

**Université de Lille II**

**Thèse en vue de l'obtention du**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE DE  
LILLE**

**Spécialité d'endocrinologie, diabète et Maladies métaboliques**

**Titre : Rôle de modulateurs immunologiques et métaboliques dans le  
développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline :  
Administration de la rapamycine ou de probiotiques chez la souris obèse.**

**Présentée par Kassem MAKKI**

*Soutenue publiquement le 04 février 2014*

**Devant les membres du jury :**

**Pr. Emmanuel MORELON**

**Rapporteur**

**Dr. Anne BOULOUMIE**

**Rapporteur**

**Dr. Jaap NEELS**

**Examineur**

**Dr. Giulia CHINETTI**

**Examineur**

**Dr. Isabelle WOLOWCZUK**

**Directeur de thèse**

## *Remerciements*

---

Je remercie tout d'abord le Docteur Anne Bouloumié et le Professeur Emmanuel Morelon d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également le Docteur Jaap Neels d'avoir accepté ma demande de faire partie des membres de mon jury de thèse. Merci aussi au Docteur Giulia Chinetti et au Professeur Christophe Magnan d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse, pour les échanges enrichissants et leurs conseils durant ces trois longues années.

Un très grand merci et un simple merci ne sera jamais suffisant à mon directeur de thèse le Docteur Isabelle Wolowczuk. Je la remercie de m'avoir donné la chance de développer ce travail, de m'avoir formé, de m'avoir fait découvrir et apprendre le métier de la recherche. Je la remercie également pour la confiance et l'autonomie qu'elle m'a accordées. Je la remercie énormément pour son support pendant les moments difficiles. Merci Isabelle, j'ai énormément appris à tes côtés pendant ces 3 ans et 4 mois et merci pour les nombreuses discussions scientifiques, cinématographiques, artistiques, gastronomiques et autres. Un directeur de thèse pas comme les autres et des moments certainement inoubliables !

Je remercie également le Professeur Philippe Froguel de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de me permettre de réaliser ce travail au sein de son unité.

J'exprime ma gratitude envers le Docteur Corinne Grangette. Je vous remercie énormément de m'avoir donné la chance de participer à vos travaux, de m'avoir écouté et aidé et pour les discussions et les remarques constructives. C'était un honneur et un plaisir de partager mes derniers mois de thèse avec vous. Merci de m'avoir donné l'occasion de découvrir « nos amis les bactéries » qui suscitent mon intérêt de plus en plus.

Merci à Jeanne Alard, un ingénieur modèle qui a de l'avenir. Merci pour ta bonne humeur, ta générosité, ton aide et pour tes petits délires qui m'ont toujours fait rire.

Merci aux équipes de biostatistique (Ghislain, Loïc Yengo et Marie), bioinformatique (Franck, Iandry et Olivier) et aux informaticiens (David et Loïc) sans oublier Véronique pour leur bonne humeur, leurs blagues, les petits rires entre deux portes et bien sûr pour leur aide pour comprendre certains tests statistiques (un vrai casse-tête des fois pour les biologistes !) et bien évidemment l'utilisation et la compréhension de certaines machines et leurs langages comme « les ordinateurs » !

Merci Audrey, Marianne, Frédéric, Martine, Julien, Manue et Stéphane Cauchi. Merci pour les discussions, votre aide, votre support et les échanges enrichissants.

Merci à Elodie et Stéphane Lobbens pour leur aide technique et scientifique et pour les pauses dans leur bureau pour parler de « Sushi » et les expériences potentielles que j'aurai souhaité réaliser dessus !

Un grand merci à Bernadette et Odile, pour les moments sympathiques passés pendant la pause café du matin ou à table à midi ou même des fois à 16 heures (Tea Time !). Merci Odile pour tes conseils scientifiques et bien évidemment pour le jardinage et merci Bernadette pour ton aide, ta bonne humeur, ta sympathie pendant ces trois longues années. Je te remercie vraiment pour le support à la fois scientifique et moral que tu m'as apporté, d'avoir essayé de remonter le moral quand les choses n'allaient pas bien.

Merci à Dorothée Thuilier, mon athlète préféré ! Tu vas y arriver sans aucun doute ma grande. Je te remercie beaucoup pour ton aide, ton sourire et surtout ta compréhension.

Merci à l'équipe matinale : Solenne (mon âme sœur spirituelle), Aurélie (mon âme sœur culinaire) et Stefan Gaget (Mon frère). Solenne, un merci ne suffira jamais. Je n'oublierai pas les moments passés ensemble, à la paille, à l'animalerie (en câlinant les souris), autour d'une tasse de thé et d'un carré de chocolat. Merci de m'avoir consacré beaucoup de ton temps et de ta patience, de m'avoir encouragé à continuer et de croire en moi. Aurélie, merci pour ton sourire, tes conseils, pour nos délires qui n'arrêtent pas de me faire rire et pour toutes les recettes de cuisine qu'on a pu partager. Stefan, mon frère, merci pour le café, les rires et bien sûr pour ta bonne humeur. Merci à tous les trois, pour votre générosité d'âme et surtout de m'avoir rendu « addict » aux mots fléchés !!

Marlène, Manu Vaillant et Cécile, que dire ? Vous êtes mes anges gardiens et mes sauveurs (hein Cécile ?!). Merci infiniment pour votre présence, vos encouragements, vos conseils, votre sens de l'écoute, votre sincérité, votre générosité et pour les conseils scientifiques et les commandes urgentes, pour les moments de pause thé et les gâteaux. Merci Manu pour tous les gâteaux et les donuts que tu m'as déposés à mon bureau pour me donner de l'énergie. Je te remercie également pour les nombreuses discussions et pour les moments de réflexion pour mieux comprendre le sens de la vie. Merci Marlène pour ton amitié et d'être là et de m'avoir fait découvrir des nouvelles choses et de m'avoir donné le goût de reprendre certaines passions.

Morgane et Marie, merci pour votre sympathie, votre attention et de m'avoir supporté ces derniers temps. Ana (The alien), merci beaucoup pour ta générosité, le temps que tu m'as accordé, même quand tu n'en avais pas beaucoup, de m'avoir aidé dans mes expériences et tes conseils très constructifs. Je te remercie également pour les cours de remise à niveau en anglais (You are the best !) et pour ton sens de l'humour.

Merci à Olivier Molendi-Coste et Emmanuel Bouchaert d'avoir participé à ce travail et de m'avoir aidé dans la réalisation de certaines expériences délicates et d'avoir passé des fois des heures à analyser des tubes en cytométrie de flux !

Je tiens à remercier du fond du cœur Chantal Combe, le Professeur Martin Teichmann et le Docteur Violaine Moreau. Je n'oublierai jamais ce que vous m'avez apporté et appris. Avec vous, j'ai découvert ce métier et grâce à vous j'ai pu l'apprendre. Merci vraiment pour votre support, votre écoute et vos conseils.

Je remercie également tous mes amis, Yann, Prisca, Laetitia, Petra et Cécile Jaccovetti. Des confrères qui ont fait le même parcours que le mien et qui m'ont vraiment soutenu tout le long de ces trois longues années et qui m'ont encouragé à donner le meilleur de moi-même.

Finalement, je remercie ma famille, mes sœurs (Farah, Amar et Nour) et ma pseudo-famille (Chiara Pascali, Riccardo Gavioli, Bruno Besson et Pascale Berlioz). Merci d'être présent pour moi, d'avoir pleuré à mes côtés, de m'avoir épaulé et veillé sur moi comme personne et surtout d'essayer de me raisonner et de me faire voir le côté plein du verre.

Ce n'est pas une fin, c'est qu'un début. Isabelle, tu as raison. La fin d'une thèse n'est qu'un commencement. Merci à vous tous, vous m'avez énormément apporté, au niveau de tous les plans, personnel, moral et professionnel. Chacun d'entre vous a laissé une trace en moi et j'espère que j'ai pu faire pareil pour vous.

*« La vie c'est comme une boîte de chocolat, on ne sait jamais sur quoi on va tomber »*

*Robert Zemeckis*

Moi... je suis tombé sur vous !

- **Congrès :**

- **Congrès de la Société Francophone du Diabète à Nice – Mars 2012**

**Titre :** La rapamycine régule le métabolisme en augmentant l'inflammation du tissu adipeux blanc

Présentation orale et obtention d'un prix de 450 euros.

- **Congrès de la Société Francophone du Diabète à Montpellier – Mars 2013**

**Titre :** La rapamycine augmente la réponse inflammatoire et l'émergence des cellules « *Myeloid-derived Suppressor Cells* » (MDSC) chez la souris obèse.

Présentation orale et obtention d'un prix de 450 euros.

- **Symposium *European Genomic Institute for Diabetes* (EGID) à Lille – Octobre 2012**

**Titre :** Rapamycin Increases Inflammation and the Production of Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Adipose Tissue of Obese Mice.

Présentation affichée

- **Formations suivies:**

- Habilitation à l'expérimentation animale de niveau 1.
- Formation d'initiation à logiciels d'analyses : GeneSpring GX  
Ingenuity Pathway Analysis (IPA)
- Participation au forum Doc'emploi.
- Participation à l'organisation des journées de vulgarisation scientifique (Kid Campus et journées des jeunes chercheurs).

## *Publications*

---

**K. Makki**, S. Taront, B. Neve, O. Poulain-Godefroy, E. Bouchaert, D Dombrowicz, P. Froguel, I. Wolowczuk. La rapamycine régule le métabolisme en augmentant l'inflammation du tissu adipeux blanc.

Diabetes & metabolism. 2012, Volume 38, Supplement 2, A4.

**K. Makki**, S. Taront, B. Neve, E. Bouchaert, O. Molendi-Coste, D Dombrowicz, P. Froguel, I. Wolowczuk. La rapamycine augmente la réponse inflammatoire et l'émergence des cellules « Myeloïd-derived Suppressor Cells » (MDSC) chez la souris obèse.

Diabetes & metabolism. 2013, Volume 39, Supplement 1, A17.

**K. Makki**, P. Froguel and I. Wolowczuk. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines and chemokines. (Revue, sous presse dans ISRN Inflammation).

**K. Makki**, S. Taront, O. Molendi-Coste, E. Bouchaert, B. Neve, E. Eury, S. Lobbens, M. Labalette, H. Duez, B. Staels, D. Dombrowicz, P. Froguel and I. Wolowczuk. Beneficial Metabolic Effects of Rapamycin are Associated with Enhanced Regulatory Cells in Diet-Induced Obese C57BL/6 Mice. (En publication dans PLoS ONE).

**K. Makki**, J. Alard, V. Valenti, V. Peucelle, S. Taront, P. Froguel, B. Pot, I. Wolowczuk and C. Grangette. Microbiota-host interaction remodeling through probiotic intervention controls diet-induced obesity and insulin resistance by blocking macrophage recruitment. (En préparation).

