque population de monocytes/macrophages joue un rôle spécifique au sein du TA. Toutes ces études ne peuvent se faire que dans des modèles animaux. Répondre à ces questions permet d'envisager des solutions thérapeutiques adaptées. En effet, dans le scénario où les monocytes Gr1^{high} sont recrutés en phase I pro-inflammatoire pour se différencier en macrophages M1 puis les Gr1^{low} en phase II pour se différencier en macrophages M2 et participer au remodelage du TA, on peut envisager des inhibiteurs thérapeutiques spécifiques du recrutement et/ou de la différenciation des Gr1^{high} ou

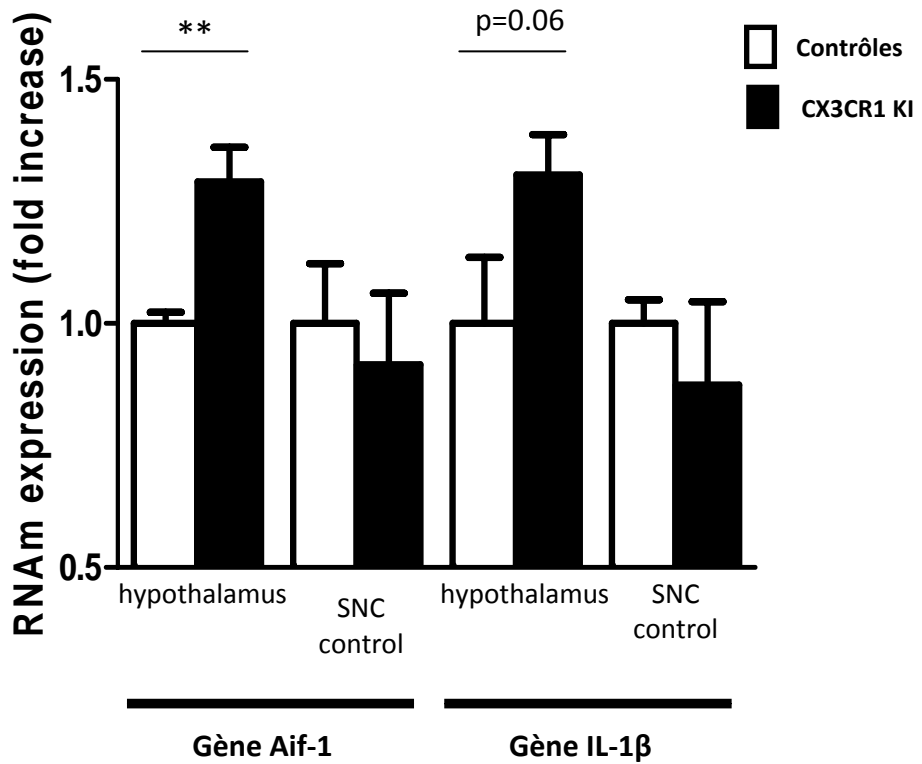
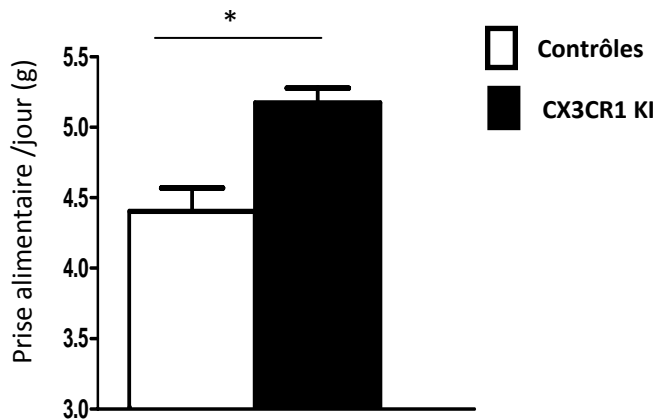
au contraire des activateurs du recrutement des Gr1^{low} ou de la différenciation en macrophages M2.

Une autre façon d'aborder le rôle des populations monocytaires, en l'occurrence celui des Gr1^{low}, au cours de l'obésité chez l'homme pourrait être l'étude de polymorphismes. Chez l'homme, deux polymorphismes du récepteur CX3CR1 ont été décrits : T280M et V249I. Ces polymorphismes sont associés à une diminution de la fonctionnalité du récepteur avec une diminution de la migration des monocytes/macrophages^{179 78} et à une diminution de l'adhésion des monocytes sur des cellules endothéliales activées⁶⁶. Ces polymorphismes ont été associés à une diminution du risque cardiovasculaire^{180 181}. En revanche, ils ont récemment été associés à l'obésité et l'insulinorésistance^{182 183}, corroborant nos résultats d'insulinorésistance chez les souris déficientes pour CX3CR1. Plus précisément, dans l'étude du Dr. Shah, les polymorphismes sont associés positivement avec le HOMA-R, la leptine, la présence d'un syndrome métabolique et diabète de type 2 et négativement avec l'adiponectine¹⁸³. Il serait très intéressant de rechercher une corrélation entre les polymorphismes du gène CX3CR1 et les CD14^{dim}, ainsi qu'avec l'inflammation du TA. Identifier parmi les patients obèses (ou non) ceux qui sont à risque d'insulinorésistance permettrait de mettre en place des stratégies de prévention, qu'elles soient médicamenteuses ou non.

CONCLUSION GENERALE

Nos travaux mettent en évidence pour la première fois que la modulation d'une population monocyttaire spécifique, les monocytes Gr1^{low}, peut influencer le poids et l'insulinorésistance. De plus, nous démontrons que la monocytose induite par un régime gras prédomine sur les Gr1^{low} et que ces derniers expriment un haut niveau d'intégrine CD11c. Il existe des arguments forts pour dire que les monocytes Gr1^{low} sont les précurseurs des

macrophages M2 du TA et protègent de l'insulinorésistance chez la souris. Promouvoir le recrutement et/ou la différenciation des monocytes Gr1^{low} peut être une voie thérapeutique dans l'obésité et ses complications. Il faut cependant garder à l'esprit qu'un excès de réparation tissulaire peut aussi être nocif et entraîner une fibrose excessive.

A**B**

Annexe 1: (A) Expression des ARNm des gènes Aif-1 et IL1-β dans l'hypothalamus de souris C57BL/6 et CX3CR1 KI (n=7/8 mice). **(B)** Prise alimentaire quotidienne en grammes de nourriture/jour (n=3/7 mice), en cages individuelles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444:860-7.
2. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*;121:2111-7.
3. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*;72:219-46.
4. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*;11:98-107.
5. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*;327:656-61.
6. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-52.
7. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-52.
9. Figdor CG, Bont WS, Touw I, de Roos J, Roosnek EE, de Vries JE. Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation. *Blood*. 1982;60:46-53.
10. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74:2527-34.
11. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 1993;23:2053-8.
12. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*;11:762-74.
13. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008;67:152-9.
14. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001;69:11-20.
15. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol*. 2001;31:48-56.
16. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168:3536-42.
17. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F, Habenicht AJ, Ziegler-Heitbrock L, Randolph GJ. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*;115:e10-9.
18. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*;33:375-86.
19. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317:666-70.

20. Goff WL, Johnson WC, Wyatt CR, Cluff CW. Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;55:45-62.
21. Chamorro S, Revilla C, Alvarez B, Alonso F, Ezquerro A, Dominguez J. Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology.* 2005;114:63-71.
22. Ahuja V, Miller SE, Howell DN. Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43. *Cell Immunol.* 1995;163:59-69.
23. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19:71-82.
24. Nikolic T, de Bruijn MF, Lutz MB, Leenen PJ. Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow. *Int Immunol.* 2003;15:515-24.
25. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol.* 2004;172:4410-7.
26. Dominguez PM, Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev;*234:90-104.
27. Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, Nussenzweig M. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol.* 2007;8:578-83.
28. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol;*17:53-9.
29. Seki E, Tsutsui H, Tsuji NM, Hayashi N, Adachi K, Nakano H, Futatsugi-Yumikura S, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Fujimoto J, Nakanishi K. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Immunol.* 2002;169:3863-8.
30. Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M, Randolph GJ. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med.* 2006;203:583-97.
31. Peng Y, Latchman Y, Elkon KB. Ly6C(low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerize T cells through PDL-1. *J Immunol.* 2009;182:2777-85.
32. den Hartigh LJ, Connolly-Rohrbach JE, Fore S, Huser TR, Rutledge JC. Fatty acids from very low-density lipoprotein lipolysis products induce lipid droplet accumulation in human monocytes. *J Immunol;*184:3927-36.
33. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest.* 2007;117:195-205.
34. Wu H, Gower RM, Wang H, Perrard XY, Ma R, Bullard DC, Burns AR, Paul A, Smith CW, Simon SI, Ballantyne CM. Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation.* 2009;119:2708-17.
35. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, Stephens KB, de Mochel NS, Eberle D, Olivas VR, Kim RY, Harms MJ, Johnson A, Messina LM, Rapp JH, Raffai RL. ApoE Suppresses Atherosclerosis by Reducing Lipid Accumulation in Circulating Monocytes and the Expression of Inflammatory Molecules on Monocytes and Vascular Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
36. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958-69.
37. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:279-89.
38. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:953-64.

39. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992;176:287-92.
40. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol.* 2006;80:1298-307.
41. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003;301:640-3.
42. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21:467-76.
43. Loke P, Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, Allison JP, Allen JE. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol.* 2007;179:3926-36.
44. Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Jr., Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:448-53.
45. Wynes MW, Riches DW. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 2003;171:3550-9.
46. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101:890-8.
47. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-61.
48. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 1999;11:753-61.
49. Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, Fehling HJ, Hardt WD, Shakhar G, Jung S. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity.* 2009;31:502-12.
50. Varol C, Zigmund E, Jung S. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat Rev Immunol*;10:415-26.
51. Jakubzick C, Tacke F, Ginhoux F, Wagers AJ, van Rooijen N, Mack M, Merad M, Randolph GJ. Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. *J Immunol.* 2008;180:3019-27.
52. Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol.* 2007;178:2000-7.
53. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity.* 2003;19:59-70.
54. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol.* 2008;181:5829-35.
55. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-30.
56. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 1998;273:23799-804.
57. Nishiyori A, Minami M, Ohtani Y, Takami S, Yamamoto J, Kawaguchi N, Kume T, Akaike A, Satoh M. Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Lett.* 1998;429:167-72.

58. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*. 2000;20:4106-14.
59. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005;307:254-8.
60. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385:640-4.
61. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*. 1998;188:1413-9.
62. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*. 2001;276:37993-8001.
63. Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*. 2003;102:1186-95.
64. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:10896-901.
65. Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, Jewell DP, Gordon S, Powrie F, Greaves DR. The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am J Pathol*. 2001;158:855-66.
66. Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol*. 2000;164:3368-76.
67. Ludwig A, Berkhout T, Moores K, Groot P, Chapman G. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol*. 2002;168:604-12.
68. Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, Yamada N, Kawamura T, Fitzhugh DJ, Saraf MA, Schall T, Blauvelt A, Rosen SD, Hwang ST. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1999;29:2551-9.
69. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009;113:963-72.
70. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, Mallat Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2008;117:1649-57.
71. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204:3037-47.
72. Ishida Y, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol*. 2008;180:569-79.
73. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003;111:333-40.

74. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation*. 2003;107:1009-16.
75. Tarozzo G, Campanella M, Ghiani M, Bulfone A, Beltramo M. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat. *Eur J Neurosci*. 2002;15:1663-8.
76. Oh DJ, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, Faubel S, Edelstein CL. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294:F264-71.
77. Hapfelmeier S, Muller AJ, Stecher B, Kaiser P, Barthel M, Endt K, Eberhard M, Robbiani R, Jacobi CA, Heikenwalder M, Kirschning C, Jung S, Stallmach T, Kremer M, Hardt WD. Microbe sampling by mucosal dendritic cells is a discrete, MyD88-independent step in DeltainvG S. Typhimurium colitis. *J Exp Med*. 2008;205:437-50.
78. Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodero M, Pezard A, Lavalette S, Houssier M, Jonet L, Picard E, Debre P, Sirinyan M, Deterre P, Ferroukhi T, Cohen SY, Chauvaud D, Jeanny JC, Chemtob S, Behar-Cohen F, Sennlaub F. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest*. 2007;117:2920-8.
79. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2008;180:6846-53.
80. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, Leemput J, Bigot K, Campisi L, Abitbol M, Molina T, Charo I, Hume DA, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*. 2009;206:595-606.
81. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7:311-7.
82. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354:610-21.
83. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185-94.
84. Qu C, Edwards EW, Tacke F, Angeli V, Llodra J, Sanchez-Schmitz G, Garin A, Haque NS, Peters W, van Rooijen N, Sanchez-Torres C, Bromberg J, Charo IF, Jung S, Lira SA, Randolph GJ. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med*. 2004;200:1231-41.
85. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med*. 2007;204:171-80.
86. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117:902-9.
87. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325:612-6.
88. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol*. 2006;7:265-73.
89. Crofton RW, Diesselhoff-den Dulk MM, van Furth R. The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med*. 1978;148:1-17.

90. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Bruck W, Priller J, Prinz M. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 2007;10:1544-53.
91. Wijffels JF, de Rover Z, Beelen RH, Kraal G, van Rooijen N. Macrophage subpopulations in the mouse spleen renewed by local proliferation. *Immunobiology.* 1994;191:52-64.
92. Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG, Engleman EG. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol.* 2002;3:1135-41.
93. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*;330:841-5.
94. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette PS, Pamer EG. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity*;34:590-601.
95. Hohl TM, Rivera A, Lipuma L, Gallegos A, Shi C, Mack M, Pamer EG. Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe.* 2009;6:470-81.
96. Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, Jeffrey KL, Anthony RM, Kluger C, Nchinda G, Koh H, Rodriguez A, Idoyaga J, Pack M, Velinzon K, Park CG, Steinman RM. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*;143:416-29.
97. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*;332:1284-8.
98. Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, Nahrendorf M. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol*;55:1629-38.
99. Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, Pagler T, Bijl N, Kuo CL, Wang M, Sanson M, Abramowicz S, Welch C, Bochem AE, Kuivenhoven JA, Yvan-Charvet L, Tall AR. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest.*
100. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204:1057-69.
101. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1412-8.
102. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*;7:77-86.
103. Swirski FK, Weissleder R, Pittet MJ. Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1424-32.
104. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821-30.
105. Tam CS, Clement K, Baur LA, Tordjman J. Obesity and low-grade inflammation: a paediatric perspective. *Obes Rev*;11:118-26.
106. Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology*;151:4109-15.
107. Ogston D, McAndrew GM. Fibrinolysis In Obesity. *Lancet.* 1964;2:1205-7.
108. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes.* 2003;52:2882-7.

109. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*;142:687-98.
110. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, Prabhala A, Afzal A, Garg R. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:355-62.
111. Dalmas E, Rouault C, Abdennour M, Rovere C, Rizkalla S, Bar-Hen A, Nahon JL, Bouillot JL, Guerre-Millo M, Clement K, Poitou C. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr*;94:450-8.
112. Goodman AL, Gordon JI. Our unindicted coconspirators: human metabolism from a microbial perspective. *Cell Metab*;12:111-6.
113. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest*;121:2126-32.
114. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761-72.
115. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796-808.
116. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*;11:85-97.
117. Lolmede K, Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bouloumie A. Immune cells in adipose tissue: Key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab*;37:283-90.
118. Anderson EK, Gutierrez DA, Hasty AH. Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr Opin Lipidol*;21:172-7.
119. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumie A. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*. 2008;117:806-15.
120. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008;57:3239-46.
121. Feuerer M, Herrero L, Cipelletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009;15:930-9.
122. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB, Hotamisligil GS, Shi GP. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*. 2009;15:940-5.
123. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. 2009;58:718-25.
124. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007;56:2910-8.
125. Villaret A, Galitzky J, Decaunes P, Esteve D, Marques MA, Sengenès C, Chiotasso P, Tchkonja T, Lafontan M, Kirkland JL, Bouloumie A. Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes*;59:2755-63.

126. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175-84.
127. Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384:482-5.
128. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1304-10.
129. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009;15:914-20.
130. Dalmas E, Clement K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol*;32:307-14.
131. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;56:16-23.
132. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c⁺ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes*;59:1171-81.
133. Westcott DJ, Delproposto JB, Geletka LM, Wang T, Singer K, Saltiel AR, Lumeng CN. MGL1 promotes adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating 7/4hi monocytes in obesity. *J Exp Med*. 2009;206:3143-56.
134. Poitou C, Dalmas E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdenmour M, Kahn JF, Veyrie N, Rizkalla S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Clement K, Cremer I. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;31:2322-30.
135. Rogacev KS, Ulrich C, Blomer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Kohler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J*;31:369-76.
136. Zeyda M, Gollinger K, Kriehuber E, Kiefer FW, Neuhofer A, Stulnig TM. Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression. *Int J Obes (Lond)*;34:1684-94.
137. Morris DL, Singer K, Lumeng CN. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*;14:341-6.
138. Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*. 2008;8:301-9.
139. Li P, Lu M, Nguyen MT, Bae EJ, Chapman J, Feng D, Hawkins M, Pessin JE, Sears DD, Nguyen AK, Amidi A, Watkins SM, Nguyen U, Olefsky JM. Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *J Biol Chem*;285:15333-45.
140. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol*. 2009;51:212-23.
141. Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;42:880-5.
142. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005;11:183-90.

143. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:10741-6.
144. Obstfeld AE, Soguru E, Thearle M, Francisco AM, Gayet C, Ginsberg HN, Ables EV, Ferrante AW, Jr. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes*;59:916-25.
145. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2007;282:35279-92.
146. Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, Friedline RH, Kurt-Jones E, Finberg R, Fischer MA, Granger EL, Norbury CC, Hauschka SD, Philbrick WM, Lee CG, Elias JA, Kim JK. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*. 2009;58:2525-35.
147. Zhang X, Dong F, Ren J, Driscoll MJ, Culver B. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp Neurol*. 2005;191:318-25.
148. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146:4192-9.
149. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135:61-73.
150. Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, Wunderlich FT, Medzhitov R, Bruning JC. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab*. 2009;10:249-59.
151. Thaler JP, Choi SJ, Schwartz MW, Wise BE. Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: resolving the paradox. *Front Neuroendocrinol*;31:79-84.
152. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007;56:2356-70.
153. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Pirault J, Deswaerte V, Ginhoux F, E.R. M, Witztum JL, Chapman MJ, Lesnik P. Conventional Dendritic Cells at the Crossroads between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis. *Circulation*. 2009;119 accepted February 2009.
154. Dyer JS, Rosenfeld CR. Metabolic imprinting by prenatal, perinatal, and postnatal overnutrition: a review. *Semin*;29:266-76. Epub 2011 Jul 18.
155. Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature*.;467:963-6.
156. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000;21:697-738.
157. Lovejoy JC, Sainsbury A. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis. *Obes Rev*. 2009;10:154-67. Epub 2008 Oct 28.
158. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Piaggese L, De Simone L, Orlandi R, Genazzani AR. Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:414-7.
159. Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes*. 2009;58:803-12. Epub 2009 Jan 9.
160. Grove KL, Fried SK, Greenberg AS, Xiao XQ, Clegg DJ. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *Int J Obes*. 2010;34:989-1000.