<b>Abréviations principales</b>	<b>9</b>
<b>Liste des figures et des tables</b>	<b>11</b>
<b>Résumé</b>	<b>13</b>
<b>Abstract</b>	<b>15</b>
<b>I. Obésité : Définitions, Causes et Conséquences</b>	<b>18</b>
I.1 Définitions	18
I.2 Causes : génétiques, conditions de vie, environnementales	19
I.2.1 Facteurs génétiques	19
I.2.2 Conditions de vie	19
I.2.3 Facteurs environnementaux	20
I.2.3a Le microbiote intestinal : définition et composition	20
I.2.3b Le microbiote intestinal : les liens avec l'obésité	20
I.2.3c L'endotoxémie métabolique et la perméabilité intestinale	
I.2.3d Les probiotiques	21
I.3 Conséquences	22
<b>II. Le tissu adipeux</b>	<b>24</b>
II.1 les différents types de tissus adipeux	24
II.1.1 le tissu adipeux brun	24
II.1.1a Différenciation du tissu adipeux brun	24
II.1.1b Rôle du tissu adipeux brun dans la thermogénèse	25
II.2 Le « <i>browning</i> » ou « brunisation » du tissu adipeux blanc	26
II.3 le tissu adipeux blanc	27
II.3.1 L'adipocyte	27
II.3.1a La lipogenèse	28
II.3.1b La lipolyse	29
II.3.2 La fraction stroma-vasculaire	30
II.3.2a Les préadipocytes	30
II.3.2b Les cellules endothéliales	31
II.3.2c Les cellules souches mésenchymateuses	31
<b>III. Les cellules immunes du tissu adipeux blanc</b>	<b>32</b>
III.1 Les lymphocytes B	32
III.2 Les lymphocytes T	32
III.2.1 Les lymphocytes CD4 <sup>+</sup>	32
III.2.1a Les lymphocytes Th1	33
III.2.1b Les lymphocytes Th2	33
III.2.1c Les lymphocytes Th17	34
III.2.1d Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)	34
III.2.2 Les lymphocytes CD8 <sup>+</sup>	34
III.3 Les lymphocytes T $\gamma\delta$	35
III.4 Les cellules NKT	35
III.5 Les éosinophiles	36
III.6 Les mastocytes	37

III.7 Les macrophages	37
III.8 Les cellules suppressives d'origine myéloïde ou MDSCs	39
III.8.1 Les mécanismes d'immunosuppression des MDSCs	41
III.8.1a Arginase 1 et iNOS	41
III.8.1b Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	41
III.8.1c Le peroxy-nitrite	42
<b>IV. Altérations immunes associées à l'obésité</b>	<b>43</b>
IV.1 L'inflammation chronique à bas bruit et la résistance à l'insuline	43
IV.1.1 Les leucotriènes	44
IV.1.2 L'inflammasome	45
IV.2 Obésité et l'inflammation chronique à bas bruit	47
IV.3 Le recrutement des cellules immunes dans le tissu adipeux blanc et l'insulino-résistance	49
IV.3.1 Le recrutement des macrophages	49
IV.3.2 Le recrutement des cellules dendritiques	49
IV.3.3 Le recrutement des neutrophiles	50
IV.3.4 Le recrutement des mastocytes	50
IV.3.5 Le recrutement des cellules myéloïde immuno-suppressives	51
IV.3.6 Le recrutement des éosinophiles	51
IV.3.7 Le recrutement des lymphocytes B	52
IV.3.8 Le recrutement des lymphocytes T	52
<b>V. La voie mTOR (<i>mechanistic Target Of Rapamycin</i>)</b>	<b>55</b>
V.1 Les deux complexes mTOR : mTORC1 et mTORC2	55
V.1.1 Les régulateurs de mTORC1 et son implication dans différents processus cellulaires	56
V.1.2 Les régulateurs et les processus cellulaires de mTORC2	58
V.2 La voie de signalisation de mTOR dans les tissus et ses rôles métaboliques	60
V.2.1 Le rôle de mTOR dans le tissu adipeux	61
V.2.2 Le rôle de mTOR dans le muscle	62
V.2.3 Le rôle de mTOR dans le foie	63
V.2.4 Le rôle de mTOR dans le pancréas	64
V.2.5 Le rôle de mTOR dans l'intestin	66
V.3 Le rôle de mTOR dans le développement et la fonction du système immunitaire	67
V.3.1 Le rôle de mTOR dans la régulation des cellules immunes	67
V.3.1a Le rôle de mTOR dans les cellules dendritiques	67
V.3.1b Le rôle de mTOR dans les macrophages	68
V.3.1c Le rôle de mTOR dans neutrophiles	68
V.3.1d Le rôle de mTOR dans les mastocytes	69
V.3.1e Le rôle de mTOR dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup>	69
V.3.1f Le rôle de mTOR dans les T régulateurs CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	70
V.3.1g Le rôle de mTOR dans les lymphocytes B	70
V.4 Les inhibiteurs de mTOR : la rapamycine	71

<b>Introduction des travaux de thèse</b>	<b>73</b>
<b>Article 1: Beneficial Metabolic Effects of Rapamycin are Associated with Enhanced Regulatory Cells in Diet-Induced Obese C57BL/6 Mice</b>	<b>75</b>
Objectif de l'étude 1	76
Discussion et conclusion de l'étude 1	120
<b>Article 2: A Probiotic Mixture Alleviates Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice through Adipose Tissue Cell-Remodeling</b>	<b>125</b>
Objectif de l'étude 2	126
Discussion et conclusion de l'étude 2	
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	
<b>Références</b>	

## *Abréviations principales*

---

### **A**

AG : Acide Gras

ARG1 : Arginase 1

### **C**

CD : Cluster de différenciation

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

### **D**

DC : Cellules dendritiques

### **F**

FAS : *Fatty Acid Synthase*

FSV : Fraction stroma vasculaire

### **G**

GLUT : *Glucose Transporter*

### **I**

IL : Interleukine

IR : insulino-résistance

IFN $\gamma$  : Interféron gamma

### **L**

LcB : Lymphocyte B

LcT : Lymphocyte T

LPL : Lipoprotéine Lipase

LPS : Lipopolysaccharide

## M

M1 : macrophages inflammatoires

M2 : Macrophages anti-inflammatoires ou alternatifs

MDSC : *Myeloid-derived Suppressive cells* ou cellules suppressives d'origine myéloïde

## N

NOS2 : *Nitric Oxide Synthase 2*

## S

SREBP-1c : *Sterol Responsive Binding Element Protein 1c*

## T

TAV : Tissu Adipeux Blanc Viscéral

TG : Triglycérides

Th : T-helper

TNF $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor alpha*

Treg : Lymphocyte T régulateur

## Liste des figures et des tables

---

**Figure 1 :** Les différentes catégories de poids en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC)

**Figure 2 :** Diversité et distribution des principaux microorganismes non pathogènes et de la biomasse bactérienne chez l'Homme sain

**Figure 3 :** Les différents tissus métaboliques affectés par l'obésité

**Figure 4 :** Histologie du tissu adipeux brun

**Figure 5 :** Le rôle de la protéine UCP-1 dans la thermogénèse du tissu adipeux brun

**Figure 6 :** Histologie du tissu adipeux blanc et le phénomène du « *browning* »

**Figure 7 :** Les deux types de développement des adipocytes bruns

**Figure 8 :** La lipogénèse et synthèse des triglycérides dans l'adipocyte

**Figure 9 :** La lipolyse dans l'adipocyte

**Figure 10 :** Les différentes sous populations des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec leur profil de sécrétion spécifique

**Figure 11 :** Les sous-populations des NKT

**Figure 12 :** Les rôles des macrophages dans le développement, l'homéostasie et les pathologies

**Figure 13 :** La différenciation des macrophages

**Figure 14 :** L'origine des MDSCs

**Figure 15 :** Les deux sous-populations majeures des MDSCs

**Figure 16 :** Un modèle du développement du diabète de type 2 (T2D) impliquant le tissu adipeux, le pancréas et le NLRP3

**Figure 17 :** La composition cellulaire immune du tissu adipeux chez le sujet mince et obèse

**Figure 18 :** Les complexes mTORC1 et mTORC2

**Figure 19 :** Les processus cellulaires régulés par mTORC1

**Figure 20 :** Les processus cellulaires régulés par mTORC2

**Figure 21 :** Les phénomènes métaboliques observés chez les souris ayant une perte de fonction de la voie de signalisation mTORC1

**Figure 22 :** Le rôle de mTORC1 dans l'adipogenèse dans des conditions physiologiques et d'obésité

**Figure 23 :** Le rôle de mTORC1 dans la masse musculaire, le métabolisme oxydatif et l'homéostasie glucidique dans des conditions physiologiques et d'obésité

**Figure 24 :** Le rôle de mTORC1 dans la régulation de la kétogenèse et la lipogenèse dans des conditions physiologiques et d'obésité

**Figure 25 :** Le rôle de mTORC1 dans la régulation de la masse et la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques dans des conditions physiologiques et d'obésité

**Figure 26 :** Le rôle de mTOR dans la régulation de l'expression des cytokines inflammatoires dans les cellules dendritiques et les macrophages

**Figure 27 :** Rôle des deux complexes mTOR dans le développement des lymphocytes Th1, Th2 et T régulateurs

**Figure 28 :** Rôle du complexe mTOR dans le développement des lymphocytes T CD8 mémoires

**Figure 29 :** Schéma montrant l'effet immuno-modulateur de la rapamycine dans le tissu adipeux des souris traitées

**Figure 30 :** Schéma récapitulant les effets de la rapamycine observés dans notre protocole

**Table1 :** Un exemple des différentes études montrant les effets des probiotiques sur le poids corporel

**Table2 :** Un exemple de molécules inhibant les deux complexes mTOR

L'obésité est caractérisée par un état inflammatoire chronique dit « à bas bruit », se traduisant par l'augmentation des taux plasmatiques de facteurs inflammatoires qui contribuent au développement des complications métaboliques telles que le diabète de type 2 et la résistance à l'insuline.

L'inflammation chronique est initiée par l'accumulation séquentielle et finement régulée de cellules immunes dans le tissu adipeux blanc, contribuant à créer un microenvironnement inflammatoire qui altère la physiologie et l'homéostasie du tissu. Une meilleure compréhension : 1) des mécanismes contrôlant les altérations de la composition en cellules immunes du tissu adipeux blanc et 2) du rôle de ces cellules dans la fonction des principaux tissus métaboliques, pourrait, à terme, permettre de proposer de nouvelles voies thérapeutiques d'immuno-intervention dans le traitement des complications métaboliques associées à l'obésité.

Durant mon parcours de thèse, j'ai étudié les conséquences métaboliques et immunologiques du traitement de souris obèses par un agent immuno-modulateur : la rapamycine, ainsi que par des probiotiques ayant des propriétés anti-inflammatoires.

### ***Partie 1 : Etude des effets de la rapamycine sur la réponse inflammatoire et l'homéostasie énergétique chez la souris obèse.***

Cette étude représente la partie principale de mon travail de thèse. L'objectif de mon projet de thèse était de définir les conséquences de l'administration prolongée de rapamycine (ou Sirolimus) sur l'inflammation du tissu adipeux blanc et le métabolisme glucidique de souris obèses. La rapamycine est un inhibiteur spécifique de la voie du *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) possédant des propriétés immuno-suppressives et antiprolifératives et qui est fréquemment utilisé chez les patients transplantés afin d'éviter le rejet du greffon. Cependant, la rapamycine a été décrite comme possédant un potentiel diabétogène et pro-inflammatoire : en effet, certains patients traités développent un diabète post-transplantation et sont plus susceptibles de présenter des pathologies inflammatoires et ceci, malgré une perte de poids.

Les objectifs de notre étude étaient de : 1) Déterminer les conséquences métaboliques (bénéfiques ou délétères) de l'administration de rapamycine et 2) Définir le profil inflammatoire des souris obèses traitées, notamment dans le tissu adipeux blanc.

***Partie 2 : Etude des effets des probiotiques sur le développement de l'obésité et la résistance à l'insuline chez la souris obèse.***

Les effets des probiotiques sur le développement de l'obésité et ses complications métaboliques et immunologiques associées sont contradictoires et restent donc à clarifier. Certaines études ont montré des effets obésogènes de certains probiotiques tandis que d'autres travaux décrivent des effets bénéfiques sur l'homéostasie énergétique.

Les objectifs de notre étude étaient de : 1) Déterminer les conséquences métaboliques et immunologiques de l'ingestion prolongée de certaines souches (ou combinaison de souches) de probiotiques dans un modèle de souris obèses et 2) Définir les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant les effets de probiotiques sur le développement de l'obésité et de l'inflammation associée.

---

***Mots-clés :*** cellules immunes, inflammation chronique, lymphocytes T-régulateurs, macrophages, métabolisme, mTOR, obésité, probiotiques, rapamycine

## ***Abstract***

---

Obesity is characterized by a low-grade chronic inflammation reflected by increased blood levels of inflammatory factors, which are known to contribute to the development of metabolic complications such as insulin resistance and type 2 diabetes.

Obesity-related inflammation is initiated by the accumulation of inflammatory immune cells within the adipose tissue as observed in obese subjects, contributing to alteration of the physiology and the metabolic homeostasis of the tissue. A better understanding of the mechanisms controlling the balance between adipose tissue immune cells and the interaction of these cells with the metabolic tissues (*e.g.* white adipose tissue) could lead to the development of immune-based new therapeutic strategies to treat metabolic complications associated with obesity.