161. Muraki K, Okuya S, Tanizawa Y. Estrogen receptor alpha regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes. *Endocr J*. 2006;53:841-51. Epub 2006 Sep 26.
162. Blouin K, Veilleux A, Luu-The V, Tchernof A. Androgen metabolism in adipose tissue: recent advances. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;301:97-103. Epub 2008 Nov 5.
163. Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ, Kaplitt MG, Ogawa S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2501-6. Epub 2007 Feb 6.
164. Calippe B, Douin-Echinard V, Laffargue M, Laurell H, Rana-Poussine V, Pipy B, Guery JC, Bayard F, Arnal JF, Gourdy P. Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol*. 2008;180:7980-8.
165. Douin-Echinard V, Laffont S, Seillet C, Delpy L, Krust A, Chambon P, Gourdy P, Arnal JF, Guery JC. Estrogen receptor alpha, but not beta, is required for optimal dendritic cell differentiation and [corrected] CD40-induced cytokine production. *J Immunol*. 2008;180:3661-9.
166. Soucy G, Boivin G, Labrie F, Rivest S. Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain. *J Immunol*. 2005;174:6391-8.
167. Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33:512-21.
168. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*. 2007;148:868-77.
169. Boehme SA, Lio FM, Maciejewski-Lenoir D, Bacon KB, Conlon PJ. The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol*. 2000;165:397-403.
170. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*. 2006;9:917-24.
171. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. 2006;116:115-24.
172. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006;116:1494-505.
173. Inouye KE, Shi H, Howard JK, Daly CH, Lord GM, Rollins BJ, Flier JS. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes*. 2007;56:2242-50.
174. Kirk EA, Sagawa ZK, McDonald TO, O'Brien KD, Heinecke JW. Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]. *Diabetes*. 2008;57:1254-61.
175. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139:485-98.
176. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, Geissmann F, Hedrick CC. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat Immunol*;12:778-85.
177. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*;89:557-63.

178. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol.* 2008;180:6941-6.
179. Daoudi M, Lavergne E, Garin A, Tarantino N, Debre P, Pincet F, Combadiere C, Deterre P. Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1. *J Biol Chem.* 2004;279:19649-57.
180. Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara Mel W, Seknadji P, McDermott DH, Debre P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadiere C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood.* 2001;97:1925-8.
181. Apostolakis S, Amanatidou V, Papadakis EG, Spandidos DA. Genetic diversity of CX3CR1 gene and coronary artery disease: new insights through a meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2009;207:8-15.
182. Sirois-Gagnon D, Chamberland A, Perron S, Brisson D, Gaudet D, Laprise C. Association of common polymorphisms in the fractalkine receptor (CX3CR1) with obesity. *Obesity (Silver Spring);*19:222-7.
183. Shah R, Hinkle CC, Ferguson JF, Mehta NN, Li M, Qu L, Lu Y, Putt ME, Ahima RS, Reilly MP. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes;*60:1512-8.

**Arteriosclerosis, Thrombosis,
and Vascular Biology**

ATVB/2011/239111

Supplemental Files? N

Article Type: Original Contribution

Downloaded on: September 22, 2011

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

Bcl-x inactivation in macrophages accelerates progression of advanced atherosclerotic lesions in Apoe^{-/-} mice.

Andrew I. U. Shearn^{1,2}, Virginie Deswaerte^{1,2,5}, Emmanuel L. Gautier¹, Flora Saint-Charles^{1,2}, John Pirault^{1,2}, Edmund B. Rucker III⁴, Sophie Beliard^{1,2,3}, John Chapman^{1,2}, Wendy. Jessup⁵, Thierry Huby^{1,2,3} and Philippe Lesnik^{1,2,3}.

¹ INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, F-75013, Paris, France

² UPMC Univ Paris 06, UMR-S 939, F-75013, Paris, France

³ AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Endocrinologie-Métabolisme, Paris, France

⁴ Animal Sciences Unit, University of Missouri, Columbia, USA;

⁵ Macrophage Biology Group, Centre for Vascular Research, University of New South Wales, Sydney, Australia.

Running title: Impact of macrophage apoptosis on atherosclerosis and plasma cholesterol levels

KEY WORDS

Atherosclerosis - macrophage - dendritic cells - survival - inflammation - cholesterol - apoptosis - cell death.

Word count: body (4752) abstract (216)

Number of figures: 4

Number of Tables: 1

Address correspondence to:

Dr Philippe Lesnik, INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, Pavillon Benjamin Delessert, 83 Boulevard de l'hôpital, F-75013, Paris, France

Tel: (33)-1-42177860; Fax: (33)-1-45828198; e-mail: philippe.lesnik@upmc.fr

Abstract

Background: Bcl-x is the most abundantly expressed member of the Bcl-2 gene family in macrophages but its role in macrophage apoptosis during atherogenesis is unknown.

Methods and results: We previously reported the dual role of macrophage survival in the development of atherosclerosis, perhaps reflecting growing impairment of efferocytosis during plaque progression. We specifically inactivated Bcl-x in macrophages and evaluated its impact on atherosclerotic lesion formation in Apoe^{-/-} mice at early and advanced stages of the disease. Bcl-x deficiency in macrophages increased susceptibility to apoptosis, resulting in the depletion of tissue macrophages *in vivo*, including its major pool, Küppfer cells. We also observed enhanced cholesterolemia that was however not associated with any acceleration of early atherosclerotic plaque progression, suggesting that the atheroprotective effect of macrophage apoptosis at that stage of disease was overwhelmed by enhanced cholesterol levels. Bcl-x^{KOmac}/Apoe^{-/-} mice exhibited significantly larger advanced lesions than control mice. These lesions showed vulnerable traits. Such enhanced lesion size may occur as a result not only of apoptotic cell accumulation but also of elevated cholesterol levels.

Conclusions: Modulation of macrophage resistance to apoptosis through targeted deletion of Bcl-x has a major impact on the entire macrophage cell population in the body, including Küppfer cells. Macrophage survival may, therefore, not only influence atherosclerotic plaque development and vulnerability but also cholesterol metabolism.

Introduction.

Chronic inflammation of the arterial wall is a fundamental feature of atherosclerosis and is characterized by the accumulation of low-density lipoproteins (LDL) and immune cells driving both innate and adaptive immunity¹. Monocytes that have been attracted to the inflamed vessel differentiate into macrophages, the major cell type found within atherosclerotic lesions. These macrophages then gorge themselves on cholesterol derived from modified LDL, which they esterify to neutralise the potentially cytotoxic and pro-apoptotic effects of free cholesterol². However, the accumulation of pro-inflammatory, pro-oxidizing and pro-apoptotic stimuli favors macrophage death, the formation of apoptotic debris and supports necrotic core growth³. This, in turn, may promote plaque disruption and severe thrombotic events in humans^{4, 5}. In support of this hypothesis, experimental evidence shows that vulnerable, necrotic plaques display increased macrophage apoptosis^{6, 7}. Given the potential consequences of macrophage apoptosis in advanced atherosclerotic lesions, determining the molecular mechanisms of macrophage death in advanced lesions is therefore a critical goal.

Macrophage death occurs at all stages of disease development⁸. However, it has been suggested that macrophage apoptosis may have a different impact on plaque progression depending on the stage of lesion development during which it occurs^{9, 10}. Accordingly, *in vivo* studies have shown that disruption of the gene coding for the pro-apoptotic molecule Bax resulted in an increase in early atherosclerotic lesions¹¹. It was also shown that disruption of the anti-apoptotic factor AIM attenuated early plaque formation¹². Our previous studies in which macrophage resistance to apoptosis was enhanced using macrophage-specific human Bcl-2 overexpression, have also shown accelerated early plaque development¹³. However, enhanced macrophage survival delayed advanced plaque progression, while chronic induction of apoptosis in established lesions resulted in the accumulation of apoptotic cells in advanced lesions and enhanced plaque progression¹³.

The relative level of expression of pro-apoptotic (e.g. Bax and Bak) and anti-apoptotic (e.g. Bcl-2 and Bcl-x) proteins of the Bcl-2 family determines the overall sensitivity of a cell to apoptotic stimuli¹⁴. In macrophages from atherosclerotic lesions there is essentially a complete lack of Bcl-2 and little Bcl-x¹⁵⁻¹⁷. There are also increased levels of the pro-apoptotic proteins Bad and Bax¹⁵⁻¹⁷. Cell culture studies have shown that Bcl-2 and Bcl-x may

be involved in the protection of macrophages against apoptosis¹⁸⁻²¹. However, one study evaluated the in vivo implication of Bcl-2 in the survival of macrophages and its consequences in atherosclerosis²². In this study, deletion of the floxed Bcl-2 gene was mediated by Cre recombinase under the control of the Lysozyme M gene, resulting in the deletion of Bcl-2 in differentiated macrophages, including those present in atherosclerotic lesions²². As Bcl-x may represent an alternative pathway to control macrophage survival, we chose to specifically investigate the impact of Bcl-x deficiency on plaque progression. We evaluated the impact of Bcl-x deletion both at early and advanced stages of the disease as apoptosis exerts different effects on atherogenesis as a function of lesion stage^{9, 13}. We addressed the question of the impact of macrophage Bcl-x on atherosclerotic lesion formation by crossing conditional Apoe^{-/-}/Bcl-x-floxed mice with Apoe^{-/-}/LysM^{Cre} mice. Using this model, we provide evidence that Bcl-x expression by macrophages plays an important protective role against apoptosis as its disruption resulted in reduction in these cells in tissues, in elevation in plasma cholesterol levels and in larger and more complicated advanced atherosclerotic lesions.

Materials and Methods.

Generation of Bcl-x^{flox:flox}-LysMCre Mice.

The floxed Bcl-x mice of mixed genetic background 129SvEv/C57BL6 were obtained from Dr. Edmund B. Rucker (University of Missouri, Columbia)²³. LysM-Cre mice in which Cre recombinase expression is driven by the lysozyme M promoter via gene targeting into the endogenous lysozyme M locus²⁴ were obtained from the Jackson Laboratory (Stock Number: 004781; backcrossed 6 times in C57BL6 genetic background). Multiple crosses of Bcl-x^{flox/flox} mice, with LysM^{cre/cre} mice and Apoe^{-/-} mice resulted in an almost pure C57BL/6 genetic background. Mice homozygous for Apoe^{-/-} and heterozygous for both Bcl-x^{flox/+} and LysM^{Cre/+}, were then bred with homozygous Bcl-x^{flox/flox}/Apoe^{-/-} mice to generate the mice used for this study. For the studies described herein, Bcl-x^{flox/flox}/LysM^{Cre/+}/Apoe^{-/-} were used as macrophage Bcl-x deficient mice while Bcl-x^{flox:flox}/Apoe^{-/-}, LysM^{Cre/+}/Apoe^{-/-} and Apoe^{-/-} were used as control mice.

Atherosclerosis studies

To assess the impact of macrophage Bcl-x on atherosclerosis progression, 7 weeks old Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-}, Bcl-x^{flox:flox}/Apoe^{-/-}, LysM^{Cre/+}/Apoe^{-/-} and Apoe^{-/-} mice were fed a 1%-

cholesterol rich diet (Harlan Teklad, TD97131) for 10 weeks, or a Western diet consisting of 0.15% cholesterol and 20% saturated fat (SAFE, France) for 10 or 27 weeks.

Plasma lipid analyses, quantification of atherosclerotic lesions, TUNEL staining, immunohistochemistry, analysis of gene expression by Q-PCR, Isolation of liver leukocytes and of peritoneal macrophages, flow cytometry. and generation of bone marrow-derived macrophages (BMDM). All these procedures were performed as previously described^{13, 25-27} and are detailed in the Supplemental Methods Section.

Statistical analysis.

Statistical calculations were performed using GraphPad Prism, version 4.03. Results were analyzed by Student's unpaired *t*-tests with Welch's correction if variances were unequal. $p < 0.05$ was considered significant.

Results.

Generation and characterization of macrophage-specific Bcl-x deficiency.

Mice in which exons 1 and 2 of the Bcl-x gene were flanked with loxP sites were crossed with mice expressing Cre recombinase under the control of the lysozyme M gene to generate mice in which Bcl-x was deleted in macrophages^{22, 24, 28}. DNA recombination was confirmed in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages in which the wild-type allele was almost undetectable. When backcrossed into an Apoe^{-/-} background, Bcl-x^{KO Mac} mice exhibited no obvious developmental or morphological abnormalities. To confirm Bcl-x deletion, Bcl-x mRNA levels were measured in bone marrow derived macrophages (BMDM) from Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice and Apoe^{-/-} mice by RT-PCR. mRNA expression of Bcl-x in BMDM of Bcl-x^{KO Mac} mice was 0.002% of that of controls ($P < 0.000001$) while expression of Bcl-2 was increased two-fold in Bcl-x^{KO Mac} macrophages ($P < 0.01$) (Fig. 1A). The mRNA levels of the proapoptotic genes Bad, Bax and Bid were similar in BMDM from Bcl-x^{KO Mac} mice and controls (Fig. 1A). Despite up-regulation of Bcl-2, BMDM derived from Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice were markedly more susceptible to free cholesterol-induced apoptosis when incubated

with Ac-LDL and an ACAT inhibitor ($P < 0.01$, fig. 1B), arguing for a pivotal role of Bcl-x in free-cholesterol induce apoptosis. Similarly, freshly harvested peritoneal macrophages, and cultured peritoneal and pulmonary macrophages from Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice were more susceptible to apoptosis induced by serum starvation as compared to Apoe^{-/-} mice (Supplemental fig.1A). In addition, we assessed leukocyte and monocyte subset counts on the different groups of mice maintained under both chow diet and cholesterol-rich diet. In female mice fed a chow diet, we found that such cell counts were not altered in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice as compared to wild type Apoe^{-/-} mice (Fig. 1C-D). By contrast, under the cholesterol-rich diet, we observed that the leukocyte count was 30% higher in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice than in Apoe^{-/-} mice (Fig. 1C). As observed in other studies, the cholesterol-rich diet induced monocytosis (30% higher in controls) which was more severe in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice (150% higher) and was linked to increase in the Gr1^{high} monocyte subset (Fig. 1D). The possibilities of gender differences related to the effect of Bcl-x deficiency were excluded; indeed, a similar leukocyte and monocyte pattern was observed in males (Supplemental fig. 1B-C).

Impact of macrophage-specific Bcl-x deletion on atherogenesis and cholesterol levels.

Based on our previous observations showing that increased survival of macrophages results in larger early lesions but smaller advanced lesions, we decided to use a complimentary strategy and assessed the impact of macrophages more susceptible to stress-induced death on lesion progression. For this purpose, Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice and controls were fed cholesterol-enriched diets for 10 (0.15% and 1% cholesterol) or 27 (0.15% cholesterol) weeks. Unexpectedly, we observed higher plasma cholesterol levels in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice compared to Apoe^{-/-} controls at all time points and under all diets, including the basal conditions (chow diet fed mice) (Table 1 and supplemental table 1). However, after 10 weeks of diet, aortic root lesion area was similar in both Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice and controls fed a 0.15% (Fig. 2A) or a 1% cholesterol-enriched diet (Fig. 2B). As expected, early lesion area was larger in mice fed a 1% cholesterol-enriched diet compared to those fed a 0.15% cholesterol-enriched diet (Fig. 2A-B); 128 000 μm^2 versus 292 000 μm^2 in control females ($P < 0.004$). As previously reported^{8, 13, 29}, no TUNEL⁺ cells were present in these early lesions (data not shown). This suggests an efficient removal of apoptotic cells at this stage of the disease. Seventeen additional weeks on a 0.15% cholesterol-enriched diet resulted in larger (>10-fold) and more complicated lesions with necrotic core formation. At this time point, en

face analysis of the descending aorta showed that lesion areas were 51% larger ($P < 0.006$) in females and 25% larger ($P < 0.04$) in males in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice relative to controls (Fig. 3A). In contrast to the 10 week time point, the mean area of the aortic root lesion in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice was 27% larger compared to controls after 27 weeks of diet ($P < 0.02$, Fig. 3C).

We next quantified TUNEL-positive cells in advanced lesions (27 weeks). At 27 weeks of diet, we observed a 3-fold increase in the number of apoptotic cells per lesion in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice compared to controls ($P < 0.006$, Fig. 3E), corresponding to a 3-fold increase in apoptotic cell content per mm^2 of lesion ($P < 0.04$, Fig. 3F). As macrophages undergoing apoptosis in advanced plaques might likely contribute to necrotic core formation, an indice of plaque instability, we measured acellular areas in our animals and observed that the necrotic area was 60% larger in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice compared to controls ($P < 0.0001$, fig. 3G). Collagen content, also indicative of plaque stability, was decreased by 35% in the aortic sinus of $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ compared to $Apoe^{-/-}$ control mice ($P < 0.02$, Fig. 3H). In males, changes in plaque size (Fig. 2B, Fig. 3A) and in plasma cholesterol (Supplemental Table 1) were comparable to that observed in females (Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 3A, Fig 3C, Table 1) suggesting that the impact of Bcl-x deficiency was not gender specific as previously reported for macrophage Bcl-2 deficiency in $Bcl-2^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice²². No significant differences in body weight were observed between genotypes at any time point for both males and females (Table 1 and Supplemental Table 1).

Impact of macrophage-specific Bcl-x deletion on gene expression and leukocytes in the liver.

To further document mechanisms by which Bcl-x deficiency in macrophages might affect plasma cholesterol levels, we extracted mRNA from liver of mice fed a 0.15% cholesterol (Fig. 4) or a 1% cholesterol-enriched diet for 10 weeks to perform quantitative RT-PCR. Levels of mRNA for Bcl-x were decreased in the liver of $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice as compared to controls but significant changes were only observed in mice fed the 0.15% cholesterol-enriched diet (Fig 4A; supplemental Fig. 2A). As expected, levels of mRNA for Lysozyme M were significantly decreased (-39%) in $LysM^{cre/wt}/Apoe^{-/-}$ mice as compared to control mice that did not express the Cre recombinase ($Bcl-x^{fllox/fllox}/Apoe^{-/-}$ and $Bcl-x^{wt/wt}/Apoe^{-/-}$ mice) reflecting a decrease in Lysozyme M expression due to its heterozygous form in $LysM$ -Cre positive cells. An additional decrease was observed in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$

mice reflecting both the former mechanism and an additional depletion of macrophages expressing Lysosyme M (-78%, $p < 0.0001$, Fig. 4A). A similar pattern of expression was observed in mice maintained on 1% cholesterol-enriched diet (Supplemental Fig. 2A). mRNAs coding for the mononuclear cell markers CD68 and F4/80 were significantly decreased (-32% and -24%, respectively) in the liver of $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice compared to controls (Fig. 4A, Supplemental Fig. 2A). We also evaluated the expression of several genes implicated in lipid homeostasis in the liver. As shown in Figure 4C, the expression levels of LDL-R, ABCG1 and SR-A were significantly decreased (-29%, -40% and -29% respectively) while those of ACAT-2, LXR α , ABCA1, and SR-BI were similar in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ and control mice. A similar pattern of expression was observed in mice maintained on 1% cholesterol-enriched diet (Supplemental Fig. 2B). We were also able to demonstrate an ongoing inflammatory process in the liver of $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice as there was significant upregulation of MCP-1 mRNA in comparison to controls, indicative of the activation of endothelial cells and macrophages (Figure 4D). Flow cytometric analysis revealed that the K \ddot{u} ppfer cell population (resident macrophage population of the liver) was significantly reduced (-27%, $P < 0.01$) in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice compared to controls, while the DC population was unaffected (Fig. 4E). Interestingly, a 2.2 fold increase in MHC Class II positive liver leukocytes was observed in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice as compared with controls (Fig. 4E; $P < 0.0003$).

Discussion.

Given the crucial role of macrophages the maintenance of homeostasis and the regulation of innate immune responses, the regulation of their life span is critical in both physiological and pathological processes. Macrophage survival depends on multiple pro- and anti-apoptotic molecules, among which the anti-apoptotic protein Bcl-x is hypothesized to be critically involved both in monocyte/macrophage differentiation and survival, both in humans and mice¹⁸⁻²¹. Our experimental model, in which macrophages specifically lack Bcl-x, further emphasize the critical involvement of Bcl-x in the protection of macrophages from apoptosis. Indeed, we demonstrated that expression of Bcl-x is almost abolished in BMDM from $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice resulting in poor resistance to apoptotic stress in vitro. In vivo, we noticed a clear depletion of kupffer cells, the liver resident macrophages, as shown by the reduction in expression of mRNA encoding genes mainly associated with macrophages (LysM, SR-A, ABCG1, CD68, and F4/80) in the liver of $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice when

compared to controls. Of note, the reduction of Bcl-x expression was compensated by changes in the expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2 as observed in BMDM, but not to an extent that afford protection against apoptosis.