During my PhD thesis, we worked on two projects that both aimed at studying the link between immunity and metabolism. We studied the consequences of the treatment of obese mice with the immunomodulatory drug rapamycin (Part 1) and with probiotics having anti-inflammatory properties (Part 2).

### ***Part 1: Beneficial Metabolic Effects of Rapamycin are Associated with Enhanced Regulatory Cells in Diet-Induced Obese Mice***

This part corresponded to my main project. We aimed to analyze the effect of rapamycin (or Sirolimus), on the inflammatory response and the metabolic status of high-fat diet fed mice. Rapamycin is an immuno-suppressive drug commonly used in transplanted patients to prevent graft rejection. However, the effects of rapamycin on metabolism remain elusive and it has been reported that rapamycin may have pro-inflammatory and prodiabetic properties since some transplanted patients can develop diabetes and inflammatory diseases. Rapamycin is a specific inhibitor of mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin*), a highly conserved kinase which play a key role in both metabolism and immunity.

Our aims were: 1) to define the metabolic consequences of long-term rapamycin administration and 2) to analyze the immune profile of treated animals.

## ***Part 2: A Probiotic Mixture Alleviates Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice through Adipose Tissue Cell-Remodeling***

The effects of probiotics on the development of obesity and its associated-metabolic complications are contradictory and thus remain to be clarified. In our study, we evaluated the consequences of the consumption of different strains of probiotics (or a combination of strains) selected for their anti-inflammatory properties, on the development of obesity and inflammation. We thus defined the metabolic and immune profile of probiotic-treated obese mice, mostly focusing on the adipose tissue. Finally, we attempted to identify the cellular and molecular mechanisms by which our selected probiotics exerted their metabolic and immune protective effects.

---

***Keywords*** : chronic inflammation, immune cells, macrophages, metabolism, obesity, mTOR, probiotics, rapamycin, regulatory T-lymphocytes

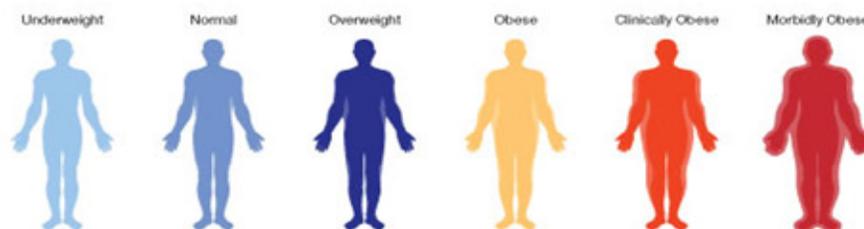
# Introduction

# I. Obésité : Définitions, Causes et Conséquences

## I.1 Définitions

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'obésité se caractérise par une « *accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé* ». L'indice de masse corporelle (IMC ; calculé par le rapport poids (kg) sur taille (m<sup>2</sup>)) est fréquemment utilisé pour évaluer le risque de maladies liées à un excès ou une insuffisance de poids chez une personne adulte (**Fig. 1**). Durant ces dernières années, la prévalence de l'obésité a augmenté de manière fulgurante de par le monde, quelque soit le sexe et avec une fréquence de plus en plus importante chez les enfants.

En France, l'obésité a augmenté de 8,5% en 1997 à 15% en 2012 (source : étude d'Obépi-Roche 2012). L'obésité peut être d'origine génétique et/ou patophysiologique mais peut également résulter d'une altération de la balance entre la prise alimentaire (apport calorique excessif) et la dépense énergétique (faire trop peu d'exercice physique).



**Figure 1.** Les différentes catégories de poids en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) :  $\text{masse}/\text{taille}^2$  ([bmiccalculator.metric.com.au](http://bmiccalculator.metric.com.au))

Cependant, la valeur d'IMC ne donne aucune information sur la composition corporelle (c'est-à-dire les proportions de masse grasse et de masse maigre), ni sur la distribution du tissu adipeux, qui peuvent être très variables selon les individus. Il est maintenant admis qu'indépendamment de l'IMC, l'excès de tissu adipeux au niveau de la cavité abdominale (obésité de type androïde) est beaucoup plus néfaste pour la santé qu'une accumulation du tissu au niveau des cuisses et des hanches (obésité de type gynoïde) (1). Ainsi, Yusuf et coll., (2004) ont démontré que pour chaque catégorie d'IMC, une augmentation du rapport taille/hanches (indice pour estimer l'accumulation du tissu adipeux au niveau abdominal) est associée à une augmentation significative du risque d'infarctus du myocarde (2). A l'inverse, il a été observé que les sujets obèses ayant une faible quantité de tissu adipeux viscéral ont une tolérance au glucose similaire aux individus de poids normal (3).

Dans certains cas, l'obésité peut être accompagnée d'un syndrome métabolique identifié par au moins 3 des 5 critères suivants : (1) périmètre abdominal  $\geq 94$  cm chez les hommes et  $\geq 80$  cm chez les femmes, (2) glycémie à jeun  $\geq 1,1$  g/l, (3) triglycérides circulants  $\geq 1,5$  g/l, (4) HDL cholestérol  $\leq 0,4$  g/l chez les hommes et  $\leq 0,5$  chez les femmes et (5) tension artérielle  $\geq 140/85$  mm Hg.

## I.2 Causes : génétiques, conditions de vie, environnementales

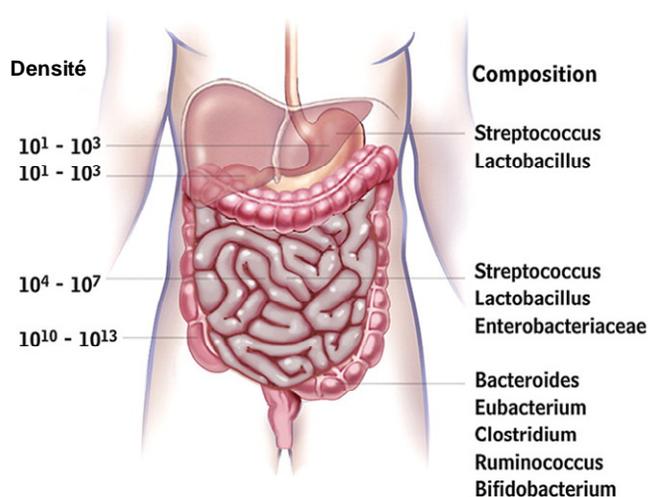
**I.2.1 Facteurs génétiques :** Les études génétiques montrent que l'obésité peut résulter d'anomalies génétiques, pointant ainsi le doigt sur l'importance du patrimoine génétique dans le développement de la maladie. Cependant les obésités d'origine génétique sont rares. Nous distinguons 3 sous-groupes d'obésité d'origine génétique: 1) Monogénique : due à des mutations sur un seul gène provoquant le développement d'une obésité sévère. C'est le cas des mutations du gène de la leptine (*ob*), du récepteur 4 à la mélanocortine (*MC4R*) (4) ou du gène *single-minded homolog 1 (SIM1)* (5, 6). 2) Syndromique, comme dans le cas du syndrome de Prader-Willi, qui est du à des altérations génétiques ou des remaniements chromosomiques provoquant ainsi des anomalies sur plusieurs gènes (6). Ces anomalies conduisent au développement d'une obésité associée à un retard mental, une dysmorphie faciale et une hypotonie. Enfin, nous distinguons 3) l'obésité polygénique, due à plusieurs mutations touchant plusieurs gènes qui, en interagissant avec l'environnement, vont conduire au développement de l'obésité (7, 8).

**I.2.2 Conditions de vie :** La principale cause de l'obésité est la dérégulation de la balance entre la prise alimentaire et la dépense énergétique. Depuis plusieurs années, la plupart des individus de par le monde consomment principalement des produits alimentaires industriels trop riches en lipides, sels et sucres. Parallèlement, avec l'évolution de la technologie et l'urbanisation, l'activité physique a diminué en faveur de la sédentarité, aggravant ainsi la dérégulation de la balance énergétique, contribuant ainsi au développement de l'obésité.

**I.2.3 Facteurs environnementaux :** Les facteurs environnementaux jouent également un rôle essentiel dans le développement de l'obésité. En particulier, notre

environnement conditionne fortement la qualité de notre microbiote intestinal, et des études récentes ont montré un rôle crucial du microbiote dans le développement de l'obésité. Ces études ont montré que certaines modifications de la flore intestinale peuvent être bénéfiques ou néfastes sur le développement de l'obésité et de ses complications associées.

**I.2.3a Le microbiote intestinal : définition et composition** Le microbiote représente l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement spécifique. Le nombre de cellules microbiennes résidant à la surface et dans le corps d'un individu est très supérieur au nombre total de cellules somatiques et germinales (10 à 20 fois). Plus précisément, le microbiote intestinal est composé de  $10^4$  à  $10^5$  milliards d'organismes majoritairement représentés par des bactéries, bien que l'on trouve également des eucaryotes, des virus et des archées (9). Le tissu intestinal est donc en contact continu avec un grand nombre d'organismes procaryotes et eucaryotes : bactéries commensales, levures, champignons et virus. La répartition et la diversité du microbiote ne sont pas homogènes le long du tractus intestinal puisque la densité et la complexité bactérienne augmente progressivement de sa partie proximale vers sa partie distale (10) (**Fig. 2, (11)**).



**Figure 2. Diversité et distribution des principaux microorganismes non pathogènes et de la biomasse bactérienne chez l'Homme sain (11).**

Dernièrement, les méthodes moléculaires, telles que le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S, ont permis de mieux caractériser la communauté bactérienne de l'intestin. Celle-ci est composée de plus de 1000 espèces différentes et constitue un écosystème microbien diversifié et dynamique. La majorité de cette communauté est « autochtone »,

indigène et stable ; toutefois, il existe de nombreuses espèces transitoires dites « allochtones » provenant de l'environnement et de l'alimentation. Le microbiote intestinale se répartit entre 10 grands groupes bactériens : les Firmicutes, les Bacteroides, les Proteobacteria et les Actinobacteria, les phyla bactériens prédominant avec une forte présence des Firmicutes dans le tractus gastro-intestinal. Au total une centaine de phyla bactériens sont représentés (dont 20% seulement qui sont cultivables de nos jours), à la fois par des bactéries aérobies et anaérobies. Si l'on considère ces rares représentants et les espèces transitoires, ce sont plus de 15000 espèces bactériennes associées au tractus gastro-intestinal (12).

Le profil du microbiote est spécifique à chaque individu. Il est composé d'une partie dominante stable (moins de 1% de la flore totale) et une autre sous-dominante instable. De plus, la complexité de la communauté bactérienne est influencée par l'âge puisqu'elle varie le long de la vie de l'individu. En effet, Le développement du microbiote commence immédiatement après la naissance et est influencé par l'alimentation infantile, le niveau d'hygiène et la prise de certains médicaments (13, 14). La composition du microbiote intestinal d'un nouveau né est très variable (15). Une étude récente a montré que les premières bactéries qui colonisent le tractus digestif des nouveaux nés sont composées majoritairement des bactéries anaérobies facultatives, plus particulièrement *Escherichia coli* et d'autres *Enterobacteriaceae* afin de créer un environnement anaérobique qui va favoriser le développement des bactéries anaérobies strictes. Chez l'adulte, les genres bactériens retrouvés dominants sont *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* et *Ruminococcus* et vont contribuer au développement de la diversité et de la complexité de la communauté microbienne (16). Cependant, cette diversité change avec l'âge et se manifeste notamment par une réduction des bifidobactéries et une augmentation des *Enterobacteriaceae* (17).

Ces populations bactériennes résidentes ont de nombreux effets bénéfiques pour l'hôte, contribuant notamment à la régulation du métabolisme (18), au développement du système immunitaire, au contrôle de l'homéostasie intestinale et de la colonisation de la muqueuse par des micro-organismes pathogènes. On peut considérer le microbiote comme un réel organe complémentaire (10), exerçant de multiples fonctions « régulatrices » de l'hôte. En retour, cette communauté bactérienne subit également l'influence de l'hôte (facteurs génétiques, antibiotiques, alimentation (fibres), sécrétions des acides biliaires et réactivité du système immunitaire). De cet équilibre maintenu ou rompu pourraient s'établir les conditions de nombreuses pathologies (certains types de cancer), immunes (*e.g.* la maladie de Crohn ou les maladies inflammatoires de l'intestin) ou métaboliques (*e.g.* l'obésité ou les maladies

cardiovasculaires) qui peuvent être associée à une modification de la fonction de la barrière intestinale.