Our data clearly show a significant effect of Bcl-x deficiency in macrophages on circulating cholesterol levels of mice maintained on chow-, and cholesterol-enriched diets. Interestingly, these observations are consistent with earlier observations in both mice and humans, which also suggest a role for mononuclear phagocytes in cholesterol homeostasis. For example, the hematopoietic growth factor macrophage colony-stimulating factor (M-CSF or CSF-1) was reported to lower cholesterol levels in rabbits and non-human primate models^{30, 31}. At the opposite, *op/op* mice harbouring a mutation in the *csf1* gene, which results in a reduction in monocyte and several tissue macrophage populations such as K uppfer cells³², present a marked hypercholesterolemia when backcrossed in an *apoE*-deficient background (reference)³³. We also previously observed a similar phenotype in *CD11c-DTR ApoE^{-/-}* mice in which a transient elimination of DCs increased plasma cholesterol levels²⁷. Taken together, these observations indicate that mononuclear phagocytes may directly or indirectly influence cholesterol homeostasis. The mechanisms responsible for the increase in total plasma cholesterol levels in *Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-}* mice were not explored in the framework of this study, and the deficiency in *ABCG1* mRNA in the liver may likely not contribute to the elevation of circulating cholesterol levels as *ABCG1* deficiency in bone marrow derived macrophages was not shown to be associated with enhanced cholesterol levels^{34, 35}. The lower expression of *ABCG1* mRNA may likely reflect the depletion of K uppfer cells as it is primarily expressed by these cells in the liver³⁶.

As macrophage apoptosis has been shown to limit the development of early atherosclerotic lesions^{11-13, 37, 38}, we would have expected a protective effect in early lesions in *Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-}* mice. However, due to concomitant elevation in plasma cholesterol in *Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-}* mice, the protective effect of increased macrophage death may have been overwhelmed by the hypercholesterolemia observed in these mice. The absence of TUNEL positive cells in the lesions of *Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-}* and control mice may reflect efficient efferocytosis at this stage^{39, 40}. Thus, Bcl-x might still play an important role in the control of macrophage survival in early lesions.

In advanced lesions, Bcl-x deficiency in macrophages was associated with larger lesion size in *Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-}* mice as compared to *ApoE^{-/-}* lesions. This finding was associated with a

higher frequency of apoptotic cells, a larger necrotic core area and a lower collagen content in the lesions of Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice. Interestingly, all these features are indicative of enhanced plaque vulnerability and further support the concept that apoptosis of macrophages favours necrotic core growth. In this model, we cannot distinguish the respective contribution of higher cholesterol levels or of higher susceptibility of macrophages to apoptosis in lesion development in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice during the period of advanced plaque growth. However, irrespective of the role of higher cholesterol levels, this might not always be correlated to plaque growth⁴¹. The depletion of macrophages seems to occur in the latter stages of the disease as we observed lower macrophage content in livers and spleens of 1 year old Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice as compared to controls (data not shown). These results are consistent with our previous observations indicating that macrophage apoptosis in advanced lesions is pro-atherogenic¹³.

In summary, the present study confirms that macrophage apoptosis appears to be more important in advanced rather than early lesions development, thereby providing a rationale for the association between apoptotic cell accumulation, necrotic core formation and resulting vulnerable traits. In the quest to identify specific molecular targets and processes that would target the growth of vulnerable lesions, our data suggest that sustaining Bcl-x levels in macrophages would be beneficial both in reducing apoptotic macrophage accumulation in advanced atherosclerotic plaques and maintaining cholesterol homeostasis in the liver, supporting the concept of cross-talk between innate immunity and metabolism.

Acknowledgments.

A.S. was supported by a Fellowship from GlaxoSmithKline. This work was supported by an Award to P.L. from The Fondation de France. T.H. and P.L. gratefully acknowledge the award of a "Contrat d'Interface" by the Assistance Publique - Hôpitaux de Paris/INSERM.

Disclosures.

None.

References.

1. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*;12:204-212.
2. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516.
3. Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol*. 1996;149:367-380.
4. Virmani R, Burke AP, Kolodgie F. Morphological characteristics of coronary atherosclerosis in diabetes mellitus. *Can J Cardiol*. 2006;22 Suppl B:81B-84B.
5. Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J, Virmani R. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol*. 2000;157:1259-1268.
6. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7:330-335.
7. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1370-1380.
8. Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2005;111:1814-1821.
9. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2255-2264.
10. Stoneman V, Braganza D, Figg N, Mercer J, Lang R, Goddard M, Bennett M. Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ Res*. 2007;100:884-893.
11. Liu J, Thewke DP, Su YR, Linton MF, Fazio S, Sinensky MS. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:174-179.
12. Arai S, Shelton JM, Chen M, Bradley MN, Castrillo A, Bookout AL, Mak PA, Edwards PA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Miyazaki T. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development. *Cell Metab*. 2005;1:201-213.
13. Gautier EL, Huby T, Witztum JL, Ouzilleau B, Miller ER, Saint-Charles F, Aucouturier P, Chapman MJ, Lesnik P. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation*. 2009;119:1795-1804.
14. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:647-656.
15. Kockx MM, De Meyer GR, Buysse N, Knaapen MW, Bult H, Herman AG. Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res*. 1998;83:378-387.
16. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998;97:2307-2315.
17. Saxena A, McMeekin JD, Thomson DJ. Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax, and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens. *J Pathol*. 2002;196:335-342.

18. Lin H, Chen C, Chen BD. Resistance of bone marrow-derived macrophages to apoptosis is associated with the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in primary cultures of bone marrow cells. *Biochem J.* 2001;353:299-306.
19. Zhang J, Li Y, Yu M, Chen B, Shen B. Lineage-dependent NF-kappaB activation contributes to the resistance of human macrophages to apoptosis. *Hematol J.* 2003;4:277-284.
20. Sevilla L, Zaldumbide A, Carlotti F, Dayem MA, Pognonec P, Boulukos KE. Bcl-XL expression correlates with primary macrophage differentiation, activation of functional competence, and survival and results from synergistic transcriptional activation by Ets2 and PU.1. *J Biol Chem.* 2001;276:17800-17807.
21. Busca A, Saxena M, Kryworuchko M, Kumar A. Anti-apoptotic genes in the survival of monocytic cells during infection. *Curr Genomics.* 2009;10:306-317.
22. Thorp E, Li Y, Bao L, Yao PM, Kuriakose G, Rong J, Fisher EA, Tabas I. Brief report: increased apoptosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} mice lacking macrophage Bcl-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:169-172.
23. Wagner KU, Claudio E, Rucker EB, 3rd, Riedlinger G, Broussard C, Schwartzberg PL, Siebenlist U, Hennighausen L. Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development.* 2000;127:4949-4958.
24. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 1999;8:265-277.
25. Gautier EL, Huby T, Ouzilleau B, Doucet C, Saint-Charles F, Gremy G, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced immune system activation and arterial inflammation accelerates atherosclerosis in lupus-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1625-1631.
26. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol.* 2008;180:6941-6946.
27. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Pirault J, Deswaerte V, Ginhoux F, Miller ER, Witztum JL, Chapman MJ, Lesnik P. Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation.* 2009;119:2367-2375.
28. Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000371.
29. Kolodgie FD, Petrov A, Virmani R, Narula N, Verjans JW, Weber DK, Hartung D, Steinmetz N, Vanderheyden JL, Vannan MA, Gold HK, Reutelingsperger CP, Hofstra L, Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation.* 2003;108:3134-3139.
30. Shimano H, Yamada N, Motoyoshi K, Matsumoto A, Ishibashi S, Mori N, Takaku F. Plasma cholesterol-lowering activity of monocyte colony-stimulating factor (M-CSF). *Ann N Y Acad Sci.* 1990;587:362-370.
31. Stoudemire JB, Garnick MB. Effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor on plasma cholesterol levels. *Blood.* 1991;77:750-755.
32. Witmer-Pack MD, Hughes DA, Schuler G, Lawson L, McWilliam A, Inaba K, Steinman RM, Gordon S. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J Cell Sci.* 1993;104 (Pt 4):1021-1029.

33. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Lusis AJ, Rajavashisth TB. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 1997;150:1687-1699.
34. Out R, Jessup W, Le Goff W, Hoekstra M, Gelissen IC, Zhao Y, Kritharides L, Chimini G, Kuiper J, Chapman MJ, Huby T, Van Berkel TJ, Van Eck M. Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circ Res.* 2008;102:113-120.
35. Westerterp M, Koetsveld J, Yu S, Han S, Li R, Goldberg IJ, Welch CL, Tall AR. Increased atherosclerosis in mice with vascular ATP-binding cassette transporter G1 deficiency--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;30:2103-2105.
36. Ye D, Hoekstra M, Out R, Meurs I, Kruijt JK, Hildebrand RB, Van Berkel TJ, Van Eck M. Hepatic cell-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter profiling identifies putative novel candidates for lipid homeostasis in mice. *Atherosclerosis.* 2008;196:650-658.
37. Merched AJ, Williams E, Chan L. Macrophage-specific p53 expression plays a crucial role in atherosclerosis development and plaque remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1608-1614.
38. van Vlijmen BJ, Gerritsen G, Franken AL, Boesten LS, Kockx MM, Gijbels MJ, Vierboom MP, van Eck M, van De Water B, van Berkel TJ, Havekes LM. Macrophage p53 deficiency leads to enhanced atherosclerosis in APOE*3-Leiden transgenic mice. *Circ Res.* 2001;88:780-786.
39. Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res.* 2007;73:470-480.
40. Tabas I. Apoptosis and efferocytosis in mouse models of atherosclerosis. *Curr Drug Targets.* 2007;8:1288-1296.
41. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8264-8268.

Table 1. Body weight and lipid parameters.

<i>Females on ApoE^{-/-} background</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Bcl-x^{KO Mac}</i>	<i>P</i>
<i>7 week old females on chow diet</i>	n=37	n=31	
Weight, g	16.5 ± 0.4	17.4 ± 0.5	NS
Total cholesterol, mg/dl	400 ± 16	523 ± 24	<0.00004
Free cholesterol, mg/dl	135 ± 6	172 ± 7	<0.0002
Triglycerides, mg/dl	158 ± 16	161 ± 15	NS
<i>17 week-old females maintained for 10 weeks on a 1% cholesterol rich diet</i>	n=23	n=20	
Weight at sacrifice, g	18.2 ± 0.4	19.29 ± 0.6	NS
Total cholesterol, mg/dl	1129 ± 83	1701 ± 71	<0.00001
Free cholesterol, mg/dl	355 ± 29	493 ± 34	<0.003
Triglycerides, mg/dl	80 ± 5	92 ± 7	NS
<i>34 week-old females maintained 27 weeks on a 0.15% cholesterol rich diet</i>	n=9	n=8	
Weight at sacrifice, g	24.4 ± 0.9	21.8 ± 1.2	NS
Total cholesterol, mg/dl	717 ± 56	1060 ± 84	<0.002
Free cholesterol, mg/dl	242 ± 19	328 ± 24	<0.01
Triglycerides, mg/dl	52 ± 8	86 ± 14	NS

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Characterization of mononuclear cells in Bcl-x null Apoe^{-/-} mice. Levels of anti-apoptotic genes measured in bone marrow-derived macrophages (BMDM) from Bcl-x^{KO} Mac/Apoe^{-/-} mice and Apoe^{-/-} mice by RT-PCR (A). Peritoneal macrophages from control (Bcl-x^{flox/flox}/Apoe^{-/-} and LysM^{Cre/+}/Apoe^{-/-}) and Bcl-x^{KO} Mac/Apoe^{-/-} mice were incubated under FC-loading conditions and analyzed for apoptosis by TUNEL staining. The percentage of apoptotic cells stimulated by treatment with Ac-LDL (50µg/ml) and an ACAT inhibitor (10µg/ml; S58035 Sandoz) is the ratio of TUNEL positive cells relative to DAPI positive cells (B). Quantitative analysis of circulating leukocytes (C) and monocyte subsets (D) in female mice maintained on chow diet or 1% cholesterol-enriched diet for 10 weeks. Values represent mean ± SEM of 15-20 mice per group. Statistically significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.00001$.

Figure 2. Quantification of early atherosclerotic lesions in aortic roots of mice. Mice were maintained on 0.15% (A) or 1% cholesterol-rich diet (B) for 10 weeks. Values represent the mean ± SEM of 10 mice per group.

Figure 3. Images and quantification of lesion surface, necrotic area, apoptotic cells and collagen content of advanced atherosclerotic lesions in mice fed a Western diet for 27 weeks. Quantification of lesions in aortic arch and thoracic aorta (A, B) and aortic roots (C, D) of Bcl-x^{KO} Mac/Apoe^{-/-} and Apoe^{-/-} mice. Females are shown in figures B to I. The ratio of TUNEL positive cells per aortic root section (E), per Oil red O-positive staining areas were calculated for each mouse (F). Plaque necrosis was quantified by measuring the DAPI-negative acellular areas in the intima (G). Collagen content was assessed by Sirius Red staining (H, I). Photographs illustrate representative staining (D and I). Values represent the mean ± SEM of 8 mice per group. Statistically significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.0001$.

Figure 4. Quantification of hepatic mRNA and leukocyte content in female mice fed a 0.15% cholesterol atherogenic diet. Levels of mRNA expression of functional markers of the genetic ablation carried out (A), mononuclear phagocytes (B), cholesterol metabolism (C) and inflammatory markers (D) were evaluated by qPCR in the livers of Bcl-x^{KO} Mac/Apoe^{-/-} and Apoe^{-/-} mice fed a Western diet for 10 weeks. Relative mRNA expression of each gene

was normalized to the average expression of three housekeeping genes (beta-glucuronidase, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and ribosomal protein S3). Flow cytometric analysis of isolated liver leukocytes (KC: kuppfer cells; DC: dendritic cells) (E). Values represent the mean \pm SEM of 10 mice per group. Statistically significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.0001$

Supplemental Table 1. Body weight and lipid parameters.

<i>Males on ApoE^{-/-} background</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Bcl-x^{KO}Mac</i>	<i>P</i>
<i>7 week old males on chow diet</i>	n=16	n= 27	
Weight, g	19.8 ± 0.9	18.5 ± 0.5	NS
Total cholesterol, mg/dl	468 ± 21	595 ± 29	<0.002
Free cholesterol, mg/dl	165 ± 6	197 ± 35	<0.006
Triglycerides, mg/dl	316 ± 17	259 ± 23	NS
<i>17 week old males maintained for 10 weeks on a 1% cholesterol rich diet</i>	n=12	n=23	
Weight at sacrifice, g	20.9 ± 0.8	21.7 ± 0.4	NS
Total cholesterol, mg/dl	1195 ± 80	1706 ± 81	<0.0003
Free cholesterol, mg/dl	347 ± 23	457 ± 19	<0.001
Triglycerides, mg/dl	87 ± 8	88 ± 7	NS
<i>34 week old males maintained for 27 weeks on a 0.15% cholesterol rich diet</i>	n=8	n=12	
Weight at sacrifice, g	32.5 ± 1.1	29.9 ± 1.0	NS
Total cholesterol, mg/dl	873 ± 62	1134 ± 75	<0.03
Free cholesterol, mg/dl	277 ± 21	351 ± 23	<0.04
Triglycerides, mg/dl	104 ± 22	107 ± 10	NS

Supplemental Table 2. Q-PCR Primers

Gene Accession Number	Sense Primer	Antisense Primer
Bcl-xL NT_039207.7	5'-CCCCACCACAACCTCTCTCTT-3'	5'-TCCCTACACACCCCTCTCTG-3'
LysM NT_039500	5'-AAAACCCCAAGAGCTGTGAAT-3'	5'-GAATGCCTTGGGGATCTCTC-3'
CD68 NT_096135	5'-TTGGGAACTACACGTGGGC-3'	5'-CGGATTTGAATTTGGGCTTG-3'
F4/80 NT_039649	5'-AGTACGATGTGGGGCTTTTG-3'	5'-CCCCATCTGTACATCCCACT-3'
LDL-R NT_039472	5'-CACTCACTGGTGACCGAAA-3'	5'-CATTGACATCGATGCTGGAG-3'
ACAT-2 NT_039472	5'-GTATTTGCAACGGAGGAGGA-3'	5'-GCCCAAGGGAGTCACATTTA-3'
LXR α NM_00177730.1	5'-AATCGAGGTCATGCTTCTGG-3'	5'-TGGAGAACTCAAAGATGGGG-3'
ABCA1 NT_109315	5'-GGCTGTCCAATTTTGTCTGG-3'	5'-TAGAACGGGCAGGTTGGTAG-3'
ABCG1 NT_039649	5'-AGGTCTCAGCCTTCTAAAGTTCCTC-3'	5'-TCTCTCGAAGTGAATGAAATTTATCG-3'
SRA NT_039460	5'-CTGGACAAACTGGTCCACCT-3'	5'-GTCCCCGATCACCTTTAACA-3'
SRBI NT_039313	5'-GCTGCGCTCGGCGTTGTCAT-3'	5'-GGGACGGGATCTCCTTCCA-3'
MCP-1 NT_096135	5'-CCCTGTCATGCTTCTGGG-3'	5'-GGATCATCTTGCTGGTGAATG-3'
Bcl-2 NT_078297	5'-AGAGCGTCAACAGGGAGATG-3'	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'
IFN γ NT_039500	5'-GAGGAACTGGCAAAAGGATG-3'	5'-GTTGCTGATGGCCTGATTG-3'
IL-1 β NT_039207	5'-TGTAATGAAAGACGGCACACC-3'	5'-TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG-3'
Stat-3 NT_165773	5'-GGAAATAACGGTGAAGGTGCT-3'	5'-CATGTCAAACGTGAGCGACT-3'
HPRT NT_039702	5'-TGACACTGGTAAAACAATGC-3'	5'-AACACTTCGAGAGGTCCTTT-3'
β -gus NT_039314	5'-CTCATCTGGAATTTCCGCGA-3'	5'-GGCGAGTGAAGATCCCCTTC-3'
RPS3 NT_039433	5'-ATCAGAGAGTTGACCGCAGTTG-3'	5'-AATGAACCGAAGCACACCATA-3'
Bid NT_039353.7	5'-TCACAGACCTGCTGGTGTTC-3'	5'-GTCTGGCAATGTTGTGGATG-3'
Bad NT_039687	5'-AGGACTTATCAGCCGAAGCA-3'	5'-GCTCAAACCTCTGGGATCTGG-3'
Bax NT_039424.7	5'-TGGAGATGAACTGGACAGCA-3'	5'-GAAGTTGCCATCAGCAAACA-3'

Supplemental Figure 1. Susceptibility of macrophages to apoptosis and quantitative analysis of circulating leukocytes and monocyte subsets in male mice. Fresh peritoneal macrophages isolated from control Apoe^{-/-} and Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice were serum starved for 4 hours and analyzed for apoptosis by flow cytometry. Peritoneal and pulmonary macrophages isolated from control Apoe^{-/-} and Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice were cultured for 6 days, then serum-starved for 24 hours and analyzed for apoptosis by TUNEL staining (A). Quantitative analysis of total circulating leukocytes (B), monocytes and individual monocyte subsets (C) in the different groups of male mice maintained under both non-inflammatory (chow diet) and atherosclerotic conditions (cholesterol-rich diet). Values represent the mean ± SEM of a minimum of 15-20 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.05, ** *P*<0.01 and *** *P*<0.001.

Supplemental Figure 2. Quantification of hepatic mRNA in female mice fed a 1% cholesterol-enriched diet. Levels of mRNA expression of functional markers of the genetic ablation (A), mononuclear phagocytes (A), cholesterol metabolism (B) were evaluated by qPCR in the livers of Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} and Apoe^{-/-} mice fed a cholesterol diet for 10 weeks. Relative expression of each gene was normalized to the average expression of mRNA for three housekeeping genes (beta-glucuronidase, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and ribosomal protein S3). Values represent the mean ± SEM of 10 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.01, ** *P*<0.001.