***1.2.3b Le microbiote intestinal : les liens avec l'obésité et le métabolisme*** Les premiers liens entre le microbiote et la régulation du poids corporel ont été mis en évidence chez des souris axéniques qui possèdent la caractéristique d'être plus minces comparées aux souris sauvages. La colonisation du tractus digestif des souris axéniques par une communauté microbienne d'une souris donneuse conduit à une augmentation du poids de la souris, plus particulièrement la masse grasse accompagnée d'une altération des paramètres métaboliques (développement de la résistance à l'insuline) (19). Ces observations suggèrent que le microbiote joue un rôle important dans la métabolisation des nutriments et est impliqué dans l'augmentation de l'extraction de l'énergie à partir des régimes alimentaires assimilés.

Le microbiote intestinal est montré de plus en plus comme étant un facteur important dans la régulation du métabolisme de l'organisme. Plusieurs études ont démontré la capacité de la communauté microbienne à moduler des voies de signalisation de l'organisme influençant ainsi la balance énergétique et le métabolisme de ce dernier (19-21). Le microbiote est capable d'influencer le développement du diabète de type 2 et la résistance à l'insuline *via* l'installation de l'inflammation chronique dite à bas bruit qui est une caractéristique de l'obésité (20, 22). Cette inflammation est provoquée par plusieurs mécanismes dont la modification de la barrière intestinale permettant ainsi la translocation de certains éléments pathogènes comme le LPS (lipopolysaccharide). Le LPS, une molécule présente à la surface des bactéries à Gram négatif, est connu pour avoir des propriétés pro-inflammatoires puissantes et stimule les voies de signalisation inflammatoire au sein de l'organisme ce qui contribue au premier stade du développement de l'inflammation chronique et des désordres métaboliques. En effet, l'équipe de Cani et Coll a montré que la mise des souris sous régime hyperlipidique a provoqué une augmentation des taux du LPS (2 à 3 fois) dans le contenu de l'intestin et le sang des animaux, ce phénomène est appelé « l'endotoxémie métabolique ». De plus, ils ont montré qu'une diffusion continue du LPS dans le tissu adipeux sous-cutané des souris même les effets du régime hyperlipidique provoquant une augmentation du poids corporel et une dérégulation des paramètres métaboliques et inflammatoires (22). Ces observations concernant l'endotoxémie métabolique ont été également rapportées dans des études réalisées chez l'Homme. En effet, une alimentation régulière riche en matières lipidiques augmente l'endotoxémie chez l'Homme (23-25). De plus, elle est associée à une augmentation du risque d'incidence du diabète (26).

Le microbiote intestinal est altéré chez les sujets obèses et est influencé par le changement du poids corporel (dysbiose). Par comparaison au microbiote intestinal de souris de poids normal, le microbiote de souris obèses déficientes pour le gène de la leptine (souris *ob/ob*) contient un nombre plus important des bactéries du genre Firmicutes et moins de Bacteroides (27). Des changements similaires ont été observés chez les sujets humains obèses (28). Ce changement reste un sujet à débat puisque des résultats contradictoires ont été obtenus dans une autre étude et qui montrent que le ratio Firmicutes/Bacteroidetes est diminué chez des patients diabétiques comparés à des patients contrôles (29). En revanche, le niveau des Bacteroides augmente avec une diminution du poids corporel (28). De plus, des effets similaires ont été observés chez les sujets ayant perdu du poids à la suite d'une chirurgie bariatrique (30). Cependant, même si l'obésité affecte de fait la composition du microbiote, des études supplémentaires restent nécessaires afin de conclure clairement à la contribution du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité ou de clarifier si le changement de la composition du microbiote intestinal est une conséquence de l'obésité.

***1.2.3c Les liens entre l'endotoxémie métabolique et la perméabilité intestinale*** Un des rôles de la barrière intestinale est de protéger l'hôte des invasions des pathogènes (*e.g.* des molécules comme le LPS ou des microbes). Dans l'obésité, une altération de cette barrière a été observée et serait responsable du développement de l'endotoxémie métabolique. Ce dysfonctionnement au niveau de la barrière intestinale est associé à une augmentation de la perméabilité du tissu intestinal chez les souris obèses, laissant ainsi la translocation des molécules pathogènes (31, 32). La perméabilité intestinale est régulée par l'expression des complexes protéiques (*e.g.* claudin, occludin et zonula occludens 1) impliquées dans le maintien de la barrière intestinale d'un point de vue mécanique. Chez les souris obèses, une altération de l'expression et de la distribution de ces protéines est observée au niveau de l'intestin grêle, ce qui est associé à une augmentation de la perméabilité intestinale chez les animaux (31, 32).

Plus récemment, des études ont montré une implication du système endocannabinoïde dans la régulation de la fonction de cette barrière. En effet, le microbiote intestinal module le système endocannabinoïde au niveau de l'intestin permettant ainsi la régulation de l'expression des protéines des jonctions serrées dans le but de réduire la perméabilité intestinale et l'endotoxémie métabolique chez les souris obèses (33).

Ces études réalisées dans des modèles animaux révèlent l'importance de la régulation de la fonction de la barrière intestinale dans l'obésité. Un dysfonctionnement au niveau de cette barrière provoque le développement d'une endotoxémie, d'une inflammation chronique et donc des désordres métaboliques. Cependant, même si un nombre non négligeable d'études ont décrit une association entre l'endotoxémie métabolique et le changement de la composition du microbiote chez l'Homme, d'autres études concernant la fonction de la barrière intestinale et sa modulation sont nécessaires afin de mieux comprendre les relations entre le changement de la composition du microbiote et l'endotoxémie métabolique chez les sujets obèses et diabétiques.

Enfin, le microbiote intestinal est influencé par différents facteurs comme l'alimentation et les pratiques médicales comme les antibiotiques mais également sa composition peut être modulée par les prébiotiques (e.g. inulin et galactoligosaccharide) ou les probiotiques. De ce fait, des stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation des certaines souches de probiotiques ont été proposées afin de rétablir l'homéostasie et l'équilibre au niveau du microbiote intestinal et impacter donc le développement de l'obésité.

***1.2.3d Les probiotiques : définition et effets dans le développement de l'obésité*** Un micro-organisme est considéré comme un probiotique s'il 1) présente une innocuité pour l'hôte, 2) est résistant aux acides gastriques et aux sels biliaires, 3) adhère à la muqueuse intestinale, 4) persiste un certain temps dans le tractus intestinal, 4) produit des substances anti-microbiennes et 5) module le système immunitaire (34). Les probiotiques sont principalement représentés par des bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Certains probiotiques présentent des effets bénéfiques pour l'organisme. En effet, leurs rôles bénéfiques ont déjà été montrés dans plusieurs pathologies inflammatoires comme les colites et la maladie de Crohn (35, 36). L'étude des propriétés « anti-obésité » des probiotiques est devenue un large champ d'investigation ces dernières années. Plusieurs souches de probiotiques ont été testées dans divers modèles expérimentaux d'obésité ou de surpoids et certaines ont montré des effets bénéfiques sur le poids corporel, le développement du tissu adipeux ou la prise alimentaire (37-39). Cependant, certains probiotiques ont montré des effets plutôt obésogènes sur l'organisme (40-42) et d'autres ne présentent aucun effet sur la prise ou la perte du poids corporel (39, 43) (voir exemple **Table 1**). En effet, plusieurs observations réalisées chez l'Homme ou les rongeurs ont montré des effets contradictoires sur la régulation du poids corporel ou le développement de l'obésité. Ces effets obtenus semblent

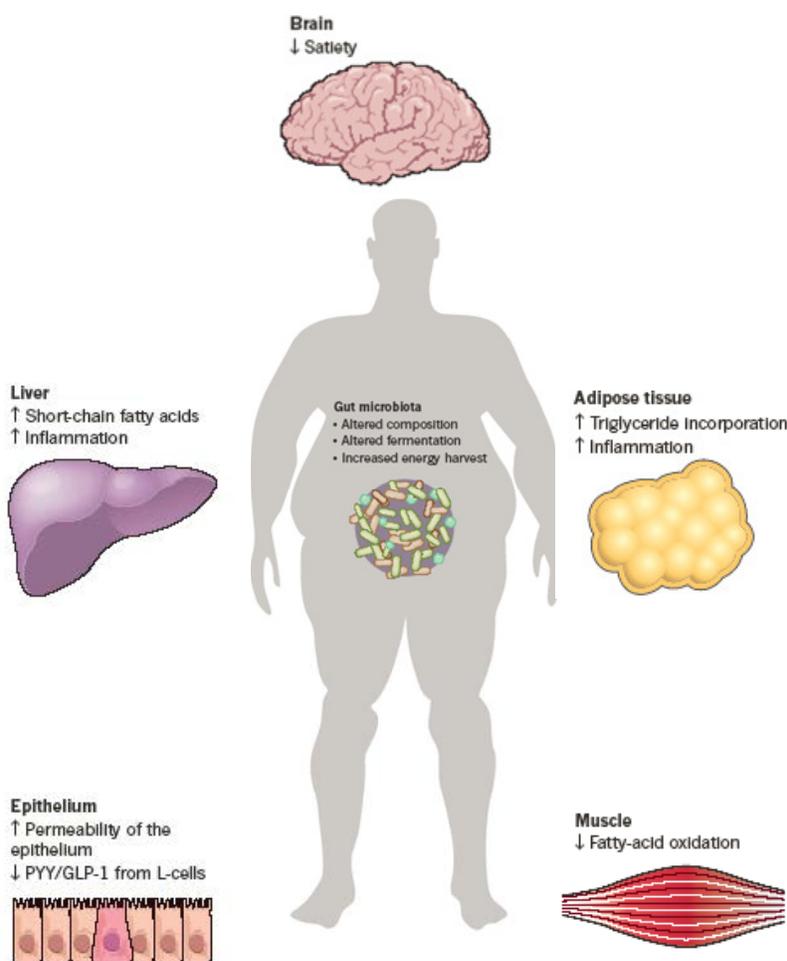
être spécifiques de la souche utilisée, ce qui révèle la complexité de l'interaction et de l'influence des probiotiques sur le microbiote et son interaction avec l'hôte. Ces variations au niveau des effets observés des probiotiques peuvent être dus à plusieurs facteurs comme l'alimentation chez l'Homme. Des études ont montré que les probiotiques favorisent la prise du poids chez les enfants ayant subi une malnutrition (44, 45). Cependant, d'autres études réalisées chez l'Homme ont montré des effets bénéfiques des probiotiques sur la prise du poids comme le ralentissement du gain de poids chez les enfants après la naissance (46) ou une réduction significative du poids corporel chez les sujets obèses (47) (**Table 1**). Ces effets contradictoires concernant les effets des probiotiques sur le poids corporel peuvent être également dus au modèle animal utilisé (souris vs. rat), à la durée du traitement, au nombre de colonies employées et au protocole d'administration des probiotiques (**Table 1**). De plus, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore bien élucidés, ce qui nécessite la réalisation d'études plus approfondies afin de mieux comprendre les effets spécifiques de chaque souche et son impact sur la composition du microbiote et la fonction de la barrière intestinale.

<b>Etudes chez l'Homme</b>			
<b>Souches utilisées</b>	<b>Dose (CFU)</b>	<b>Durée du traitement</b>	<b>Effets observés</b>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1x10 <sup>7</sup>	4 mois	Augmentation du poids corporel
<i>Bifidobacterium longum</i> et <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ou <i>Lactobacillus paracasei</i>	(1,29x10 <sup>8</sup> à 2,58x10 <sup>8</sup> , 6,45x10 <sup>8</sup> , 2,58x10 <sup>8</sup> respectivement)	14 à 16 semaines	Augmentation du poids corporel
<i>Lactobacillus reuteri</i> ou <i>Lactobacillus casei</i>	5x10 <sup>8</sup> (pour chaque souche)	6 mois	Augmentation du poids corporel
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1x10 <sup>8</sup>	9 mois	Aucune modification du poids corporel
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1x10 <sup>11</sup>	12 semaines	Réduction du poids corporel
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1x10 <sup>10</sup>	4 semaines	Inhibition de la prise de poids excessive
<b>Etudes chez les rongeurs</b>			
<b>Souches utilisées</b>	<b>Dose (CFU)</b>	<b>Durée du traitement</b>	<b>Effets observés</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> (Souris)	1x10 <sup>7</sup> ou 1x10 <sup>9</sup>	8 semaines	Réduction du poids corporel
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Souris)	1x10 <sup>7</sup> ou 1x10 <sup>9</sup>	8 semaines	Réduction du poids corporel
<i>Lactobacillus Sakei</i> ou <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Souris)	1x10 <sup>8</sup>	3 semaines	Réduction du poids corporel
<i>Lactobacillus gasseri</i> (Souris)	1x10 <sup>9</sup> ou 1x10 <sup>10</sup>	10 semaines	Réduction du poids corporel
<i>Lactobacillus ingluiviei</i> (Souris)	4x10 <sup>10</sup>	une seule inoculation	Augmentation du poids corporel
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (Souris)	1x10 <sup>8</sup>	4 semaines	Augmentation du poids corporel
<i>Lactobacillus gasseri</i> ou <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ou <i>Bifidobacterium lactis</i> (Rat)	2 à 5x10 <sup>12</sup>	4 semaines	Aucune modification du poids corporel
<i>Lactobacillus gasseri</i> (Rat)	6x10 <sup>7</sup>	4 semaines	Aucune modification du poids corporel

**Table 1. Un exemple des différentes études montrant les effets des probiotiques sur le poids corporel.**

### I.3 Conséquences

L'obésité est un facteur de risque pour le développement de plusieurs complications métaboliques telles que la dyslipidémie, la résistance à l'insuline - qui se définit par l'incapacité des organes périphériques comme le foie, le muscle, le tissu adipeux et le cerveau à répondre efficacement à l'insuline – et le diabète de type 2 (**Fig. 3**, (48))



**Figure 3. Les différents tissus métaboliques affectés par l'obésité.** L'obésité altère la composition du microbiote. Développement et expansion du tissu adipeux blanc et des perturbations métaboliques qui sont observées au niveau des tissus périphériques comme le foie, le muscle et le système nerveux central (adapté de 48)).

L'obésité est également associée à des complications hépatiques telles que la stéatose hépatique non alcoolique NAFLD (*non-alcoholic fatty liver diseases*) qui peut se développer en même temps que le diabète de type 2. Le terme NAFLD regroupe l'ensemble des pathologies liées au métabolisme des lipides dans le foie sans lien avec une consommation excessive d'alcool. Elles se représentent principalement sous deux formes : 1- une stéatose,

c'est-à-dire une accumulation des lipides dans le foie, dont l'évolution est le plus souvent réversible et bénigne et 2- une stéatohépatite ou NASH (*non alcoholic steatohepatitis*) caractérisée par le développement d'une inflammation associée à la stéatose, irréversible et susceptible d'évoluer vers une fibrose hépatique, une cirrhose puis un hépatocarcinome (49). En plus d'un profil métabolique altéré, les sujets obèses souffrent également fréquemment d'hypertension artérielle et sont plus sujets au développement d'infarctus du myocarde et d'insuffisances cardiaques (50). En outre, l'obésité est associée à des complications respiratoires comme les apnées de sommeil et une obstruction des voies respiratoires, des complications qui concernent 40% des individus obèses (51). Finalement, l'obésité est également un facteur de risque important pour le développement de certains types de cancer comme le cancer du sein, de l'endomètre, de l'œsophage et du colon (52) et de certaines pathologies inflammatoires comme l'arthrite (53, 54).

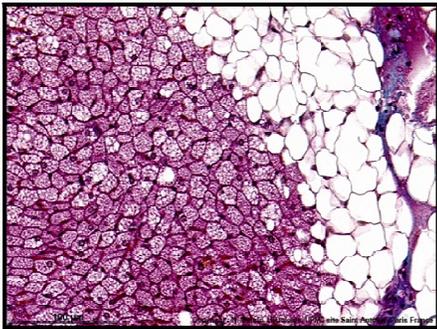
## II. Le tissu adipeux

### II.1 les différents types de tissus adipeux

Chez les mammifères, le tissu adipeux est classé selon sa morphologie. Nous distinguons deux types de tissu adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc.

#### II.1.1 le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est spécialisé dans la régulation de la thermogénèse et de la dépense énergétique. Richement innervé et vascularisé, le tissu adipeux brun se caractérise par des adipocytes de petite taille qui contiennent de multiples gouttelettes lipidiques, et un nombre élevé de mitochondries (**Fig. 4**).



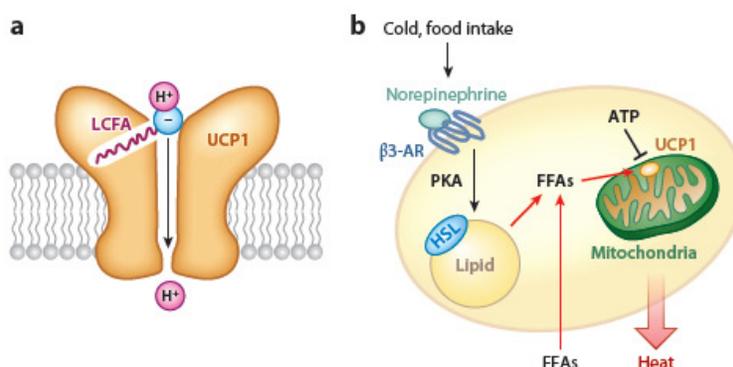
**Figure 4. Histologie du tissu adipeux brun.** Coloration à l'éosine et à l'hématoxyline du tissu adipeux brun chez le rongeur (à gauche de la coupe : coloration rouge/rose). Il se caractérise par des cellules de plus petite taille avec des multiples gouttelettes lipidiques contrairement au tissu adipeux blanc (à droite de la coupe) qui se caractérise par des adipocytes larges contenant une seule gouttelette lipidique ([www.edu.upmc.fr](http://www.edu.upmc.fr)).

Chez les rongeurs, le tissu adipeux brun est localisé au niveau des régions inter-scapulaires, sub-scapulaires et cervicales et au niveau du tissu adipeux de la zone supra-claviculaire et para-spinale chez l'Homme (55-57). De plus, le tissu adipeux brun se développe au niveau de l'aorte et zones périrénales. La fonction principale de ce tissu est de réguler la production de la chaleur en stimulant la dépense énergétique selon un processus appelé la « thermogénèse ».

**II.1.1a Différenciation du tissu adipeux brun :** Les adipocytes du tissu adipeux brun se développent à partir des cellules progénitrices exprimant le facteur Myf-5. La différenciation est contrôlée par des facteurs de transcription adipogéniques comme PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ) et C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*). Cependant, des facteurs nucléaires ont été identifiés comme spécifiquement impliqués dans la différenciation du tissu adipeux brun comme le co-répresseur nucléaire RIP140, PRDM16 (*PR domain containing 16*), PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) et FOXC2 (*forkhead box C2*). Récemment, une étude a

montré l'implication de la protéine Plac8 dans le développement du tissu adipeux brun *via* l'induction du facteur C/EBP $\beta$  (58).

**II.1.1b Rôle du tissu adipeux brun dans la thermogénèse :** Le tissu adipeux brun se caractérise par une forte expression de la protéine UCP-1 (*uncoupling protein-1*) localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. La thermogénèse est assurée par la protéine UCP-1 impliquée dans le découplage de la phosphorylation oxydative afin de générer de l'énergie dissipée sous forme de chaleur. La captation du glucose peut être détectée par tomographie par émission de positrons FDG-PET ( $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose positron emission tomography) (59-61) (**Fig. 5**).



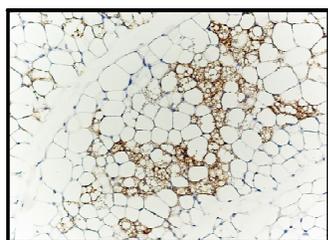
**Figure 5. Le rôle de la protéine UCP-1 dans la thermogénèse du tissu adipeux brun.** a. Un modèle hypothétique du découplage du proton dépendant d'UCP-1. b. En réponse aux nutriments ou au froid, la norepinephrine agit au niveau du récepteur  $\beta_3$ -AR ( *$\beta_3$  adrenergic receptor*) conduisant ainsi à l'activation de la protéine PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) et à la phosphorylation de la protéine HSL (*hormone-sensitive lipase*). Les acides gras (FFA) sont générés à partir de la lipolyse induite par la PKA ou par leur captation à partir de la circulation sanguine. Ces acides gras seront utilisés comme substrats pour assurer le transport des protons par UCP-1 et pour le processus de la bêta-oxydation afin de générer de la chaleur (61).

Le tissu adipeux brun a été souvent décrit chez les nouveau nés humains, et on pensait que ce tissu disparaissait avec l'âge. L'utilisation du FDG-PET a permis récemment de mettre en évidence l'existence d'un tissu adipeux brun fonctionnel chez les personnes adultes (57, 62). Ces observations suggèrent qu'une meilleure compréhension du développement et de l'activation de ce tissu pourrait servir à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le développement de l'obésité (faire pencher la balance énergétique). En effet, une étude récentes réalisée par Takeshi et Coll a montré une possibilité de réactiver le tissu adipeu brun chez l'Homme et ceci en stimulant les canaux TRP (*transient receptor potential*) par un traitement à long terme aux capsinoïdes (capsiate et capsaïcine). Les chercheurs ont montré que l'administration à long terme des capsinoïdes à des sujets minces ayant une activité faible

ou presque indetectable du tissu adipeux brun a provoqué une augmentation de l'activité de ce dernier, accompagnée d'une diminution légère du poids corporel des sujets (63). Ces effets ont été également observés chez des sujets humains obèses ayant eu une réduction du poids corporel et une augmentation de la dépense énergétique suite à un traitement aux capsinoïdes pendant 12 semaines (64).

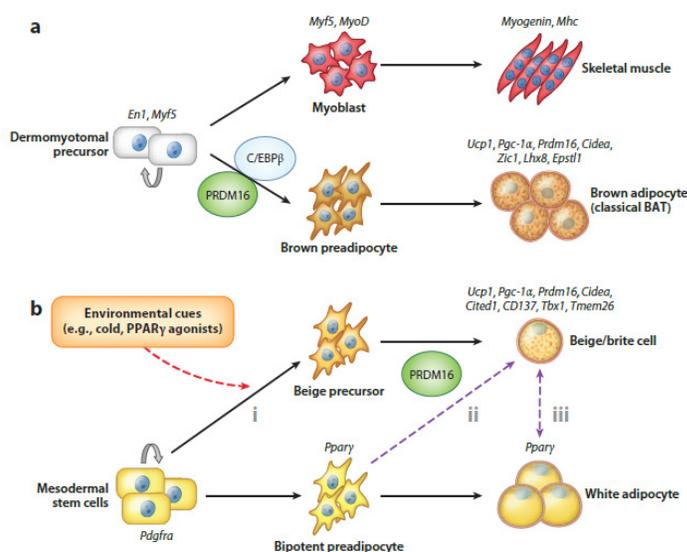
## II.2 Le « *browning* » ou « brunisation » du tissu adipeux blanc

Le processus de *browning* se caractérise par l'apparition d'adipocytes bruns dans le tissu adipeux blanc et le muscle (Fig. 6) (65). Ce phénomène est déclenché à la suite d'un stimulus comme une exposition prolongée au froid (66) et est contrôlé par le système nerveux sympathique, plus précisément par la voie  $\beta$ 3-adrénergique chez les rongeurs (67).