Fig. 1

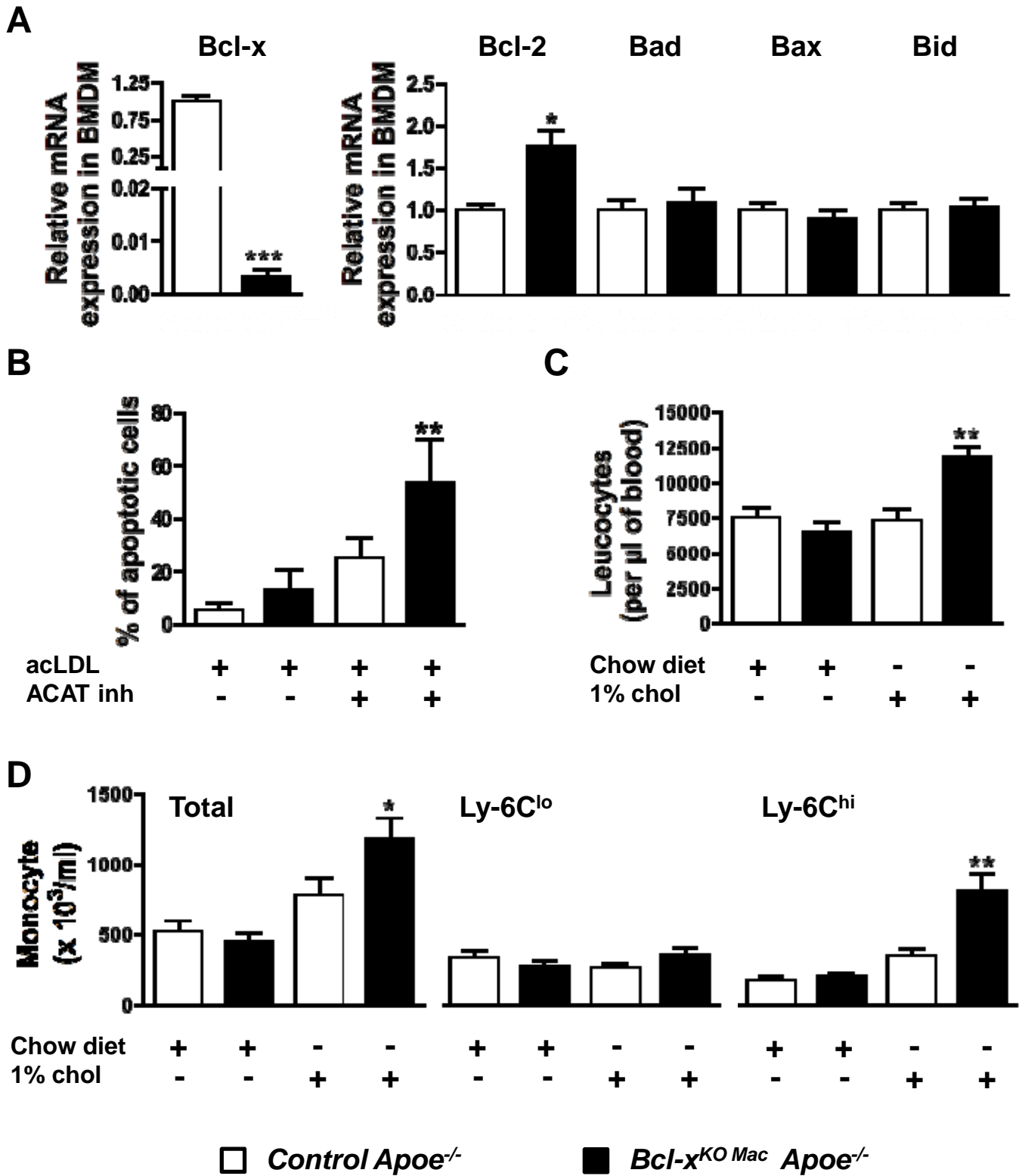


Fig. 2

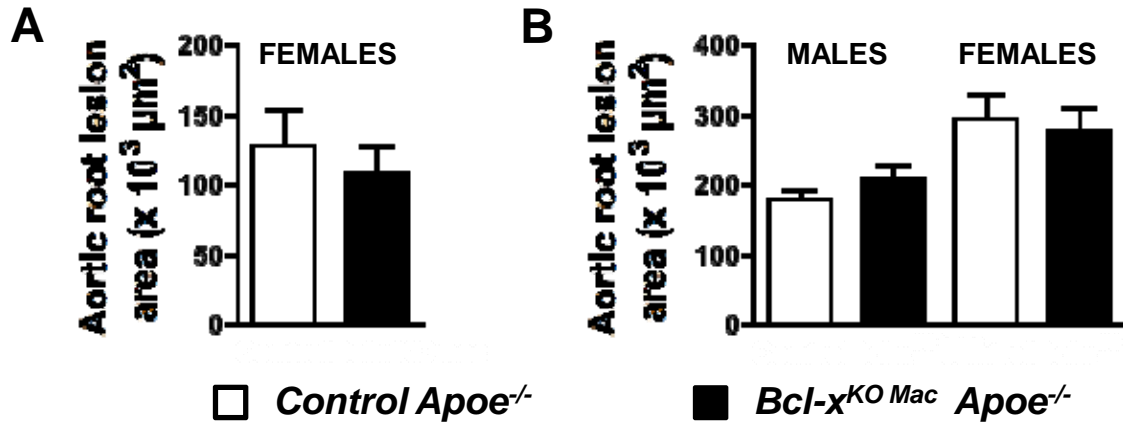


Fig. 3

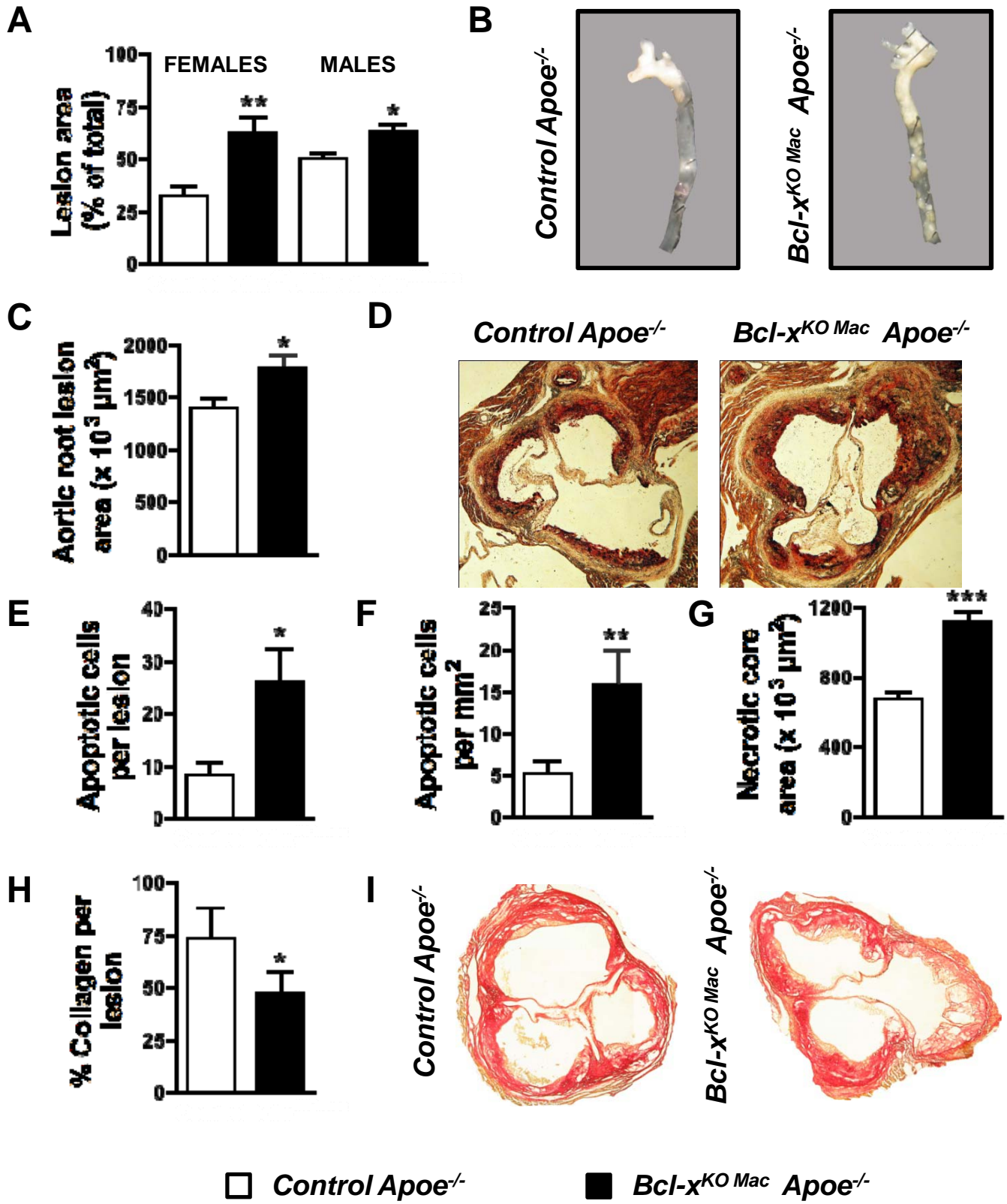
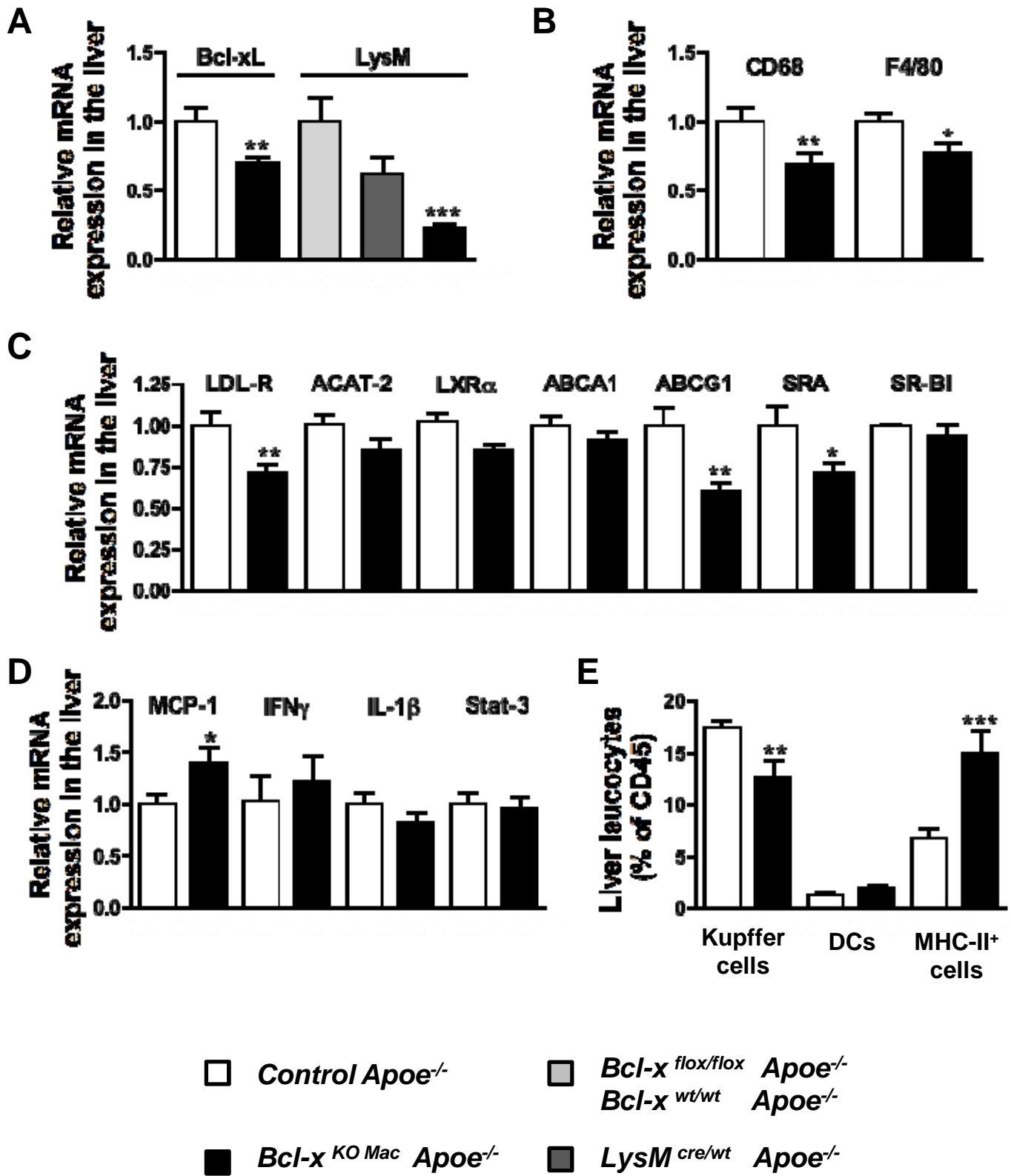
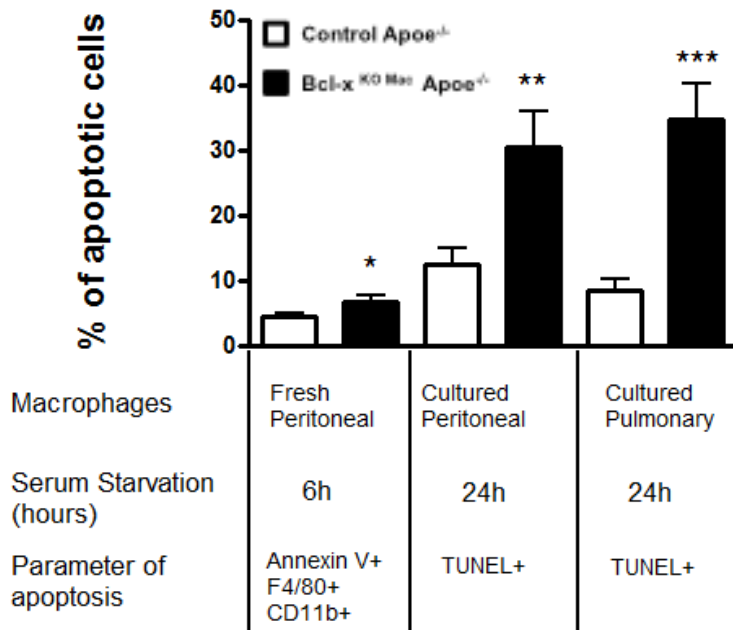


Fig. 4

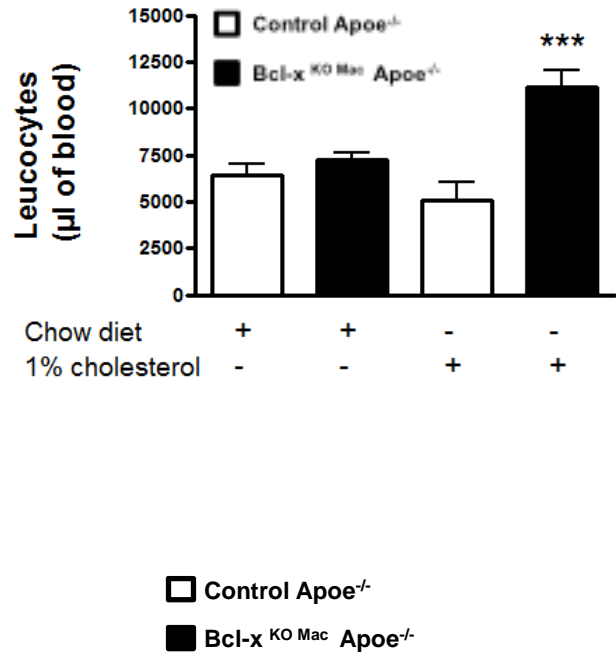


Supplemental Fig. 1

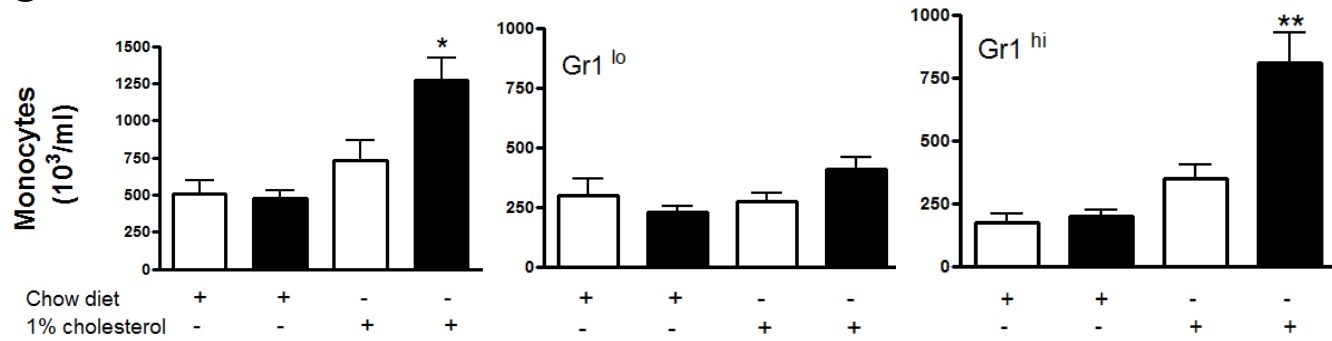
A



B

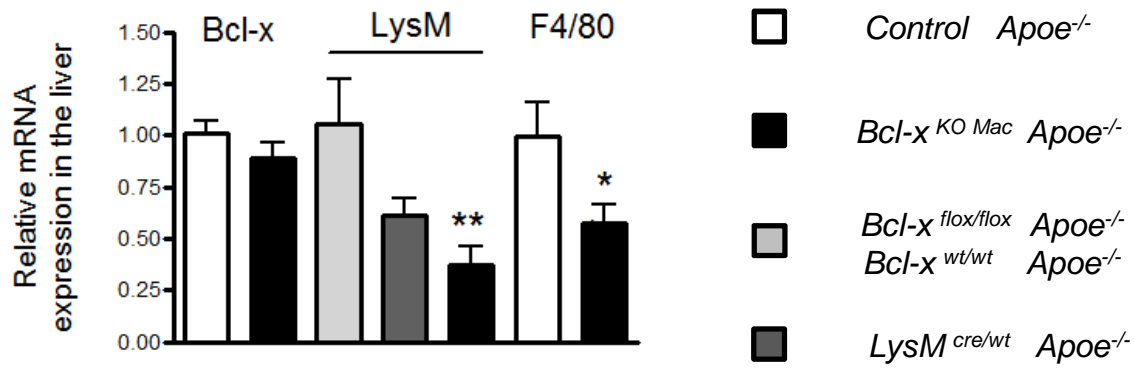


C

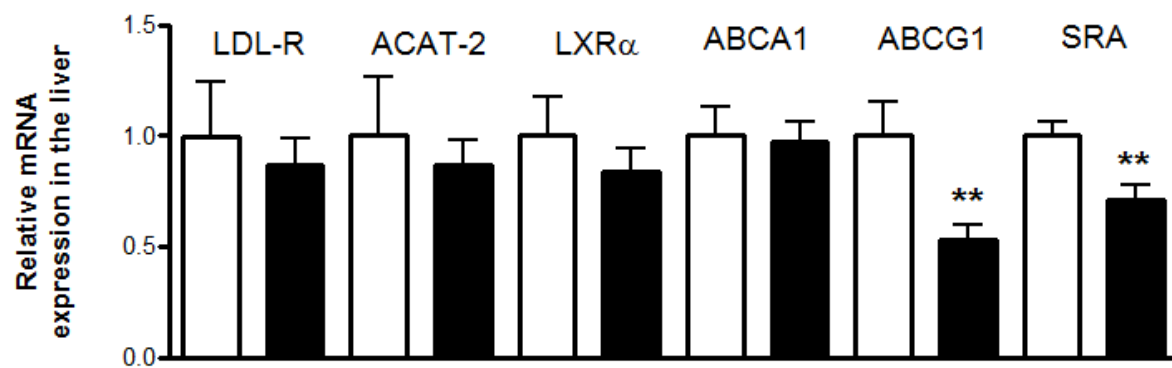


Supplemental Fig. 2

A



B



Influence of dendritic cells on cholesterol absorption and excretion

Virginie Deswaerte^{1,2,5}, Thierry Huby^{1,2,3,4}, Flora Saint-Charles^{1,2}, Nicolas Proschogo⁵, John Chapman^{1,2}, Sophie Beliard^{1,2,3,4}, John Pirault^{1,2}, Philippe Lesnik^{1,2,3,4} and Wendy Jessup⁵

¹ INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, F-75013, Paris, France

² UPMC Univ Paris 06, UMR-S 939, F-75013, Paris, France

³ AP-HP, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Endocrinologie-Métabolisme, F-75013, Paris, France

⁴ The ICAN Institute of CardioMetabolism and Nutrition F-75013, Paris, France

⁵ Macrophage Biology Group, Centre for Vascular Research, University of New South Wales, Sydney, Australia.