**Figure 6. Histologie de tissu adipeux blanc et le phénomène du « *browning* ».** Une coupe histologique d'un tissu adipeux blanc ayant subi le phénomène de « brunisation » ou de « *browning* » révélé par la morphologie multiloculée des adipocytes bruns et par l'immuno-marquage de la protéine UCP-1.

Des études récentes ont montré que les adipocytes beiges qui se développent dans le tissu adipeux blanc et ceux du tissu adipeux brun dérivent d'un lignage cellulaire différent (Fig. 7).



**Figure 7. Les deux types de développement des adipocytes bruns (63).** a. le développement des adipocytes bruns classiques qui est régulé par l'expression des facteurs PRDM16 et C/EBPβ durant le développement embryonnaire. b. Le phénomène du « *browning* » issu des adipocytes précurseurs exprimant le facteur PDGFα (*platelet-derived growth factor alpha*) est sous le contrôle des signaux environnementaux (le froid et les agonistes de PPARγ) et de l'expression du facteur PRDM16.

Les adipocytes du tissu adipeux brun ressemblent plus aux cellules musculaires et expriment le marqueur myogénique Myf-5 (68, 69), tandis que les adipocytes beiges qui se développent

dans le tissu adipeux blanc sont négatifs pour le facteur Myf-5 et ressemblent plus aux précurseurs des adipocytes blancs (69).

Les études de lignage cellulaire suggèrent que les cellules stromal mésenchymateuses (négatives pour le facteur Myf-5) présentes dans le tissu adipeux blanc peuvent se différencier en adipocytes beiges suite à un stimulus thermogénique. Aujourd'hui, on emploie le terme « *brite* » ou « beige » pour désigner les adipocytes bruns qui apparaissent dans le tissu adipeux blanc après une exposition prolongée au froid. Les mécanismes cellulaires et moléculaires exacts contribuant au phénomène du « *browning* » ne sont pas encore bien élucidés. Cependant, deux mécanismes potentiels sont proposés aujourd'hui. Le premier mécanisme met en jeu une différenciation *de novo* des adipocytes bruns dans le tissu adipeux blanc et le deuxième suggère l'existence d'un processus de trans-différenciation des adipocytes blancs en adipocytes bruns (**Fig. 7**).

### II.3 le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc constitue le tissu adipeux principal, en terme de quantité, chez un sujet adulte. Outre son rôle d'isolant thermique et mécanique, il représente l'une des principales réserves énergétique de l'organisme. Nous distinguons deux types de localisation du tissu adipeux blanc : une localisation sous-cutanée entre le derme et l'aponévrose musculaire et une localisation viscérale dans la cavité abdominale.

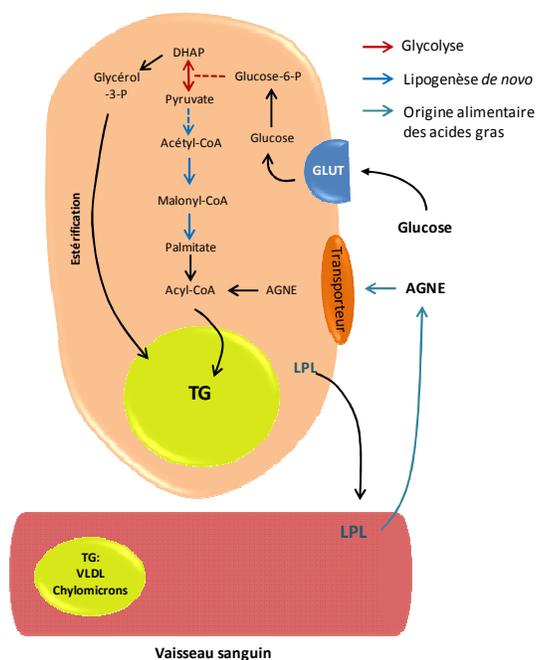
Le tissu adipeux blanc est un tissu hétérogène constitué de deux fractions principales : les adipocytes et la fraction stroma-vasculaire (FSV) qui contient elle-même plusieurs types cellulaires (préadipocytes, cellules stromal mésenchymateuses, cellules endothéliales et cellules immunes).

Le rôle du tissu adipeux blanc est de réguler la balance énergétique en stockant l'excès d'énergie sous forme de triglycérides qui restent à disposition des autres tissus tels que le foie et le muscle pour assurer leurs fonctions métaboliques. Enfin, la régulation de la mise en réserve/libération d'énergie par le tissu adipeux blanc est assurée par deux voies métaboliques principales : la lipogenèse et la lipolyse.

### II.3.1 L'adipocyte

La cellule majoritaire du tissu adipeux blanc est l'adipocyte qui représente ~50% du nombre de cellules totales et peut atteindre jusqu'à 100-200 µm de diamètre. Les deux fonctions métaboliques principales de l'adipocyte sont la lipogenèse et la lipolyse. Ces deux processus métaboliques sont finement régulés par des signaux venant des organes périphériques et du système nerveux central ; notamment l'hypothalamus. L'adipocyte mature se différencie à partir de progéniteurs médullaires et/ou de préadipocytes déjà présent dans la FSV. Une fois différencié, l'adipocyte ne peut pas proliférer et l'accumulation du tissu adipeux durant l'obésité est le résultat de deux phénomènes cellulaires qui sont l'hyperplasie (augmentation du nombre de cellules) et l'hypertrophie (augmentation du volume des adipocytes) (70).

**II.3.1a La lipogenèse** Deux voies sont impliquées dans le stockage des lipides dans les adipocytes (**Fig. 8**). La première consiste à capturer directement les triglycérides (TGs) associées aux chylomicrons et aux VLDL (*very low density lipoprotein*)



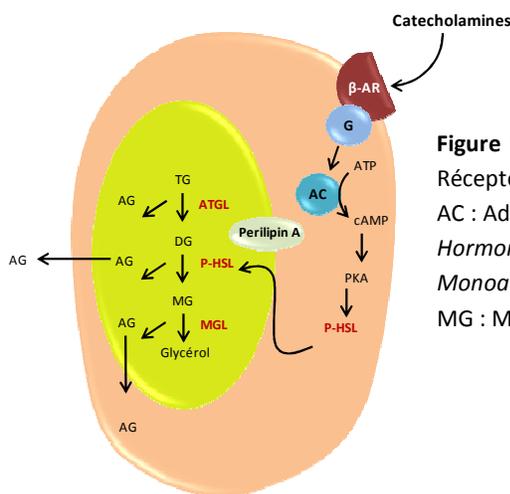
**Figure 8. La lipogenèse et synthèse des triglycérides dans l'adipocyte.** GLUT : Transporteur de glucose ; DHAP : Dihydroxyacétone phosphate ; TG : triglycérides ; ACC : *acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase* ; FAS : *fatty acid synthase* ; AGNE : acide gras non estérifié ; LPL : *lipoprotein lipase* ; VLDL : *very low density lipoprotein*.

circulants provenant de l'alimentation ou de la lipogenèse hépatique. La deuxième voie concerne la lipogenèse *de novo*, une voie minoritaire chez l'Homme et qui correspond à la

néo-synthèse d'acides gras à partir des substrats non lipidiques tels que le glucose. Le glucose est transporté vers le cytosol *via* ses transporteurs spécifiques (GLUT1 et GLUT4) et sera dégradé en pyruvate par le processus de la glycolyse. Le pyruvate est transformé en acide gras à longue chaîne saturée *via* des enzymes clés qui sont la protéine ACC (*acetyl-coA carboxylase*) et la protéine FAS (*fatty acid synthase*).

Ces acides gras sont ensuite re-estérifiés pour donner les TGs. La lipogenèse est contrôlée par plusieurs facteurs tels que l'insuline et la leptine. L'insuline exerce un rôle important en favorisant le stockage par plusieurs mécanismes : La régulation de l'expression des gènes impliqués dans le processus de la lipogenèse tels que la LPL qui possède un rôle important dans la captation des acides gras par les adipocytes, l'expression et la translocation du transporteur GLUT4 pour permettre l'entrée du glucose. De plus, elle contrôle l'état d'activation de certaines enzymes comme l'ACC et également sur le facteur de transcription SREBP-1c (*sterol responsive binding element protein-1c*) qui joue un rôle clé dans la captation et la synthèse des acides gras (71-73)

**II.3.1b La lipolyse** un processus métabolique qui peut être contrôlé par l'insuline et qui consiste à hydrolyser les TGs et les acides gras (AGs) lorsque les besoins énergétiques de l'organisme ne sont pas satisfaits par l'alimentation. Il s'agit d'un processus séquentiel qui implique plusieurs lipases contribuant à la dégradation des TGs en glycérol et acides gras non-estérifiés (AGNE). Les TGs sont clivés en diglycérides par l'ATGL et puis les DGs sont pris en charge par la HSL (*hormone-sensitive lipase*) afin de d'hydrolyser leurs substrats en monoglycérides. Les monoglycérides sont ensuite pris en charge par la MGL (*monoacylglycerol lipase*) et dégradés en glycérol et acides gras non-estérifiés (**Fig. 9**).



**Figure 9. La lipolyse dans l'adipocyte.**  $\beta$ -AR : Récepteur beta-adrénergique ; G : protéine G ; AC : Adénylate cyclase ; ATGL : desnutrin ; HSL : *Hormone-sensitive lipase* ; MGL : *Monoacylglycerol lipase* ; DG : Diglycérides ; MG : Monoglycérides, PKA : Protéine kinase A.

Cependant, il est suggéré que plusieurs lipases HSL sont impliquées dans l'hydrolyse des TGs dans les adipocytes qui ont des affinités différentes pour les TGs (l'ATGL possède une affinité 10 fois plus élevés à hydrolyser les TGs en DGs) (74). La HSL est régulée par plusieurs mécanismes (75, 76) (**Fig. 9**). La phosphorylation de la HSL active l'enzyme et contribue ainsi à sa redistribution dans les compartiments cellulaires (du cytoplasme vers les vacuoles lipidiques). Enfin, les périlipines; protéines exprimées à la surface des vacuoles lipidiques, vont réguler la localisation et la stabilisation de la HSL à la surface des gouttelettes lipidiques.

En revanche, la régulation de l'ATGL (*adipose triglyceride lipase*) est moins connue. Le niveau de cette protéine ne varie pas à la surface des vésicules lipidiques une fois activée (77), et son activité est augmentée par ABHD5/CGI58 (*alpha, beta hydrolase domain containing protein 5/ comparative gene identification 58*) (78). L'ATGL en interagissant avec la CGI58 va entraîner l'hydrolyse des TGs (79). Les acides gras générés sont libérés dans la circulation sanguine puis transportés vers les tissus métaboliques actifs. Une fois dans les tissus, les acides gras sont pris en charge par le processus de la  $\beta$ -oxydation pour générer de l'ATP et les acétyl coenzyme A. Le glycérol obtenu est converti par la glycérol kinase du foie et va contribuer à la synthèse des TGs (80).

### **II.3.2 La fraction stroma-vasculaire**

La fraction stroma-vasculaire est composée d'un mélange hétérogène de cellules contenant les préadipocytes, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules endothéliales et les cellules immunes. Les cellules immunes de la fraction stroma-vasculaire ayant fait l'objet de mes travaux de thèse, un paragraphe spécifique leur sera dédié (**III**).

**II.3.2a Les préadipocytes** sont des cellules d'aspect fibroblastique prédisposés à devenir des futurs adipocytes selon un processus cellulaire appelé « l'adipogenèse ». Une prise calorique excessive sans une dépense énergétique augmentée favorise une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes. L'augmentation du nombre des adipocytes est régulée par des signaux qui vont stimuler la conversion des cellules progénitrices en préadipocytes qui à leur tour se différencieront en adipocytes matures.

**L'adipogenèse** se déroule en deux phases : l'engagement des cellules souches pluripotentes en préadipocytes et la phase terminale de différenciation.