Running title: Impact of DCs on plasma cholesterol levels

KEY WORDS

Atherosclerosis - dendritic cells - survival - cholesterol - macrophage -

Word count: body (?) abstract (?)

Number of figures: 6

Number of Tables: 2

Address correspondence to: Dr Philippe Lesnik, INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, Pavillon Benjamin Delessert, 83 Boulevard de l'hôpital, F-75013, Paris, France, Phone: (33)-1-42177876; Fax: (33)-1-45828198; e-mail: philippe.lesnik@upmc.fr. **Or to:** Dr Wendy Jessup, Macrophage Biology Group, Centre for Vascular Research, University of New South Wales, Sydney, Australia, Phone: (61)-293851219; Fax: (61)-293851389; e-mail: w.jessup@unsw.edu.au.

Abstract

Background: Dendritic cells (DCs) are central to the regulation of immunity, the polarization of the immune response, and the induction of tolerance to antigens. However they also have a key role in the development of atherosclerosis through both regulation of the accumulation of lipid in the earliest stages of plaque formation and in the regulation of plasma cholesterol levels. The mechanisms whereby they regulate the cholesterolemia remains to be defined.

Methods and Results: We used an apolipoprotein E deficient background mouse model in which the lifespan and immunogenicity of DCs are enhanced by specific overexpression of the antiapoptotic gene hBcl-2 under the control of the CD11c promoter. CD11c-hBcl2 mice exhibited an expanded DC population in the spleen (a major lymphoid organ) and in the liver and the small intestine (the two main organs involved in the cholesterol metabolism). This increase in DC populations was associated with decreased plasma cholesterol levels. This was also associated with an increase in fecal sterol excretion and decreases in cholesterol absorption and fecal bile acid excretion. CD11c-hBcl2 mice also exhibited organ-specific enhanced T-cell activation, with a polarization to a T-helper 1, T-helper 2 and Th17 cytokine expression profile in the spleen and a T-helper 17 cytokine expression profile in the small intestine. In addition, an elevated level of regulatory T cell differentiation cytokine expression profile was observed in both organs. Unlike in the spleen and in the small intestine, the enhanced DC population did not appear to influence T cell profile in the liver and suggest a tolerization profile.

Conclusions: Taken together, the present data reveal that DCs are central to the atherosclerotic process, because they are directly implicated in both cholesterol turnover and immune response.

Introduction

Cholesterol is an important constituent of all mammalian cell membranes and it is also the precursor of steroid hormones and bile salts ¹. However, high cholesterol levels are a major risk factor for cardiovascular disease (CVD) and promote the development of atherosclerosis. The active management of plasma cholesterol is therefore a major target in the prevention and treatment of CVD. Atherosclerosis is characterized by the accumulation of lipids, fibrous elements and immune cells in the intima of arteries ². It is now recognized that development of atherosclerotic lesions is directly linked to an immuno-inflammatory response, characterized by the recruitment of various populations of leucocytes including monocytes, macrophages and dendritic cells (DCs) ^{3, 4}. As a major regulator of the immune response, DCs are potentially a key player in atherosclerosis. DCs are the major antigen-presenting cells in the immune system. They can induce the innate immune response, but they are also able to trigger the adaptive immune response ^{5, 6}. DCs are able to secrete inflammatory cytokines, stimulate B cells, T cells, natural killer T cells and they can induce T cell differentiation into T-helper 1 (Th1), T-helper 2 (Th2) and Th17 phenotypes ⁷. DCs are also able to generate regulatory T cells (Treg) to favor tolerance to antigens ⁸. DCs are distributed through all organs and they are also present in atherosclerotic plaques ⁹⁻¹¹ where they appear to have a key role in the regulation of the accumulation of lipid in the earliest stages of plaque formation ^{12, 13}. It has recently been demonstrated that experimentally induced changes in DC numbers directly impacts plasma cholesterol levels ¹⁴. For example in a CD11c-hBcl-2 apoE ^{-/-} transgenic mouse model, characterized by an increase in DC survival and numbers, plasma cholesterol was reduced relative to apoE ^{-/-} controls ¹⁴. Similar decreases in plasma cholesterol have also been observed in rabbits ¹⁵ and in patients with aplastic anemia ¹⁶ or coronary artery disease ¹⁷ following administration of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a key factor for DC growth and differentiation ¹⁸. These observations indicate that DCs may, directly or indirectly, influence cholesterol homeostasis.

In the present study, we demonstrate that an expanded DC population and related reduction in plasma cholesterol levels are associated with a decrease in dietary cholesterol absorption and an increase in fecal sterol excretion. Those observations were associated with a modification of the expression of genes involved in cholesterol metabolism in the liver and in the small intestine, the major tissues involved in

cholesterol homeostasis. In addition, we found that the increase of DC population drive Th17 differentiation in the spleen and the small intestine that have recently been shown to have an impact on lipid metabolism.

Materials and Methods

Animals and bone marrow transplantation

For bone marrow transplantation, apoE^{-/-} mice (on a C57BL/6 background) were supplied from the Animal Resources Centre (Perth, Western Australia). Female apoE^{-/-} mice (5-6 weeks old) were subjected to medullar aplasia with 9 Gray lethal total body irradiation. The next day, femur bone marrow was isolated from donor CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} or WT apoE^{-/-} mice and 2.5-3×10⁶ bone marrow cells were injected via the tail vein into the irradiated mice to rescue their hematopoietic systems. Mice were housed in cages under air-filtered conditions and supplemented with antibiotics (penicillin (100 U/ml) + streptomycin (100 µg/ml)) in the drinking water for 4 weeks, to allow the hematopoietic system to reconstitute. They were fed a normal chow diet to 20-24 weeks of age. All animal procedures were performed in strict compliance with animal welfare regulations and protocols were approved by the University of New South Wales Animal Care and Ethics Committee, (Sydney, Australia) and with accreditation from the French government.

Plasma lipid analysis, tissues cholesterol extraction, measure of intestinal cholesterol absorption, measure of fecal sterol and bile acids excretion, isolation of leukocytes from spleen, liver and small intestine for flow cytometry analysis and analysis of gene expression by Q-PCR were performed as previously described^{14, 19-21} and detailed in the Supplemental Materials and Methods section.

Statistical analysis

Data are presented as mean +/- SEM. The statistical significance of the differences between groups was tested by the Student's t-test for unpaired data. A difference was considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

CD11c-hBcl2 mice exhibit a greater number of dendritic cells in spleen, liver and small intestine.

We have previously shown that DCs of CD11c-hBcl-2 mice overexpress hBcl-2 protein and display enhanced resistance to apoptotic stress ¹⁴. As a consequence of their increased survival, the relative numbers of DCs are increased *in vivo* ¹⁴. In the present study we confirmed that the DC populations were enriched in the spleen, liver and small intestine from CD11c-hBcl-2/ apoE^{-/-} mice, relative to apoE^{-/-} controls (Figure 1). This increase was accompanied by splenomegaly but no change in the liver or small intestine size (data not shown). As shown in Figure 1A, the percentage of conventional DCs (cDCs) and myeloid DCs (mDCs) but not plasmacytoid DCs (pDCs) was higher in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} spleen relative to the apoE^{-/-} controls (of note: pDCs express intermediate level of CD11c). Expression of the activation marker CD80 was also increased in the spleen (data not shown). In the liver (Figure 1B), higher levels of cDCs but not mDCs was found in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} animals, whereas in the small intestine (Figure 1C) in both cDCs and mDCs were higher. The DC proportion of tissue leucocytes was much higher in the intestine with (9-15% of cDCs and 6-12% of mDCs) compared to the spleen (4-6% of cDCs and 1.5-2.5% of mDCs) and the liver (2-3% of cDCs and 1% of mDCs) in both control and CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} model, consistent with previous observations ²². Because macrophages may also express CD11c ^{23, 24}, we separately assessed the percentage of macrophages (defined by the membrane co-expression of CD45, F4/80 and CD11b) present in the spleen, liver and intestine (Figure 1D). The results showed no significant increase in the macrophage population in any of these organs in CD11c-hBcl2 mice. Based on these results, we concluded that CD11c-hBcl-2 mice exhibit a significant and specific elevation in the DC populations of all tissues studied.

CD11c-hBcl2 mice exhibit a lower plasma cholesterol level.

The impact of an increased DC population on plasma and tissue cholesterol levels was evaluated in CD11c-hBcl-2/apoE^{-/-} transgenic and apoE^{-/-} control mice on a normal chow diet. As shown in Figure 2A, CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice exhibited a statistically significant 10.4% decrease in total plasma cholesterol concentration relative to controls. No statistical differences in plasma free cholesterol or triglycerides concentrations were found. This difference found in total cholesterol is similar to that observed previously ¹⁴.

Tissue cholesterol levels were measured in the spleen, the liver and the small intestine. No difference in any organs was found between CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice and control apoE^{-/-} mice in total cholesterol, free cholesterol or cholesteryl ester concentrations (Figure 2B). However, because the spleens were bigger in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice, when cholesterol levels were expressed per whole organ, rather than per tissue weight, total and free cholesterol contents were higher in the spleens, but not in the other organs, of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice (Supplemental Table 1).

Enhanced DC lifespan modifies cholesterol turnover.

To understand mechanisms behind the observed decrease in plasma cholesterol levels in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice, we measured fecal sterol excretion (Figure 3A), intestinal cholesterol absorption (Figures 3B, 3C) and bile acid excretion (Figure 3D). We measured a 16.8% increase in total fecal sterol excretion in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice relative to controls. This effect was mostly due to a significant increase in excretion of coprostanol, which is formed from cholesterol in the gut by intestinal bacterial flora. We also measured a smaller and non-significant increase in cholesterol excretion and a significant decrease in epicoprostanol excretion, another minor gut-derived derivative of cholesterol. A non-significant decrease of cholestanone was also observed in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice compared to the control.

Cholesterol absorption measured by dual isotope labeling showed a small but significant decrease of 3.8% for CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice relative to apoE^{-/-} mice, which was reflected in a greater amount of ¹⁴C cholesterol was found in feces of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice 24h after gavage (Figure 3C).

Consistent with reduced cholesterol absorption, fecal bile acid levels were also significantly lower in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice, which excreted 23.6% less bile acids compared to apoE^{-/-} control mice. Taken together, these results showed that enhanced DC levels are associated with reduced cholesterol absorption, possibly related to reduced intestinal bile acid content. It is likely that reduced intestinal sterol absorption contributes to the observed decrease in plasma cholesterol levels in the CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice.

Enhanced DC lifespan induce modification of genes expression involved in cholesterol metabolism.

To further understand the impact of altered DC populations on cholesterol turnover in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice, we measured liver (Figures 4A, 4C) and small intestine (Figures 4B, 4D) mRNA expression for a range of genes involved in cholesterol metabolism. While many genes associated with cholesterol transport were unaltered in liver (Figure 4A) we observed significant increases in expression of ABCG5 and SR-B1 and decreased expression of low density lipoprotein receptor (LDLr) mRNA levels in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} liver relative to controls. No changes were observed in ABCA1, ABCG1, ABCG8, CD36 and NPC1L1 mRNA expression. In the small intestine, a similar large increase in expression of ABCG5 and SRBI was observed, together with a large increase in NPC1L1 expression and a smaller, but significant, increase in ABCA1, in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice relative to apoE^{-/-} controls (Figure 4B). In intestine, the expression of ABCG1, ABCG8, CD36 and LDLr did not change. These data suggest that the uptake and export of cholesterol in the liver and in the small intestine were modified by altered DC levels. The fact that tissue cholesterol levels were similar between groups is consistent with unchanged expression of several cholesterol-dependent genes, such as ABCG1.

Expression levels of genes involved in cholesterol synthesis revealed a modest but significant increase of hydroxymethyl-glutaryl CoA reductase (HMGCOAR) mRNA in the liver and a large (3-fold) increase in the small intestine of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice, relative to controls. The expression of sterol regulatory element binding protein (SREBP)-2 also increased in the small intestine but not in the liver and the expression of SREBP1 was lower in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} liver but remained unchanged in the small intestine (Figures 4C, 4D).

Analysis of the expression of PCSK9 and nuclear receptors involved in cholesterol metabolism in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} compared to controls showed a range of significant but minor changes in both liver and small intestine, except for LXR α and RXR. LXR α was reduced by 50% in liver and increased in the small intestine, while RXR, which heterodimerises with several other orphan nuclear receptors such as the PPARs, LXRs and FXR, was increased in the small intestine but not in the liver.

In the liver, we observed a small decrease in the mRNA level of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) and no change in sterol 27-hydroxylase (CYP27) expression, together with a decrease level of bile salt export pump (BSEP) mRNA in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice compared to ApoE^{-/-} control mice. These genes are key control points in

hepatic bile acid synthesis and export. In the small intestine, the expression of the ileal sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2) remained unchanged.

Taken together, these results suggest that increasing the size of the DC population induces changes in the expression of genes involved in the absorption and the excretion of cholesterol and also in cholesterol synthesis itself.

Effect of enhanced DC lifespan on T cells responses.

Because DCs might induce the activation and recruitment of T cells, including T regulatory cells, we investigated T cell populations in spleen and intestine (Figures 5A, 5D) of CD11c-hBcl-2/apoE^{-/-} and apoE^{-/-} control mice. The data revealed that the percentage of activated T helper cells decreased non-significantly in the spleen (Figure 5A) and in the small intestine (Figure 5D) of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice compared with controls whereas the percentage of activated cytotoxic T cells was lower in the small intestine of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice. A non-significant increase in T regulatory cells was found in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} spleens compared with apoE^{-/-} controls.

We also measured the mRNA expression of key mediators of T cell responses induced by DCs (Figures 5B, 5C, 5E). Enhanced expression of interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-12p40 and TIM-3 (T-cell immunoglobulin- and mucin-containing molecule, a transcription factor promoting Th1 development) was found in the spleen of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice, relative to controls (Figure 5B). In contrast, expression of Th1 markers IFN γ and IL-12p40 was lower in liver (Figure 5C) and small intestine (Figure 5E) of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice relative to controls, and levels of TIM3 were comparable. Levels of GATA-3 mRNA (a transcription factor promoting Th2 development), were increased in the spleen, decreased in the liver and were unchanged in the small intestine (Figures 5B, 5C, 5E).

Unchanged level of STAT3 and IL-23p19 but a large increase in the levels of transforming growth factor- β (TGF β), IL-6 (factor promoting Th17 development) and IL-17 mRNA^{25, 26} were found in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} spleen (Figure 5B). No changes were found for any of Th17 markers in the liver (Figure 5C) between CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} and apoE^{-/-} control mice, whereas an increase in the expression of STAT3, TGF β , IL-6 and IL-17 but not IL-23p19 was found in the small intestine of CD11c-hBcl-2 / apoE^{-/-} mice compared to the controls (Figure 5E).

Analysis of the expression of key markers of regulatory T cells (Treg) showed no changes in Foxp3 but a large increase of TGF- β and IL-10 in the spleen of CD11c-hBcl-2

apoE^{-/-} mice relative to controls (Figure 5B). In the liver, the expression of Foxp3 was reduced in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice and no changes were found in the expression of TGFβ and IL-10 (Figure 5C). In the small intestine, an increase in TGFβ was found, but a decrease in Foxp3 expression and no changes in IL-10 expression were observed in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice compared with controls (Figure 5E). In addition, an increase of CCR9, receptor involved in T cells migration to the small intestine, target of retinoic acid²⁷ was observed in the small intestine of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice compared with controls mice (Figure 5E).

Expression levels of classic inflammatory genes revealed elevated levels of tumor necrosis factor-α (TNFα) mRNA but similar levels of IL-1β mRNA in the spleens of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice compared with controls (Figure 5B). In the liver, comparing CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice and apoE^{-/-}, the same levels of expression of TNFα and IL-1β were found (Figure 5C) whereas an increase in those two markers was observed in the small intestine (Figure 5E) of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice.

The mRNA expression of IL-15, characteristic of proliferation and differentiation of NK cells, T and B cells and maintenance of cytotoxic memory T cells²⁸, was significantly increased in the spleen of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice (Figure 5A). In contrast, no differences in IL-15 mRNA expression were measured in the liver (Figure 5C) and in the intestine (Figure 5E).

Taken together, these data suggest that an enhanced DC population in the spleen induces an inflammatory response and leads to a complex profile of T cell responses with a polarization toward a Th1, Th2 and Th17 profile that might be regulated by the induction of Treg differentiation driven by DCs. These results are consistent with those of Gautier et al.¹⁴. By contrast, the enhanced DC population does not appear to induce any T cell response or an inflammatory response in the liver. In the small intestine, DCs appear to induce an inflammatory response associated with a Th17 response which might drive Treg differentiation via the release of TGFβ and retinoic acid, that could down-regulate Th1 and Th2 responses. In addition, the liver and the small intestine have in common a decrease in Th1 markers, so a mechanism of tolerance may be induced in those two organs by the increased of DC numbers.

Discussion

By examining the relationship between DC lifespan and actors of cholesterol metabolism, we discovered that an increase of DC numbers has an effect on cholesterol turnover, increasing fecal sterol excretion and reducing cholesterol absorption and fecal bile acid excretion. We also found that DCs have an organ-specific impact on T cell development.

The major finding in the CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice model is that of the increase of DC numbers induced a 10% decrease of plasma cholesterol levels. This is similar to that observed previously in the same model on both Ldlr^{-/-} and apoE^{-/-} backgrounds where 22% and 14% decreases, respectively, in plasma cholesterol levels were observed on a chow diet¹⁴. Surprisingly, this was not associated with a decrease in cholesterol concentration in any of the organs tested (spleen, liver and small intestine). We also found that the increase in DC numbers was associated with an increase of total fecal sterol excretion and a decrease in cholesterol absorption and fecal bile acid excretion, which may be related to the observed decrease of plasma cholesterol.

The increase in fecal sterol excretion could be due to an increase of cholesterol secretion in the bile. The elimination of cholesterol from liver into the bile represents the major route for the reverse cholesterol transport (RCT) pathway and it is possible that an increase in the DC population could increase the rate of cholesterol excretion. Consistent with this, liver ABCG5 expression was increased in CD11c-hBcl-2 animals and this transporter is known to be involved in biliary cholesterol excretion²⁹⁻³². We also observed an increase in liver SR-B1 expression. Increased expression of SR-B1 is reported to markedly reduce plasma high-density lipoprotein (HDL) levels and increase biliary secretion of cholesterol^{33, 34}. In addition, it has been shown that SR-B1 expression has an atheroprotective effect^{35, 36}. Further study is required to directly measure biliary cholesterol output.

The increase of total fecal sterol excretion in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice could also be due to stimulation of an alternative pathway called transintestinal cholesterol excretion (TICE)³⁷. TICE is proposed as a mechanism of direct secretion of plasma cholesterol into the intestinal lumen, stimulated by activation of LXR³⁸. This pathway is suggested to contribute significantly to the total fecal sterol excretion³⁹ and to involve ABCG5/ABCG8 heterodimers. Consistent with this, we observed small but significant

increases in LXR, RXR and ABCG5 expression in the small intestine of CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice.

Once in the gut, cholesterol is partially converted into coprostanol, epicoprostanol and cholestanone by intestinal microorganisms. In CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice we observed a significant increase in fecal coprostanol (the major fecal cholesterol metabolite) but paradoxically decreased levels of the minor metabolites (epicoprostanol and cholestanone). It has been shown in studies comparing ileal tissue from germ-free and Bacteroidetes thetaiotaomicron-colonized mice that microbial colonization modifies the expression of genes involved in lipid and vitamin absorption and processing ⁴⁰. In addition, recent studies in both mice and humans demonstrated that obesity is associated with an altered gut microbial ecology, exemplified by lower microbial diversity ⁴¹⁻⁴⁴. This might reflect a DC-dependent modification of the intestine flora, as it is known that intestinal DCs acquire unique properties to maintain a balance between tolerance to commensal bacteria and immunity to episodic pathogens ^{45, 46}.

Cholesterol absorption takes place in the small intestine by passage of cholesterol across the enterocyte brush border membrane, mediated by NPC1L1, SR-B1 and CD36 ^{47, 48}. Surprisingly, decreased cholesterol absorption in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice was associated with increased NPC1L1 and SR-B1 expression. This may be explained by a corresponding large increase in the expression of ABCG5 and a smaller increase in ABCG1, both implicated in the transport of cholesterol from the enterocyte back into the intestinal lumen ⁴⁹⁻⁵¹. The large increase in IL-6 expression in the small intestine could up-regulate ABCA1 expression as well ⁵². The fact the HMGCoAR expression was strongly increased in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} intestine suggests that some cells in this tissue are cholesterol-depleted, even though overall we detected no change in intestinal cholesterol levels.

As part of the RCT pathway, cholesterol can be converted into bile acids in the liver and secreted into the bile duct, before being reabsorbed in the intestine or excreted in the feces. In CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice we observed a significant decrease in fecal bile acid excretion. This could be due to a decrease of primary bile acid (β -muricholic and cholic) synthesis in the liver and a corresponding decrease of their export. Indeed, we saw a decrease of CYP7A1 mRNA expression, which is the key regulatory enzyme in the classic pathway, catalyzing the initial step of conversion of cholesterol into 7 α -hydroxy-

cholesterol⁵³. Primary bile acids are usually excreted into the bile via BSEP⁵⁴; the small but significant decrease of BSEP expression we observed in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice could reduce this excretion. Interestingly, the expression of CYP7A1 and BSEP genes are both stimulated by LXR α ⁵⁵, whose expression is significantly reduced in the CD11c-hBcl-2 liver. Similar results were found in another study⁵⁶, using CYP7A1 deficient mice, who measured unchanged hepatic cholesterol synthesis, decrease in hepatic LDL receptor expression and decreased fecal bile acids but increased fecal sterol excretion. In contrast, this was associated with hypercholesterolemic effect of CYP7A1 deficiency, which is the opposite of what we found. So the decrease in plasma cholesterol level observed in our study is probably due to multiple effects of DCs on lipid metabolism. In future studies it will be useful to also measure protein expression of some of the key mediators of cholesterol metabolism, as there are multiple examples of post-translational regulation of proteins involved in cholesterol metabolism.

An alternative mechanism that was not directly measured in this study but could explain the decrease in fecal bile acids excretion, is that bile acid reabsorption is increased in the CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice. Normally about 95% of liver-derived bile acids are reabsorbed in the small intestine via the apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT,SLC10A2) located on the apical membrane of the ileal enterocyte⁵⁷ and the rest is excreted in the feces⁵⁸.

During the enterohepatic circulation, intestinal bacteria modify primary bile acid structures, which yields secondary bile acids, such as lithocholic, α -muricholic, hyodeoxycholic, deoxycholic, chenodeoxycholic or ursodeoxycholic acids^{59, 60}. The significant modification in the proportions of deoxycholic, chenodeoxycholic, lithocholic and ursodeoxycholic excreted in our model are consistent with our suggestion that the increased DC numbers may induce a modification of the intestine bacterial flora.

DCs are major regulators of immune responses and T cells polarization. Indeed, DCs play crucial roles in eliciting effector T cell responses, primarily the CD4⁺ T helper subsets and cytotoxic CD8⁺ T cells that display proatherogenic properties. In contrast, DCs are also implicated in the generation of regulatory T cells that inhibit the activation/proliferation of other T cells⁶¹⁻⁶⁴. Therefore enhanced numbers of DCs in tissues might change T cell functions and polarizations and this might impact directly or indirectly plasma cholesterol levels. Such effects were previously reported for T cells,

which were proposed to control cholesterol homeostasis in a lymphotoxin beta receptor-dependent manner ⁶⁵.

In our study, we found that enhanced DC lifespan in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} mice, which led to an increase in DC numbers in spleen, liver and small intestine, also leads to organ specific T cell responses. In the spleen, which is a lymphoid organ, we observed an increase in mRNA expression of key markers of Th1 response (IFN γ , IL-12p40 and TIM3), Th17 (IL-17, TGF β and IL-6) response, usually associated with antigen-specific autoimmune diseases ⁶⁶ and a small increase of GATA-3 involved in Th2 response. This is consistent with the finding of another study which also induced an enhanced DC lifespan by depleting Bim ⁶⁷. This group found an expansion of the DC population and enhanced immunogenicity, as revealed by a major impact on T cell activation. In addition, large increases of TGF β and IL-10 mRNA expression, but surprisingly not in Foxp3 (usually associated with the development of Treg cells), were observed in CD11c-hBcl-2 apoE^{-/-} spleen. Those cells could counterbalance the effect of Th1 and Th2 responses.

In the liver and in the small intestine, the profile of T cell responses was different to that seen in the spleen. The enhanced DC lifespan did not appear to induce any significant T cell activation in the liver, and was consistent with the slight decrease in expression of mRNA seen for IFN γ , IL-12p40, Foxp3 and GATA-3. By contrast, in the small intestine DCs appeared to induce a Th17 response. Indeed, the cytokine profile was in favor of a Th17 development that would be mediated by TGF β and IL-6 ²⁵ and would be further enhanced by TNF α and IL-1 β ^{68, 69}.

Interestingly, it has recently been shown that small intestine Th17 cells acquire a regulatory phenotype (rTh17) and, like Treg cells, were able to suppress proliferation of responder T cells ⁷⁰. In addition, the increase of CCR9 mRNA expression in the small intestine could be due to the capacity of intestinal DCs to produce retinoic acid (RA) from vitamin A ⁷¹ which is present in the diet. It has been shown that DC-derived RA induces the expression of CCR9 by lymphocytes and mediates the recruitment of Treg, CD4⁺ and CD8⁺ T cells ^{27, 72, 73}. It has also been shown that small intestine DCs themselves are able to express CCR9 and this expression is inversely proportional to the activation state of DCs ^{74, 75}. As we did not observe an increase of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the small intestine, we could hypothesize that the increase of CCR9 mRNA expression in our model was due to increased numbers of tolerogenic DCs.

All together, our results support the potential existence of DCs expressing high levels of CCR9 and of regulatory Th17 cells which would explain the paradoxical decreased numbers of T helper cell in CD11c-hBcl-2 small intestine. Further study is required to directly measure these cells in the intestine.

In summary, our results indicate that the decreased levels of cholesterol observed in our mice model that displays enhanced numbers of DCs is potentially due to a combination of events that include: enhanced fecal cholesterol excretion, decreased intestinal cholesterol absorption and decreased fecal bile acid excretion. Overall the tissue specific transcription profile did not identify a classical molecular pathway that would explain the global changes in plasma cholesterol levels. Furthermore, as enterobacteria catalyze specific modifications of bile acids and sterol, we identified changes in bile acids- and cholesterol derived- intermediate products that might reflect changes in the gut microbiota suggesting that DCs might interfere with the composition of gut microbiota.

Acknowledgements

Funding was provided by NHMRC grants to WJ. We gratefully acknowledge the assistance of Erwin Lee, Ingrid Boehm (Children's Cancer Institute, Sydney), Sian Cartland (Centre for Vascular Research, UNSW), Soo Min Heng and Dean Inwood (Department of Radiation Oncology, Prince of Wales Hospital, Sydney) in bone marrow transplantation and Kerry-Ann Rye and Liminog Hou (Heart Research Institute, Sydney) for analysis of plasma lipids. This work was supported by an Award to P.L. from The Fondation de France. T.H. and P.L. gratefully acknowledge the award of a "Contrat d'Interface" by the Assistance Publique - Hôpitaux de Paris/INSERM

References

1. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):112-124.
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407():233-241.
3. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med.* 2002;8(11):1218-1226.
4. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 2002;91(4):281-291.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
6. Steinman RM. Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med.* 2007;13(10):1155-1159.
7. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:621-667.
8. Groux H, Fournier N, Cottrez F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2004;16(2):99-106.
9. Choi JH, Do Y, Cheong C, Koh H, Boscardin SB, Oh YS, Bozzacco L, Trumpfheller C, Park CG, Steinman RM. Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J Exp Med.* 2009;206(3):497-505.
10. Bobryshev YV, Taksir T, Lord RS, Freeman MW. Evidence that dendritic cells infiltrate atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Histol Histopathol.* 2001;16(3):801-808.
11. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 2007;117(1):185-194.
12. Paulson K, Zhu S, Chen M, Nurmohamed S, Jongstra-Bilen J, Cybulsky M. Resident Intimal Dendritic Cells Accumulate Lipid and Contribute to the Initiation of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2010;106(2):383-390.
13. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* 2002;17(2):211-220.
14. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Pirault J, Deswaerte V, Ginhoux F, Miller ER, Witztum JL, Chapman MJ, Lesnik P. Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation.* 2009;119(17):2367-2375.
15. Ishibashi T, Yokoyama K, Shindo J, Hamazaki Y, Endo Y, Sato T, Takahashi S, Kawarabayashi Y, Shiomi M, Yamamoto T, et al. Potent cholesterol-lowering effect by human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rabbits. Possible implications of enhancement of macrophage functions and an increase in mRNA for VLDL receptor. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(10):1534-1541.
16. Nimer SD, Champlin RE, Golde DW. Serum cholesterol-lowering activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *JAMA.* 1988;260(22):3297-3300.
17. Zbinden S, Zbinden R, Meier P, Windecker S, Seiler C. Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for

- collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(9):1636-1642.
18. Hanada K, Tsunoda R, Hamada H. GM-CSF-induced in vivo expansion of splenic dendritic cells and their strong costimulation activity. *J Leukoc Biol.* 1996;60(2):181-190.
 19. Kritharides L, Jessup W, Gifford J, Dean RT. A method for defining the stages of low-density lipoprotein oxidation by the separation of cholesterol- and cholesteryl ester-oxidation products using HPLC. *Anal Biochem.* 1993;213(1):79-89.
 20. Miettinen TA, Ahrens EH, Jr., Grundy SM. Quantitative Isolation and Gas--Liquid Chromatographic Analysis of Total Dietary and Fecal Neutral Steroids. *J Lipid Res.* 1965;6:411-424.
 21. Borgstrom B. Quantification of cholesterol absorption in man by fecal analysis after the feeding of a single isotope-labeled meal. *J Lipid Res.* 1969;10(3):331-337.
 22. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204(8):1775-1785.
 23. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest.* 2007;117(1):89-93.
 24. Randolph GJ. Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2008;19(5):462-468.
 25. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441(7090):235-238.
 26. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24(2):179-189.
 27. Mebius RE. Vitamins in control of lymphocyte migration. *Nat Immunol.* 2007;8(3):229-230.
 28. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(8):595-601.
 29. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(25):16237-16242.
 30. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 2000;290(5497):1771-1775.
 31. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002;277(21):18793-18800.
 32. Yamanashi Y, Takada T, Yoshikado T, Shoda J, Suzuki H. NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. *Gastroenterology.* 2011;140(5):1664-1674.
 33. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL, Tall AR. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem.* 1999;274(47):33398-33402.

34. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*. 1997;387(6631):414-417.
35. Huby T, Doucet C, Dacet C, Ouzilleau B, Ueda Y, Afzal V, Rubin E, Chapman MJ, Lesnik P. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest*. 2006;116(10):2767-2776.
36. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(3):721-727.
37. Brufau G, Groen AK, Kuipers F. Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1726-1733.
38. Van Der Veen JN, Van Dijk TH, Vrans CLJ, Van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, Tietge UJF, Groen AK, Kuipers F. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(29):19211-19219.
39. van der Velde AE, Vrans CL, van den Oever K, Kunne C, Oude Elferink RP, Kuipers F, Groen AK. Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology*. 2007;133(3):967-975.
40. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001;291(5505):881-884.
41. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-11075.
42. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-1023.
43. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3(4):213-223.
44. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Mariat D, Corthier G, Dore J, Henegar C, Rizkalla S, Clement K. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*. 2010;59(12):3049-3057.
45. Denning TL, Wang Y, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology*. 2007;8(10):1086-1094.
46. Harrison OJ, Maloy KJ. Innate immune activation in intestinal homeostasis. *J Innate Immun*. 2011;3(6):585-593.
47. Turley SD. The role of Niemann-Pick C1 - Like 1 (NPC1L1) in intestinal sterol absorption. *Journal of clinical lipidology*. 2008;2(2):S20-S28.
48. Hauser H, Dyer JH, Nandy A, Vega MA, Werder M, Bieliauskaite E, Weber FE, Compassi S, Gemperli A, Boffelli D, Wehrli E, Schulthess G, Phillips MC. Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry*. 1998;37(51):17843-17850.
49. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and

- reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*. 2002;110(5):671-680.
50. Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:221-248.
 51. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*. 2000;289(5484):1524-1529.
 52. Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, Robillard P, Chapman MJ, Huby T, Guerin M, Le Goff W. Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J Biol Chem*. 2011;286(35):30926-30936.
 53. Javitt NB. Cholesterol, hydroxycholesterols, and bile acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(5):1147-1153.
 54. Falany CN, Johnson MR, Barnes S, Diasio RB. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem*. 1994;269(30):19375-19379.
 55. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. 1998;93(5):693-704.
 56. Erickson SK, Lear SR, Deane S, Dubrac S, Huling SL, Nguyen L, Bollineni JS, Shefer S, Hyogo H, Cohen DE, Shneider B, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Suchy FJ, Batta AK, Salen G. Hypercholesterolemia and changes in lipid and bile acid metabolism in male and female cyp7A1-deficient mice. *J Lipid Res*. 2003;44(5):1001-1009.
 57. Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N, Parks JS. Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem*. 2003;278(36):33920-33927.
 58. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem*. 1998;273(16):10046-10050.
 59. Hylemon PB, Harder J. Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*. 1998;22(5):475-488.
 60. Bortolini O, Medici A, Poli S. Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids*. 1997;62(8-9):564-577.
 61. Yamazaki S, Steinman RM. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Dermatol Sci*. 2009;54(2):69-75.
 62. Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol*. 2004;16(12):1769-1780.
 63. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(3):505-511.
 64. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006;118(2):240-249.
 65. Lo JC, Wang Y, Tumanov AV, Bamji M, Yao Z, Reardon CA, Getz GS, Fu Y-X. Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis. *Science*. 2007;316(5822):285-288.

66. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(6):670-675.
67. Chen M, Huang L, Wang J. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood*. 2007;109(10):4360-4367.
68. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2006;203(7):1685-1691.
69. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009;30(4):576-587.
70. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, O'Connor W, Jr., Rongvaux A, Van Rooijen N, Haberman AM, Iwakura Y, Kuchroo VK, Kolls JK, Bluestone JA, Herold KC, Flavell RA. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*. 2011;475(7357):514-518.
71. Duyster G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*. 2000;267(14):4315-4324.
72. Svensson M, Johansson-Lindbom B, Zapata F, Jaensson E, Austenaa LM, Blomhoff R, Agace WW. Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8+ T cells. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):38-48.
73. Svensson M, Marsal J, Ericsson A, Carramolino L, Broden T, Marquez G, Agace WW. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1113-1121.
74. Drakes ML, Stiff PJ, Blanchard TG. Inverse relationship between dendritic cell CCR9 expression and maturation state. *Immunology*. 2009;127(4):466-476.
75. Wendland M, Czeloth N, Mach N, Malissen B, Kremmer E, Pabst O, Forster R. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6347-6352.
76. Stabler F, Gruber W, Stinshoff K, Röschlau P. Ein praxisgerechte enzymatisches cholesterin-bestimmung (A practical enzymatic cholesterol determination). *Das Medizinische Laboratorium* 1977;30(2):29-37.
77. Wahlefeld AW. Methods of Enzymatic Analysis. In: Press A, ed. Vol 5. New York: H.U. Bergmeyer 1974:1831-1835.
78. Sehayek E, Ono JG, Shefer S, Nguyen LB, Wang N, Batta AK, Salen G, Smith JD, Tall AR, Breslow JL. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):10194-10199.
79. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25(2):169-193.

Figure legends

Figure 1. Leucocyte populations in tissues. Spleen (A, D), liver (B, D) and intestine (C, D) leucocytes were isolated from CD11c-hBcl2 apoE^{-/-} mice and control apoE^{-/-} mice and analysed by flow cytometry. **Key:** CD11c^{hi} MHC II⁺, cDC population; CD11c^{hi} MHC II⁺ CD11b⁺, mDC population; CD11c^{high} MHC II⁺ mPDCA₁⁺, pDC population; CD11c^{hi} MHC II⁺ CD80⁺, activated DC population; CD11c⁻ F4/80⁺, macrophages. Values represent the mean ± SEM of 6-14 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.05, ** *P*<0.01, and *** *P*<0.001.

Figure 2. Plasma and tissue cholesterol levels. Plasma cholesterol (A) and tissue cholesterol (B) concentrations were measured in CD11c-hBcl2 apoE^{-/-} and apoE^{-/-} mice fed a chow diet, as described in the Materials and Methods. Values represent the mean ± SEM of 18-20 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.05, ** *P*<0.01, and *** *P*<0.001.

Figure 3. Measures of cholesterol turnover in CD11-hBcl2 ApoE^{-/-} mice. Fecal sterol excretion (A), intestinal cholesterol absorption (B;C) and total fecal bile acid excretion (D) were measured in CD11c-hBcl2 apoE^{-/-} and apoE^{-/-} mice fed a chow diet. Faeces were collected over 3 days and faecal sterol and total faecal bile acid levels were determined by GC-MS. Cholesterol absorption was determined by measuring the radioactivity in faeces collected 24 hours after dual-isotope gavage, as described in Methods. Values represent the mean ± SEM of 18-20 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.05, ** *P*<0.01, and *** *P*<0.001.

Figure 4. Relative mRNA expression for genes involved in cholesterol metabolism. Levels of mRNA expression of the indicated markers were evaluated in the liver (A, C) and in the intestine (B, D) of CD11c-hBcl2 apoE^{-/-} and apoE^{-/-} mice by qPCR. Relative mRNA expression of each gene was normalized to the average expression of two housekeeping genes (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and ribosomal protein S3). Values represent the mean ± SEM of 13-20 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.05, ** *P*<0.01, and *** *P*<0.001.

Figure 5. T cell populations and relative mRNA expression of functional markers in DCs and T cells. Spleen (A), liver (C) and intestine (E) T cells population from CD11c-hBcl2 apoE^{-/-} mice and control apoE^{-/-} mice were analysed by flow cytometry. **Key:** CD3⁺ CD4⁺ CD44^{high}, activated helper T lymphocytes; CD3⁺ CD8⁺ CD44^{high}, activated cytotoxic T lymphocytes; CD3⁺ CD4⁺ CD24⁺ FR4⁺, regulatory T lymphocytes.

Levels of mRNA expression of immune markers were evaluated in the spleen (B), liver (D) and intestine (F) of CD11c-hBcl2 apoE^{-/-} and apoE^{-/-} mice by qPCR. Relative mRNA expression of each gene was normalized to the average expression of two housekeeping genes (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and ribosomal protein S3). Values represent the mean \pm SEM of 13-20 mice per group. Statistically significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Also need details of panels A, C and E.