La première phase consiste à la conversion des cellules souches pluripotentes en préadipocytes sous l'action des différents facteurs tels que les protéines de la famille des BMP (*bone morphogenetic protein*), la voie de signalisation « Wnt » ainsi le facteur Hh (*hedgehog*). Une fois ce processus terminé, les préadipocytes ne peuvent pas se développer en d'autres types cellulaires. Durant la deuxième phase, la différenciation terminale, les préadipocytes se différencient en adipocytes matures et vont acquérir toute la machinerie nécessaire pour assurer la synthèse et le transport lipidique, la régulation de la voie de signalisation de l'insuline et la sécrétion des adipokines. Cette phase de différenciation terminale implique une cascade de facteurs de transcription essentiels à ce processus. Le facteur de transcription PPAR $\gamma$  est essentiel à l'adipogenèse, notamment dans le maintien de l'état de différenciation des cellules. De plus, des facteurs de la famille de C/EBP sont connus pour participer à la régulation de l'adipogenèse selon une cascade d'évènement bien régulée (81).

**II.3.2b Les cellules endothéliales** des capillaires sanguins régulent les échanges des médiateurs, métabolites et de cellules entre le tissu adipeux et le sang. Durant l'expansion du tissu adipeux blanc, l'angiogenèse est un processus important qui accompagne l'expansion tissulaire afin d'apporter les nutriments et les métabolites nécessaires à sa fonction. L'angiogenèse est provoquée par la sécrétion du facteur VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) par les adipocytes qui va agir au niveau des cellules endothéliales (82). Des travaux ont montré l'importance de la vascularisation dans le développement du tissu adipeux blanc. Une inhibition de l'angiogenèse par l'utilisation des composés anti-angiogéniques dirigés contre le réseau vasculaire du tissu adipeux conduit à une prévention du développement du tissu adipeux et à une réversion de l'obésité (83, 84).

**II.3.2c Les cellules stromal mésenchymateuses (MSCs)** De nombreux travaux suggèrent l'existence de cellules souches au sein du tissu adipeux humain (85, 86). En effet, la FSV contient des cellules qui, en conditions adipogéniques, expriment des transcrits spécifiques des adipocytes et une fois différenciées, peuvent acquérir les fonctions métaboliques et sécrétoires des adipocytes matures (87). De plus, ces cellules peuvent se développer en cellules qui expriment des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales une fois cultivées dans les conditions adaptées (88). Les cellules de la FSV humaine peuvent également acquérir *in vitro* des marqueurs biochimiques caractéristiques de lignages cellulaires variés : myogénique (89), chondrogénique (90) et ostéogénique (91).

### III. Les cellules immunes du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est un organe endocrine capable de produire des hormones et des cytokines afin de réguler l'homéostasie énergétique de l'hôte. La production de ces facteurs, notamment les cytokines, est due essentiellement à la présence de cellules immunes au sein de ce tissu.

#### III.1 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LcB) se développent dans la moelle osseuse. Durant ce développement, les cellules vont acquérir l'expression du récepteur B (*B cell receptor*) et des marqueurs CD19 et CD21 qui forment un complexe afin d'assurer la transduction du signal. Les LcB sécrètent les immunoglobulines et peuvent internaliser – via leurs immunoglobulines membranaires- un pathogène et le présenter sur les molécules du complexe majeur de classe II (CMH II). De ce fait les LcB peuvent présenter l'antigène aux lymphocytes T et, donc, les activer (92).

#### III.2 Les lymphocytes T

Ce sont des cellules d'origine hématopoïétique et leur différenciation se déroule dans le thymus. Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  (LcT) possèdent un récepteur TCR constitué des deux chaînes :  $\alpha$  et  $\beta$ . Le récepteur TCR (*T cell receptor*) est généralement associé à d'autres complexes protéiques multicaténaires, les CD3 (composés de deux chaînes  $\epsilon$ , de deux  $\zeta$ , une  $\delta$  et une  $\gamma$ ).

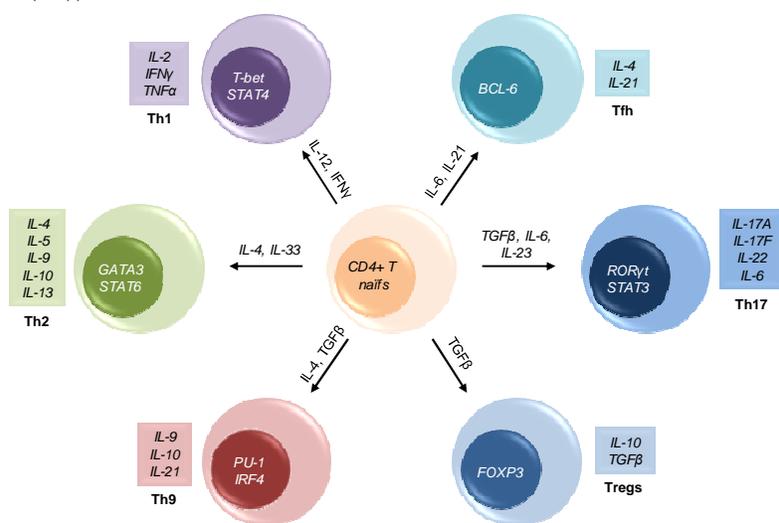
Les LcT sont divisés en deux sous-populations majeures et sont distinguées par l'expression des marqueurs spécifiques à leur surface. Nous distinguons les lymphocytes T auxiliaires exprimant le CD4 dont le rôle est primordial dans la coordination du système immunitaire et les lymphocytes T cytotoxiques exprimant le marqueur CD8 qui participent uniquement à la réponse cellulaire. Ces deux sous-populations possèdent des différences importantes dans leurs fonctions régulatrices ou effectrices mais aussi dans leurs modalités de reconnaissance de l'antigène.

##### III.2.1 Les lymphocytes CD4<sup>+</sup>

Les LcT CD4<sup>+</sup> sont des cellules essentielles dans la régulation du système immunitaire. Ils sont impliqués dans plusieurs fonctions telles que l'activation du système immunitaire inné,

des LcB, des LcT cytotoxiques mais également des cellules non-immunes. En plus de leur rôle activateur de la réponse immunitaire, les LcT CD4<sup>+</sup> peuvent intervenir dans la suppression de la réponse immunitaire dans certaines conditions.

Une fois les LcT activés, ils se différencient en plusieurs sous-populations cellulaires. La différenciation en une sous-population spécifique est dépendante des cytokines présentes dans le microenvironnement. En plus des LcT CD4<sup>+</sup> classiques dénommés T-helper 1 (Th1) et T-helper 2 (Th2), d'autres sous-populations de lymphocytes ont été identifiées. Nous distinguons les T-helper 17 (Th17), les T régulateurs (Treg), les T folliculaires et les T-helper 9 (Th9), chacune avec son profil spécifique d'expression de gènes et de cytokines (**Fig. 10**, (93)).



**Figure 10. Les différentes sous-populations des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec leur profil de sécrétion spécifique chez les rongeurs.** La différenciation des LcT CD4 naïfs en une population spécifique est dépendante des cytokines se trouvant dans le microenvironnement (indiquées au dessus des flèches) et de l'expression de certains facteurs de transcription (indiqués en blanc). D'après (93).

### III.2.1a Les lymphocytes Th1 sont les lymphocytes pro-inflammatoires.

L'IL-12 et l'IFN $\gamma$  sont les cytokines les plus impliquées dans le développement des Th1 (94). Les Th1 produisent des cytokines inflammatoires telles que l'IL-2, le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  et vont pouvoir activer les réponses immunitaires mettant en jeu les LcT cytotoxiques. De plus, les Th1 interviennent dans l'activation et le recrutement des macrophages au site de l'inflammation *via* l'action de l'IFN $\gamma$  (95). Ces cellules peuvent être responsables du développement de certaines pathologies auto-immunes telles que le diabète de type 1 et la sclérose en plaques (**Fig. 10**).

### III.2.1b Les lymphocytes Th2 sont des cellules activées en réponse aux allergènes ou suite à une infection parasitaire.

L'IL-4 et IL-2 sont les cytokines qui régulent le développement de ces cellules. Les Th2 produisent plusieurs interleukines comme l'IL-4, -5, -9, -10 et -13. Ces cellules jouent un rôle dans la régulation de la réponse humorale où ils

favorisent l'activation des LcB afin de produire des anticorps, et ciblent également d'autres cellules immunes comme les mastocytes et les éosinophiles (96) (**Fig. 10**).

**III.2.1c Les lymphocytes Th17** sont une population de LcT nouvellement décrite comme étant une population pro-inflammatoire. Elle est caractérisée par l'expression du facteur ROR $\gamma$ t et l'expression et la sécrétion de l'IL-17 (**Fig. 10**). Les Th17 jouent des rôles importants dans différentes pathologies comme les maladies auto-immunes (sclérose en plaques, arthrite, et psoriasis), le cancer (régression des tumeurs) et les maladies infectieuses d'origine virale ou bactérienne (97, 98). Finalement, des études récentes ont montré que les LcT<sub>h17</sub> chez l'Homme et chez la souris possèdent de nombreuses similitudes telles que l'expression du récepteur à l'IL-23 et à IL-12 (IL-12R  $\beta$ 2), de facteur T-bet (deux facteurs exprimés dans les LcT<sub>h1</sub>) et le facteur IFN $\gamma$  (99).

**III.2.1d Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)** sont des cellules caractérisées par l'expression du marqueur CD25 et du facteur de transcription FoxP3 (*forkhead box P3*) qui joue un rôle important dans la fonction des Tregs (**Fig. 10**). Ces cellules sont essentielles pour le maintien de la tolérance immune et de l'homéostasie en atténuant les réponses immunes excessives qui peuvent être délétères pour l'organisme. Des mutations au niveau du gène FoxP3 chez l'homme ont été identifiées chez des patients atteints d'un IPEX (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*) se traduisant par un dérèglement du développement des Tregs ou de leurs fonctions, conduisant à des maladies auto-immunes sévères et au développement de maladies inflammatoires de l'intestin (100).

Plusieurs sous-populations de Tregs ont été décrites : les *natural* Tregs (nTreg) qui se développent à partir des précurseurs thymiques, les Tregs induits par les CPAs (iTreg) et les Tregs conventionnels (Tconv). Elles possèdent toutes une fonction immuno-suppressive (inhibition de l'activation des LcT ou des CPAs (101)) mais leur développement est induit par des mécanismes moléculaires différents (102).

### **III.2.2 Les lymphocytes CD8<sup>+</sup>**

Les LcT CD8<sup>+</sup> jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Ils coopèrent avec les LcT CD4<sup>+</sup>. Les antigènes à la surface des CPAs sur les complexes CMH I et II sont détectés par les LcT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> respectivement. Les CD4<sup>+</sup> et les CPAs vont co-

stimuler les LcT CD8<sup>+</sup>. Par la suite, les LcT naïfs se différencient en cellules cytotoxiques capables de libérer la perforine, les granzymes et certaines cytokines.

Les LcT CD8<sup>+</sup> sont des cellules capables de contrôler les infections virales, bactériennes et parasitaires et ceci en éliminant les cellules infectées et en produisant des cytokines inflammatoires. Ils jouent un rôle important dans la restauration de l'homéostasie de l'organisme. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont capables de lyser les cellules infectées présentant l'antigène reconnu comme un signal de danger. Une interaction physique entre le TCR du lymphocyte et le complexe antigène/CMH de la cellule cible est nécessaire afin de pouvoir la détruire. Les CD8<sup>+</sup> lysent les cellules cibles selon le procédé perforine / granzymes mais également peuvent éliminer les cellules cibles selon un deuxième mécanisme qui met en jeu la protéine FasL. Cette dernière induit l'apoptose par une interaction Fas-FasL entre le lymphocyte et la cellule infectée et par la sécrétion des cytokines inflammatoires (*e.g.* TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ ) (103).