Fig. 1

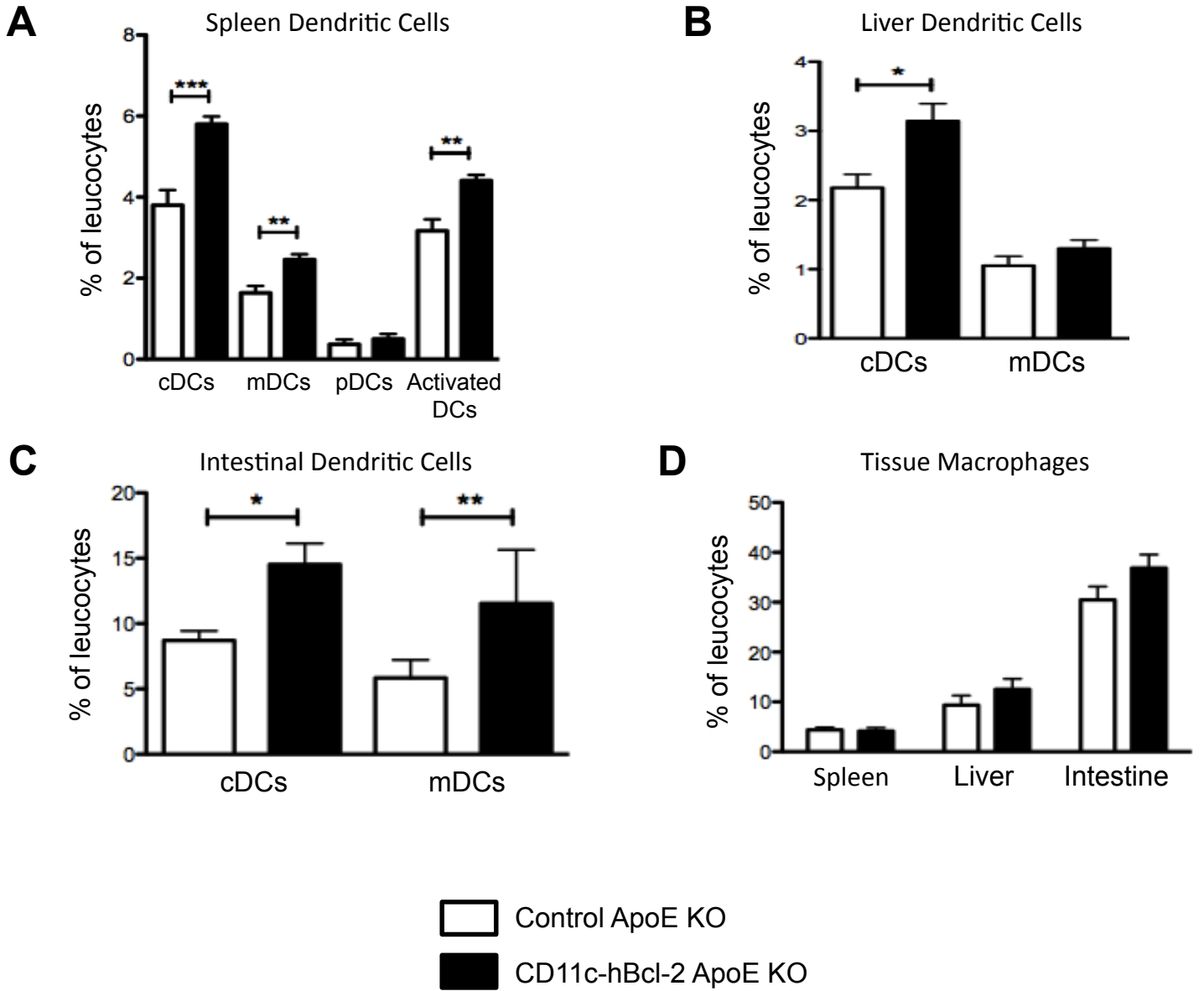


Fig. 2

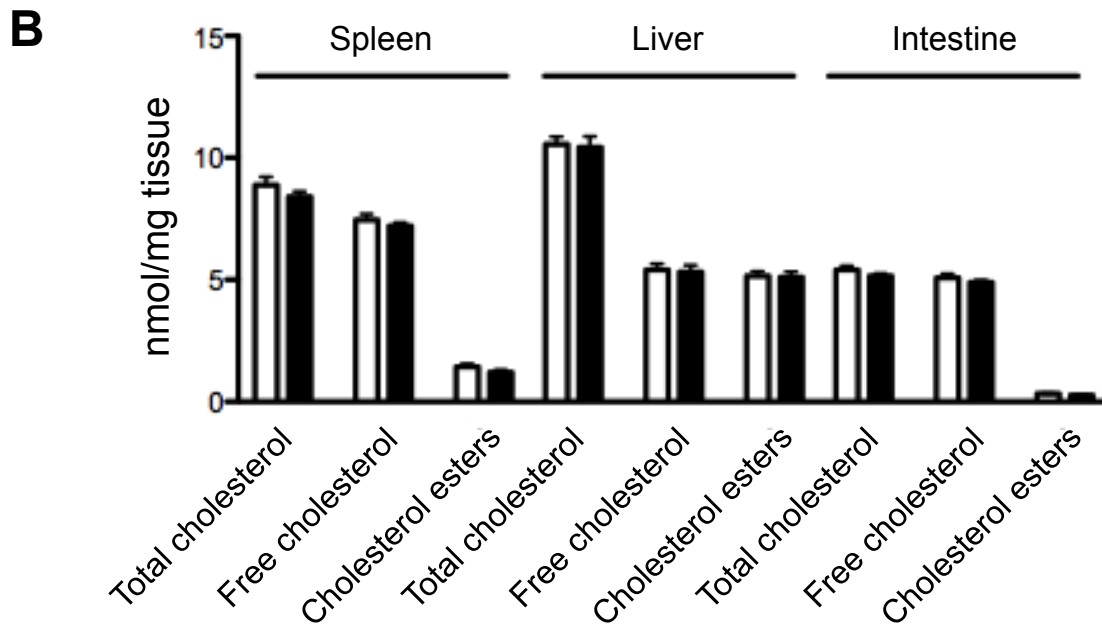
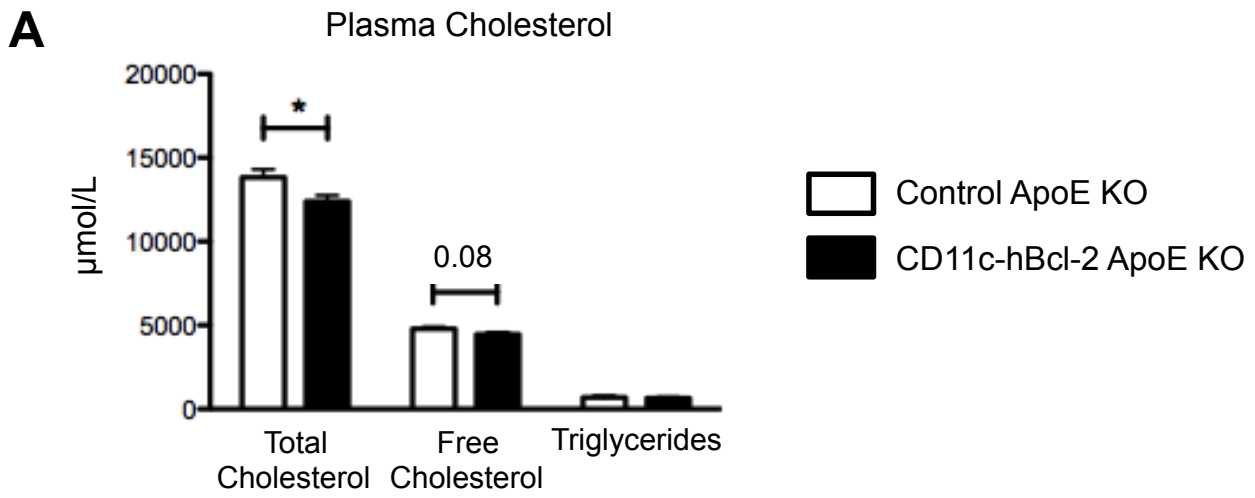


Fig. 3

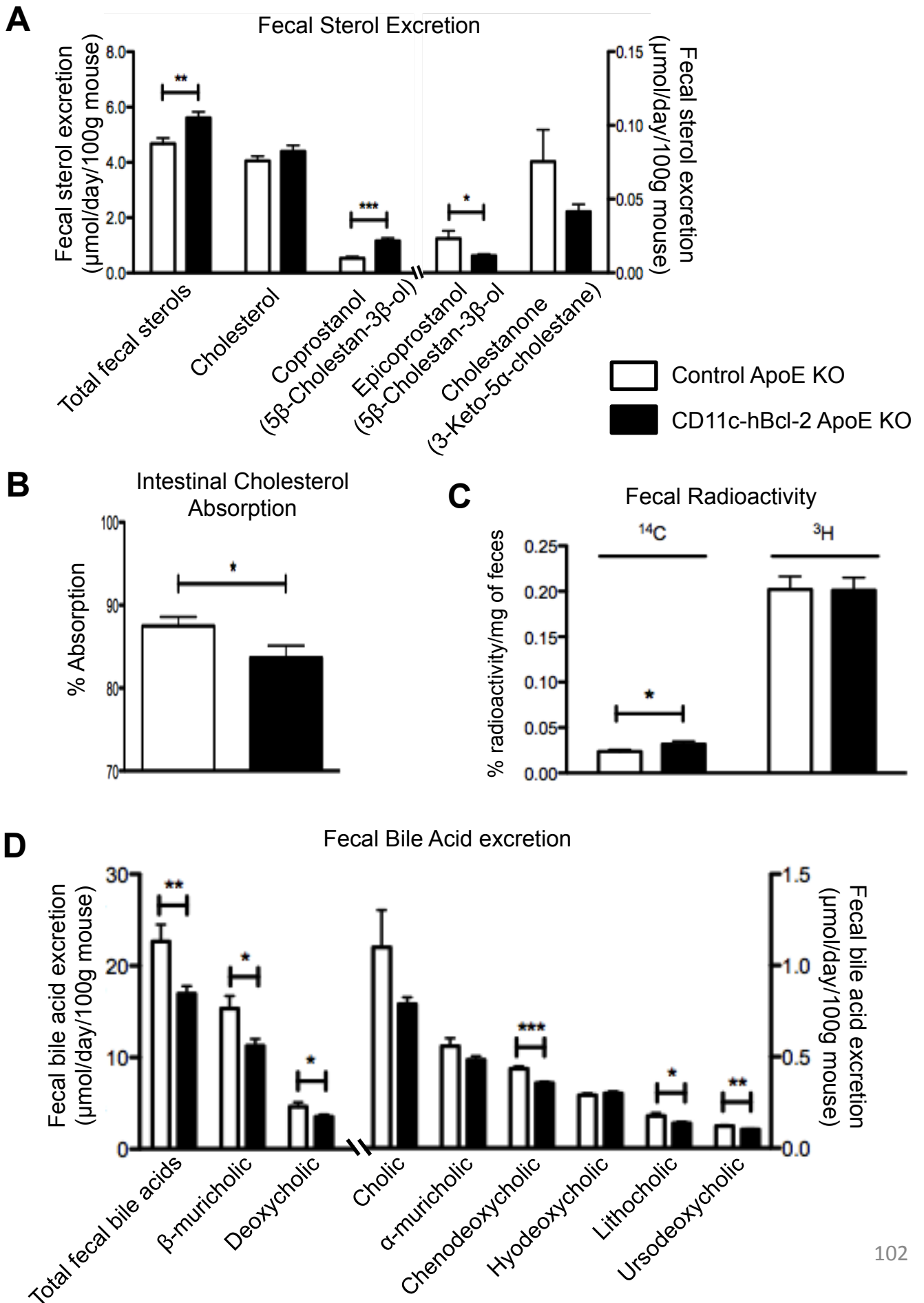


Fig. 4

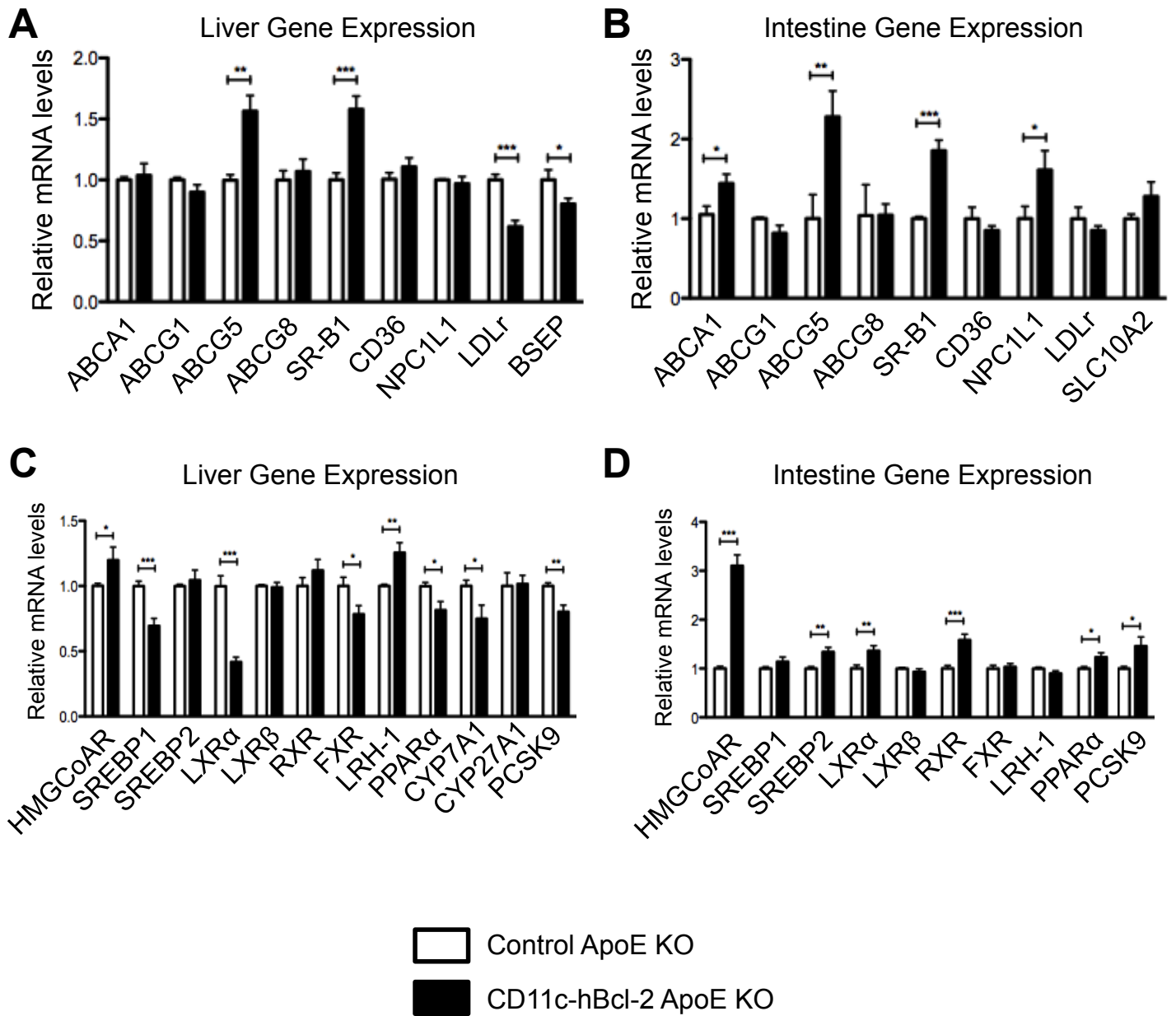
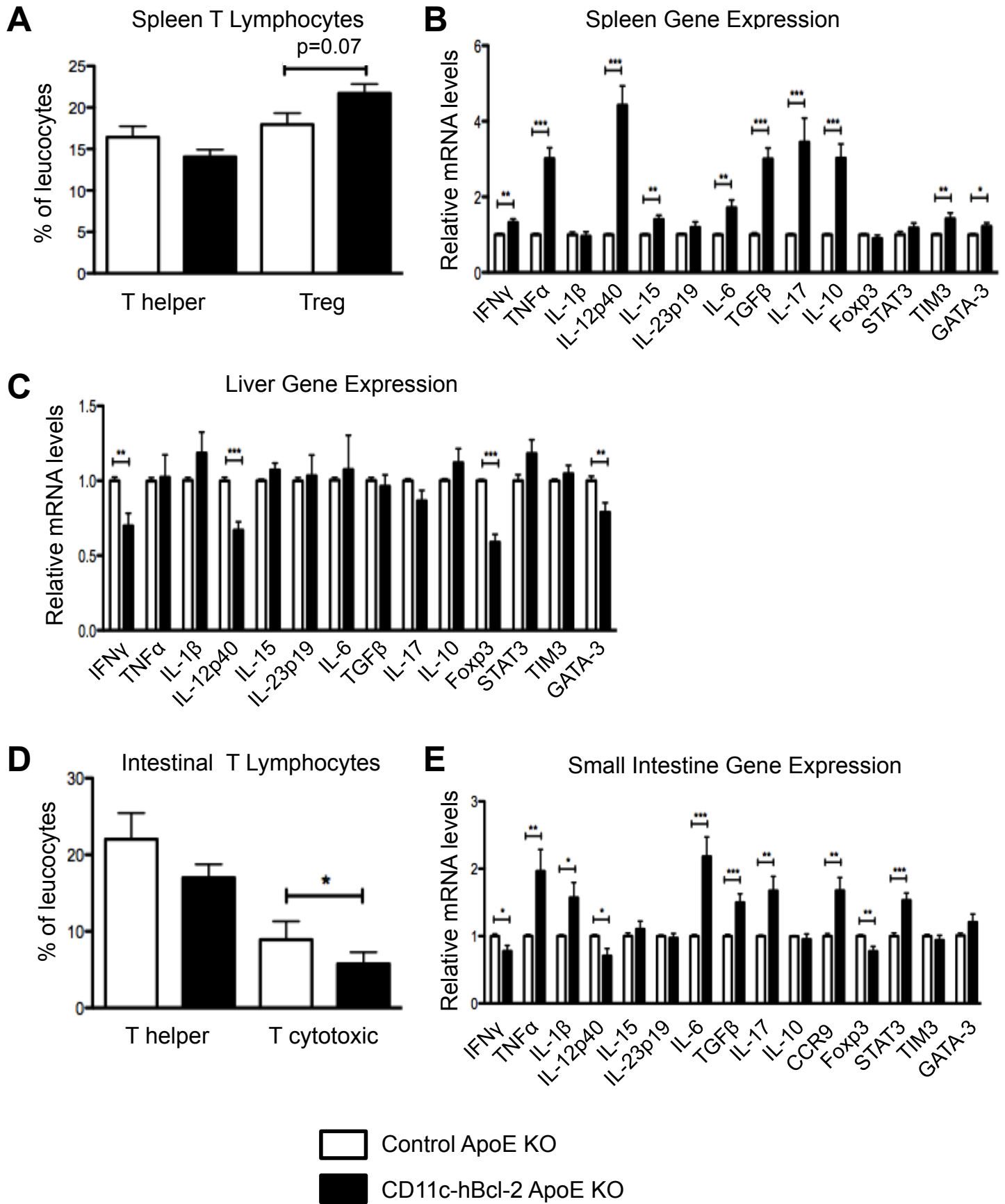
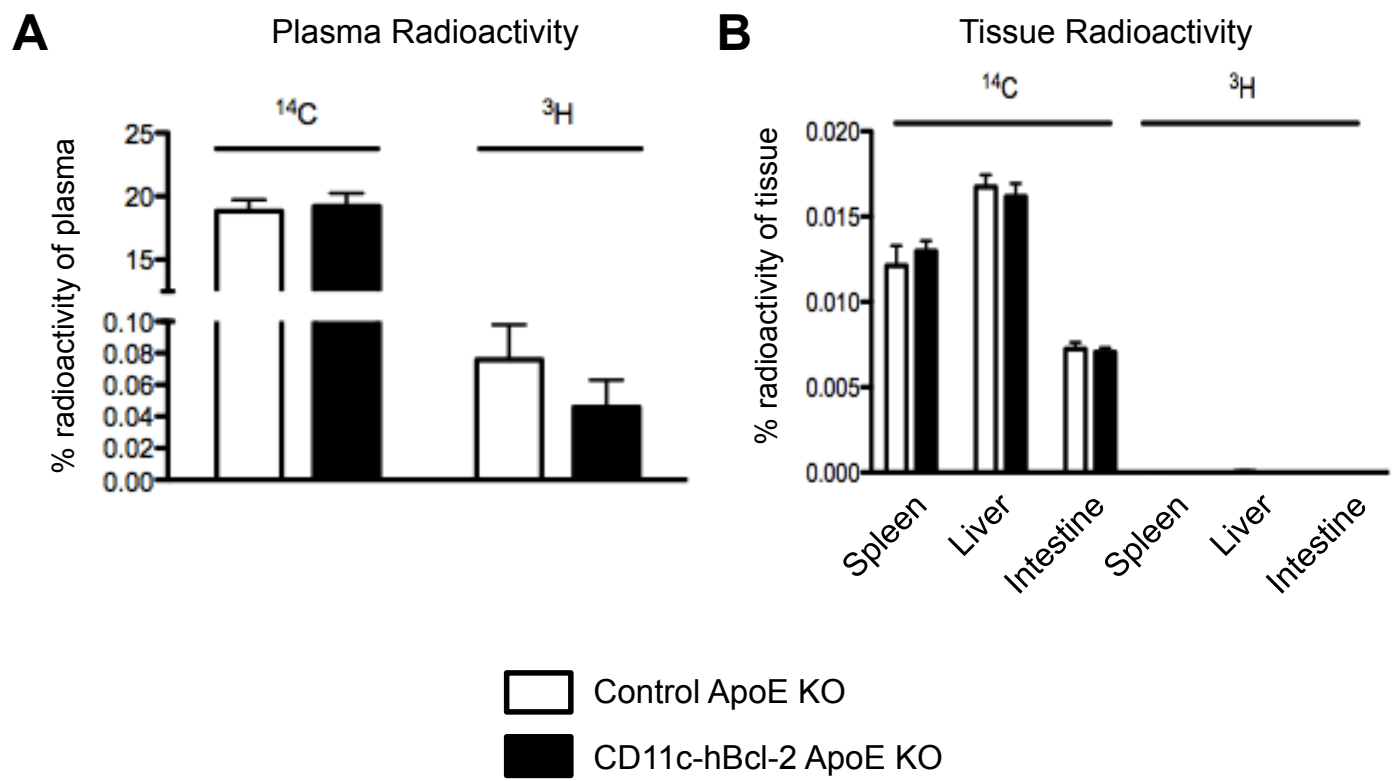


Fig. 5



Supplemental Fig. 1



Supplemental Table 1. Cholesterol levels in whole organs.

Organ	Analysis	Control apoE ^{-/-} (nmol/tissue)	CD11c-hBcl2 apoE ^{-/-} (nmol/tissue)	<i>P</i>
Spleen	Total cholesterol	705.9±49.7	894.2±53.5	<0.02
	Free cholesterol	597.1±43.7	772.45±48.9	<0.02
	Cholesterol ester	108.8±8.9	121.8±8.7	NS
Liver	Total cholesterol	10572.3±247.1	10515.8±350.0	NS
	Free cholesterol	5402.1±217.4	5369.2±235.2	NS
	Cholesterol ester	5170.2±182.2	5146.6±175.5	NS
Intestine	Total cholesterol	3498.5±199.2	3811.3±151.0	NS
	Free cholesterol	3294.3±195.4	3626.6±153.2	NS
	Cholesterol ester	204.2±10.8	184.67±12.5	NS

NS indicates not significant.

Supplemental Figure 1. Radioactivity content in plasma and tissues. Plasma (A), spleen, liver and intestine (B) of CD11c-hBcl2 apoE^{-/-} and apoE^{-/-} mice were collected and ¹⁴C and ³H radioactivity was measured. Plasma and tissues were collected 72 hours, after dual-isotope gavage. Data are expressed as a percentage of radioactivity of the total dose supplied by gavage. Values represent the mean ± SEM of 13-20 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.05.

Supplemental materials and methods

Materials:

Chemical reagents were purchased from Sigma

HPLC and gas chromatography/mass spectrometry reagents were purchased from Merck

Cholesterol standard was purchased from Sigma

Other standards were purchased from Steraloids

Matrix lysing D and E tubes were purchased from MP Biomedical

Plasma lipid analysis

After being fasted overnight, blood samples were collected into Microvette tubes (Sarstedt) by retroorbital bleeding under isoflurane anaesthesia (isoflurane (1.5%)/oxygen (0.4 l/min.)). Plasma samples were analysed with a Roche/Hitachi 902

autoanalyser using commercial reagent kits (Roche Diagnostics (total cholesterol and triglycerides), Diasys (Free Cholesterol))^{14, 76, 77}.

Tissues cholesterol extraction

Splenic, hepatic and intestinal, tissue samples (50-100 mg) were homogenized in 1 ml methanol (Merck HPLC grade) using a Fastprep 24 tissue homogenizer at 6 m/s for 40 seconds in Matrix lysing D tubes. 800 µl of the homogenates extracted with 1.6:0.6 chloroform/saline. The lower organic phase was collected, evaporated to dryness then reconstituted in 200 µL of mobile phase (70:30, Acetonitrile/2-propanol) for HPLC analysis, as described previously¹⁹.

Intestinal cholesterol absorption

Cholesterol absorption was measured by a fecal dual-isotope ratio method⁷⁸. The mice were gavaged with a mixture of 1 µCi of [22,23-³H] β-sitosterol (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO) and 2 µCi of [4-¹⁴C] cholesterol (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO) dissolved in 100 µl of olive oil. Animals were housed individually in cages with a wire bottom and were allowed free access to diet and water. Stools were collected after 24h, incubated overnight at 55°C to dryness and crushed into a fine powder. A measured mass (~20 mg) of feces were placed into a scintillation vial and the extraction of radiolabeled sterols was performed by adding 0.1 ml of water and 1 ml of SOLVABLE (PerkinElmer), incubating at 60°C for 90min, then adding 1 ml of isopropanol and incubating for a further 2h at 60°C. To reduce color quenching, 0.2 ml of 30% (w/v) hydrogen peroxide were added to the mixture and incubated at 50°C for 1h. Finally, scintillation fluid (ULTIMA Gold, PerkinElmer) was added into the vials, and the [¹⁴C] cholesterol and [³H] sitosterol counts were measured in a scintillation spectrometer. Percentage cholesterol absorption was calculated by comparing the ¹⁴C/³H ratio between the material administered with that in the feces, using the following equation:

$$\% \text{ Absorption} = \{ 1 - (\text{fecal } ^{14}\text{C}/^3\text{H}) / \text{administered } ^{14}\text{C}/^3\text{H} \} \times 100$$

Fecal sterol excretion

Stools were collected over three days, dried, weighed and ground into a fine powder. A measured amount of powdered feces (~20 mg) was added to butylated hydroxytoluene (20µM final concentration) and EDTA (100 µM final concentration) solution (10 µl),

ergosterol (20 μ l, 25 μ M final concentration) internal standard and potassium hydroxide (1 ml, 20 % (w/v) in methanol and homogenized using a Fastprep 24 tissue homogenizer (6 m/s for 40 seconds in Matrix lysing E tubes). Samples were saponified by heating for 3 h at 60°C and vortex shaken every hour. Samples were spun at 10000 rpm for 1 minute and a 0.5 ml aliquot of the supernatant was added to 1.2 ml water. Samples were then extracted with hexane:ether (1.2 ml, 1:1), hexane:ether layer recovered and reconstituted in acetonitrile (50 μ l). Samples were then derivitized with *N,O*-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (15 μ l with trimethylchlorosilane (1%)) and either heated (70°C 1 h) or left at room temperature overnight. Samples were then reconstituted in hexane (50 μ l) and measured by gas chromatography/mass spectrometry. Samples were injected (1 μ l) splitless on a Restex -5Sil 0.25 μ m x 30 m column on an Agilent 5973 with positive ion EI mass spectrometry with selected ion monitoring of the two most abundant fragment ions for cholesterol (m/z 329, 368), coprostanol (m/z 370, 215), epicoprostanol (m/z 370, 355) and 3-ketocholesterol (m/z 143, 458). Temperature program was 50°C for 2 min, 20°C/min to 300°C and hold for 10 min. After correction against ergosterol and external standards excretion rate is expressed as μ mol/d/100 g mouse.

Bile acid excretion

Stools were collected over three days, dried, weighed and ground into a fine powder. A measured amount of powdered feces (~20 mg) was added to butylated hydroxytoluene (20 μ M final concentration) and EDTA (100 μ M final concentration) solution (10 μ l), 23-Norcholeic acid (100 μ l 0.1mg/mL) internal standard and 1 ml 20% (w/v) potassium hydroxide in methanol, homogenized using a Fastprep 24 tissue homogeniser (6 m/s for 40 seconds in Matrix lysing E tubes). Samples were heated for 3 h at 60°C and vortex shaken every hour. Samples were spun at 10000 rpm for 1 minute and a 0.5 ml aliquot of the supernatant was added to water (9.5 ml). Solid phase extraction cartridge (Agilent BondElut C18, 500 mg, 6 ml) was prewashed (2 ml methanol, 2 ml water, 2 ml methanol, 2 ml water), sample loaded, collected and reloaded onto the column. The column was washed with NaOH (10 ml, 0.1 M) and water (10 ml) before the bile acids were eluted with methanol (3 ml). Samples were evaporated and derivitized with trifluoroacetic acid (50 μ l) and 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (30 μ l) and heated (60°C, 1 h). After allowing the derivitized bile acids to cool they were neutralized with NaHCO₃ (70 μ l, 0.1M) and extracted into hexane (100 μ l) with the hexane layer measured by gas chromatography/mass spectrometry.

Samples were injected (1 μ l) splitless on a Restex -5Sil 0.25 μ m x 30 m column on an Agilent 5973 or Thermo Trace DSQ with positive ion chemical ionisation with methane reagent gas (20 mTorr or 1.5 ml/min) and selective ion monitoring (m/z 493.3, 505.3, 507.3, 509.3, 619.3 and 621.3). Temperature program was 50°C for 2 min, 40°C/min to 230°C, hold for 26 min, 40°C/min to 280°C and hold for 15 min. After correction against 23-Norcholeic acid and external standards, excretion rate is expressed as μ mol/d/100 g mouse.

Isolation of leukocytes from spleen, liver and intestine

Spleen: The spleen was dissected out of the abdominal cavity, cut in small pieces, and then splenocytes were filtered through a 70 μ m cell strainer. After red cell lysis in ACK buffer (ammonium chloride solution) for 5 minutes, leucocytes remaining were then stained for flow cytometry analysis.

Liver: After perfusion with a saline solution, the liver was dissected out of the abdominal cavity and minced in small pieces. The pieces were incubated in a digestion buffer (PBS/collagenase D (2.5mg/ml, Roche)) at 37°C for 20 minutes. The dispersed liver was filtered through a 70 μ m cell strainer and the cells centrifuged at 300g for 5 min. The pellet was resuspended into 9ml of 30% (v/v) Percoll (diluted with PBS) and centrifuged at 1700 rpm for 30 min at room temperature. After removing hepatocytes at the gradient surface, the red cells in the pellet were lysed with ACK buffer and leucocytes remaining were then stained for flow cytometry analysis.

Small intestine: The small intestine was dissected out of the abdominal cavity and Peyer's patches, mesentery and fat were cut off. The small intestine was cut longitudinally and transversely and washed in 15 ml of complete medium (2% (v/v) fetal bovine serum in HBSS without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺, Sigma). Clean intestine pieces were then successively incubated at 37°C with DTT (0.5 M, Sigma) for 20 min, with EDTA (1.3 mM, Sigma) for 1h and with collagenase D (2.5mg/ml, Roche) for 1 h. The tissue was dispersed using a syringe and filtered through a 70 μ m cell strainer. Cells were centrifuged 5 min at 1350 rpm, stained and analyzed.

Flow cytometry

To analyse spleen, liver and small intestine leucocyte populations, isolated cells were resuspended in PBS containing 1% (w/v) BSA, pre-incubated for 15 min at 4°C with Fc blocker (Miltenyi Biotec) and then incubated for 30 min at 4°C with antibodies directed against: CD45 (clone 30F11, Miltenyi), CD11c (clone N418, eBiosciences), CD11b (clone

M1/70, eBiosciences), anti-IA^b (clone M5:114, eBiosciences), F4/80 (clone BM8, eBiosciences), CD80, mPDCA-1, CD3, CD4, CD8a, CD25, CD69. The cells were then fixed with 2% (w/v) paraformaldehyde. Data were acquired on LSRFortessa cell analyzer (Becton, Dickinson) and analyzed with FACSDiva Software.

Analysis of gene expression by Q-PCR

Total mRNA was extracted from 50-100 mg samples of spleen, liver or jejunum from the small intestine using TRIzol reagent (Invitrogen). Tissues were homogenized in Fastprep matrix D tube (MP Biomedicals) using a Fastprep 24 tissue homogeniser at 6 m/s for 30 sec. 200 µl of chloroform was added and the mixture centrifuged for 15 min at 1200g. The upper layer containing RNA was purified using PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. 1 µg of RNA was reverse transcribed to cDNA using Superscript III (Invitrogen) under the following conditions: 50°C for 50 min and 85°C for 5 min. Real-time PCR was performed in duplicate with 1µl of cDNA, 10 µl of SensiMixPlus SYBR (Bioline), 8 µl of UltraPure water, and 0.5 µl of forward and reverse primer (10 µM). The primer sequences are presented in Table 1. PCR was then run on the Rotor-Gene 3000 (Qiagen) using the following conditions: 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 10 sec and 59°C for 1 min. Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase was used as a housekeeping gene to account for variability in the initial quantities of cDNA. Relative changes in mRNA expression between groups were determined using the $\Delta\Delta C_t$ method ⁷⁹.

Name	Primer	Sequence (5' -> 3')	Name	Primer	Sequence (5' -> 3')
ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)	Forward	AAAACCGCAGACATCCTTCAG	IL-17 (Interleukin-17)	Forward	ACTCTCCACCGCAATGAAGACCCT
	Reverse	CATACCGAAACTCGTTACCC		Reverse	TCCGCATTGACACAGCGCTGG
BSEP (bile salt export pump)	Forward	TCTGACTCAGTGATTCTTCGCA	IL-23p19 (Interleukin-23p19)	Forward	GAACGCACATGCACCAGCGG
	Reverse	CGAAAGCATGATTCTCCTCTCC		Reverse	TGCAAGCAGAAGCTGGCTGTTGTCC
ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1)	Forward	CGAGAGGGCATGTGTGACG	LRH-1 (liver receptor homolog-1)	Forward	GCTGTAAGCCAAAGGACTGCCA
	Reverse	CCGAGAAAGCTATGGCAACC		Reverse	TCCGGAAGCCACGACGTTTT
ABCG5 (ATP-binding cassette transporter G5)	Forward	AGGGCCTCACATCAACAGAG	LDLr (Low-Density Lipoprotein Receptor)	Forward	ACACCGTGAGGCTTGCGAGC
	Reverse	GCTGACGCTGTAGGACACAT		Reverse	AGCGACGCATCAGATCCGCG
ABCG8 (ATP-binding cassette transporter G8)	Forward	CTGTGGAATGGGACTGTACTTC	LXR α (Liver X receptor α)	Forward	CTCAATGCCTGATGTTTCTCCT
	Reverse	GTTGGACTGACCACTGTAGGT		Reverse	TCCAACCCTATCCCTAAAGCAA
CCR9 (C-C chemokine receptor type 9)	Forward	GCACTTCCCCTCCTGTCTCTTTCCA	LXR β (Liver X receptor β)	Forward	CGTGCAGGCTTGACAGGTGGA
	Reverse	GCATCATGGTGGATCGGACGCC		Reverse	AGGAGCCCTCCACGTAGGG
CD36	Forward	ATGGGCTGTGATCGGAACTG	NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1)	Forward	GGAATGGCTGGCTCCGCTG
	Reverse	GTCTTCCCATAAGCATGTCTCC		Reverse	CTGGCAGGAACAGGCTGCCG
CYP7A1 (Cholesterol 7 α -hydroxylase)	Forward	GGGATTGCTGTGGTAGTGAGC	PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin)	Forward	GAGACCCAGAGGCTACAGATT
	Reverse	GGTATGGAATCAACCCGTTGTC		Reverse	AATGTACTCCACATGGGGCAA
CYP27A1 (sterol 27-hydroxylase)	Forward	GTGGTCTCTTATTGGGTACTTGC	PPAR α (Peroxisome proliferator-activated)	Forward	AACATCGAGTGCATATATGTGG
	Reverse	GGTATGGAATCAACCCGTTGTC		Reverse	AGCCGAATAGTTCCGCCAAAG
FOXP3 (forkhead box P3)	Forward	GCGAGTGTCCCTGCTCTCCCC	ROR α (RAR-related orphan receptor α)	Forward	AAAGCAGGCTCGTAGAGGTGGT
	Reverse	GAGAAGTTGCCGGGAGAGCTGAATT		Reverse	CGGGGCTCGCATACTTCCCG
FXR (farnesoid X receptor)	Forward	GGCAGAATCTGGATTGGAAATCG	RPS3 (40S ribosomal protein S3)	Forward	ATCAGAGAGTTGACCGCAGTTG
	Reverse	GCTGAACTTGAGGAAACGGG		Reverse	AATGAACCGAAGCACACCATA
GATA-3(Trans-acting T-cell-specific transcription factor)	Forward	AAGCTCAGTATCCGCTGACG	RXR (retinoid X receptor)	Forward	ATTGGGCTTCGGGACTGGTA
	Reverse	GTTCCGTAGTAGGACGGGAC		Reverse	CAGGAACCTTGAGGACGCC
HMGC α R (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)	Forward	AGCTTGCCCCAATTGTATGTG	Slc10a2 (Solute carrier family 10, member 2)	Forward	TCAACCCTGGTACAGGTGCCG
	Reverse	TCTGTTGTAACCATGTGACTTC		Reverse	ACCAGGTTGAGATCCTCGGGGG
HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)	Forward	TGACACTGGTAAAACAATGC	SR-B1 (scavenger receptor class B1)	Forward	TTTGGAGTGGTAGTAAAAAGGGC
	Reverse	AACACTTCGAGAGGTCCTTT		Reverse	TGACATCAGGGACTCAGAGTAG
IFN γ (Interferon γ)	Forward	ACAACCCACAGGTCCAGCGC	SREBP1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1)	Forward	AGCAGCCCTAGAACAAACAC
	Reverse	CCACCCGAATCAGCAGCGAC		Reverse	CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT
IL-1 β (Interleukin-1 β)	Forward	TCGGCCAAGACAGGTCGCTCA	SREBP2 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2)	Forward	TGAAGGACTTAGTCATGGGGAC
	Reverse	TGGTTGCCCATCAGAGGCAAGG		Reverse	CGCAGCTTGTGATTGACCT
IL-6 (Interleukin-6)	Forward	ATGCTGGTGACAACCACGGCC	STAT 3 (Signal transducer and activator of transcription)	Forward	CCCGAAGCCGACCCAGGTAGT
	Reverse	AAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGA		Reverse	ACGTGAGCGACTCAAACCTGCC
IL-10 (Interleukin-10)	Forward	TGCGGACTGCCTTCAGCCAG	TGF β (Transforming growth factor β)	Forward	CAGCCCTGCTCACCCGCTGTG
	Reverse	GGCCATGCTTCTCTGCCTGGG		Reverse	GGTTTGTGGCTCCCGAGGGC
IL-12p40 (Interleukin-12p40)	Forward	AGACATGGAGTCTATAGGCTCTG	TIM3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain)	Forward	AAAGCAGCCAAGGCTCACTCCAGC
	Reverse	CCATTTTCTTCTGTGGAGCA		Reverse	TGGAGGGTACCAGTGTCTGTGT
IL-15 (Interleukin-15)	Forward	CCTTGACACATGGCCCTCTGGC	TNF α (Tumor necrosis factor α)	Forward	CCCTCTGGCCAACGGCATG
	Reverse	ACTCTTCTTGGCCCTCTGTAGGCT		Reverse	TCGGGGCAGCCTTGTCCCTT

Table 1: Primers list