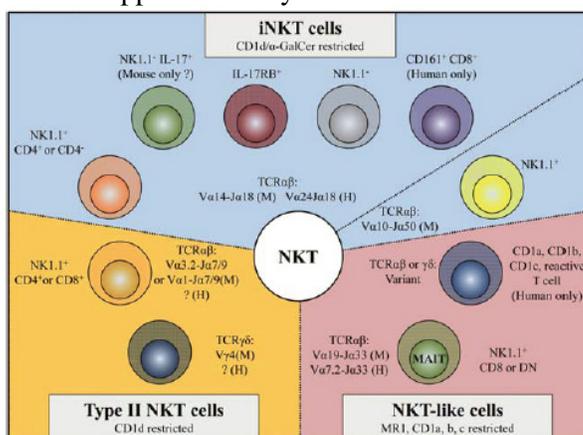
### III.3 Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  représentent 3 à 5% des cellules lymphoïdes dans le sang et les tissus lymphoïdes secondaires. Ils sont souvent localisés au niveau des muqueuses, de la barrière épithéliale et de l'intestin où ils représentent 50% des lymphocytes totaux intraépithéliaux (104). Ils expriment à leur surface le récepteur TCR composé des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ . Les LcT  $\gamma\delta$  sont des cellules cytotoxiques et/ou régulatrices. Ils sont capables d'éliminer les cellules infectées par un pathogène ou d'intervenir dans la réponse antitumorale. Ce sont des cellules effectrices essentiellement cytotoxiques qui lysent leur cible notamment grâce au procédé perforine/granzymes. Ces cellules peuvent également sécréter de nombreuses cytokines, le plus souvent de type Th1 et elles sont capables de reconnaître l'antigène sans avoir recours aux molécules de CMH chez l'Homme. De plus, elles ont la capacité de détecter des antigènes solubles non peptidiques appelées les phosphoantigènes (105).

### III.4 Les cellules NKT

Les cellules *T Natural Killer* (NKT) représentent une sous-population de cellules T qui partage certaines caractéristiques des cellules *Natural Killer* (NK) innées. Elle représente

moins de 1% des cellules sanguines chez l'Homme (caractérisée par le marqueur CD56) et la souris (caractérisée par le marqueur NK1.1) (106, 107) tandis que ce pourcentage est plus important dans d'autres tissus (20 à 30% dans le foie et 10 à 20% des thymocytes chez la souris) (108). Généralement, les NKT sont sous-divisés en 3 sous-populations : 1- NKT de type I, 2- NKT de type II et 3- NKT invariantes ou iNKT (**Fig. 11**). Les NKT modulent la réponse immune en produisant un large panel de cytokines telles que le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  et l'IL4. Ils influencent le développement du système immunitaire inné et adaptatif (109).



**Figure 11. Les sous-populations des NKT.** Les populations des NKT peuvent être divisées en 3 sous-populations : invariant NK (iNK) T (panel bleu), NK de type II (panel jaune) et les NK de type I (panel rose).

### III.5 Les éosinophiles

Les éosinophiles sont des leucocytes multifonctionnels qui peuvent agir comme des CPAs. Les éosinophiles matures sont principalement localisés dans les tissus à l'état physiologique, notamment à l'interface avec l'environnement tels que le tractus gastro-intestinal, uro-génital ou pulmonaire mais aussi au sein des organes lymphatiques et hématopoïétiques, y compris le thymus. Ils expriment à leur surface des molécules d'adhérence importantes pour leur migration du sang vers les tissus. Ces molécules peuvent être regroupées en deux familles principales: les sélectines et les intégrines. Les éosinophiles sont impliqués dans le développement des pathologies comme l'allergie, l'infection parasitaire, le syndrome de Churg-Strauss ou même des désordres métaboliques. En réponse à différents stimuli, les éosinophiles sont recrutés au site de l'inflammation et sont capables de sécréter des cytokines et des chimiokines de type 1 afin de moduler le système immunitaire inné et adaptatif. En effet, ils régulent la prolifération et la polarisation des lymphocytes T (balance Th1/Th2) (110, 111), et l'activation et la fonction des mastocytes (112).

### III.6 Les mastocytes

Les mastocytes dérivent des précurseurs de la moelle osseuse, circulent dans le sang et se différencient dans les tissus. Ils sont caractérisés par l'expression de deux molécules à leur surface, le récepteur FcεRI et le récepteur KIT ou SCFR (*stem cell factor*). Ces cellules sont cruciales dans les premières phases en réponse à une infection pour communiquer avec différents types cellulaires (*e.g.* cellules immunes, cellules endothéliales et épithéliales, cellules du muscle lisse). Les mastocytes, en réponse à une infection, vont sécréter, de l'histamine, des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNFα, l'IL-6 et le PGD2 (*prostaglandin 2*)) qui seront impliqués dans le recrutement des cellules immunes innées (les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules dendritiques et les *natural killer*) (113-115) et également dans l'activation des LcT CD8<sup>+</sup> (116).

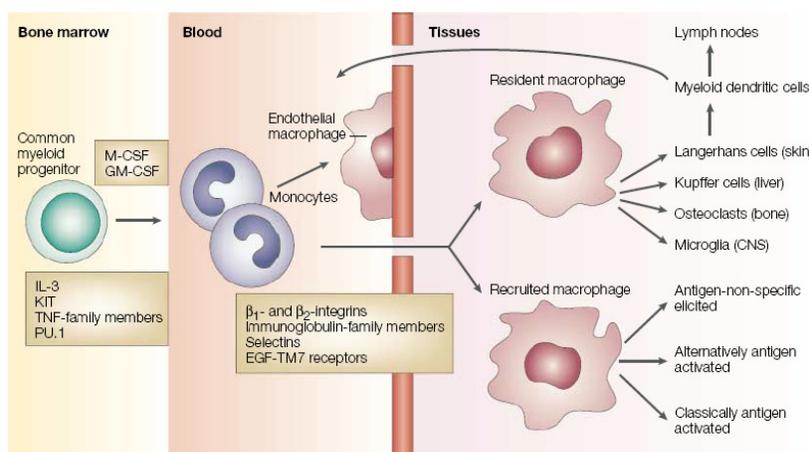
### III.7 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules d'origine hématopoïétique possédant une grande plasticité cellulaire. Ils se retrouvent dans de nombreux tissus afin d'exercer leurs différentes fonctions (**Fig. 12**). Ces cellules sont impliquées dans la régulation du développement des tissus et de leur l'homéostasie et elles jouent des rôles essentiels dans l'immunité.

Normal physiology		Pathology
Microglia, (neuronal patterning, fluid balance)		Neurodegeneration
Osteoclasts and macrophages (bone remodelling; haematopoiesis)		Osteoporosis and osteopetrosis Leukemia
Heart and vasculature		Atherosclerosis
Kupffer cells (lipid metabolism, toxin removal)		Fibrosis
Branching morphogenesis		Cancer and metastasis
Metabolism; adipogenesis		Obesity and diabetes
Immunity		Arthritis, EAE, IBD

**Figure 12. Les rôles des macrophages dans le développement, l'homéostasie et les pathologies.** Les macrophages jouent un rôle important dans le développement de certains tissus comme le cerveau, l'os ou les glandes mammaires. Après le développement de l'organisme, les macrophages modulent l'homéostasie et la physiologie des tissus. Cependant, ces rôles régulateurs des macrophages peuvent être modifiés suite à des agressions continues, ce qui contribue à la participation des macrophages dans le développement de certaines pathologies souvent liées à l'âge. EAE: *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*; IBD: *Inflammatory Bowel Disease*

Plusieurs sous-populations de macrophages ont été décrites et se distinguent par la spécificité de leurs fonctions (**Fig. 13**, (117)). Généralement, ces populations possèdent des rôles opposés qui dépendent de leur état de polarisation : macrophage de type pro-inflammatoire (M1) et macrophage de type anti-inflammatoire (M2). Ces deux sous-populations majeures possèdent des différences au niveau de l'expression des marqueurs de surface et de leurs fonctions.



**Figure 13. La différenciation des macrophages.** La différenciation des progéniteurs cellulaires en macrophage ou cellule dendritique dépend des cytokines telles que le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) et *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF). Une fois dans le sang, la migration des cellules sanguines à travers l'endothélium est régulée par des molécules d'adhésion appelées les intégrines ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ ) et des protéines de la famille des immunoglobulines (CD31). De plus, cette migration est régulée par des sélectines et des récepteurs de type facteur de croissance épidermique à 7 domaines transmembranaires (EGF-TM7) (117).

L'expression des marqueurs à la surface des macrophages est très variable et dépend de l'environnement cellulaire. Dans le tissu adipeux blanc des rongeurs, les macrophages co-expriment les deux marqueurs CD11b et F4/80, chez l'Homme les macrophages n'expriment pas le marqueur F4/80 et ils sont caractérisés par le marqueur de surface CD14. Dans le but de distinguer les deux sous-populations M1 et M2, des marqueurs spécifiques de chaque sous-population sont utilisés. Chez les rongeurs, les M1 se caractérisent par l'expression de marqueurs tels que  $CD11b^+ F4/80^+$ ,  $CD11c^+$  et ils expriment fortement les gènes *Nos2* et *Tnfa* chez les rongeurs tandis que chez l'Homme les M1 se caractérisent par l'expression des marqueurs. Les M2 se caractérisent par l'expression des marqueurs  $CD11b^+$ ,  $F4/80^+$ ,  $CD206^+$  (le récepteur au mannose) et ils expriment spécifiquement les gènes *Arg1* et *Chi3l3*. Cependant, la caractérisation des macrophages M1 et M2 chez l'Homme est basée sur l'utilisation des marqueurs différents. Dans le cas des M1, les macrophages stimulés par l' $IFN\gamma$

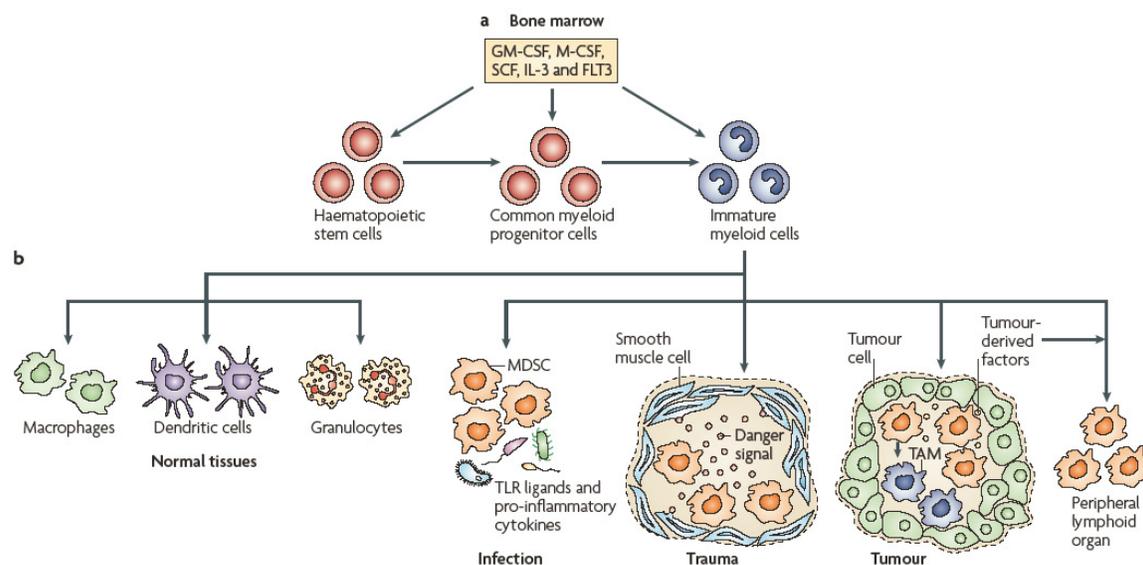
et le LPS vont exprimer le marqueur CD206 et CD16 et sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-12. Leur rôle principal est de détruire les pathogènes et les cellules tumorales. Les macrophages M2 quant à eux, sont des cellules impliquées dans la réparation des tissus et l'atténuation de l'inflammation en réponse à des stimuli comme l'IL-4 et l'IL-13. Les macrophages M2 vont produire essentiellement des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et chez l'Homme, ils sont caractérisés par l'expression du marqueur CD206 et sont capables de produire les cytokines inflammatoires comme l'IL-10, le TGF $\beta$  et le CCL-18. Ils sont impliqués dans l'immuno-régulation, le remodelage de la matrice extracellulaire et l'homéostasie des tissus métaboliques (notamment la maintenance de la sensibilité à l'insuline) (118). Plus récemment, un rôle pro-angiogénique des macrophages chez l'Homme, caractérisés par l'expression des marqueurs CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>, a été décrit. Ces propriétés angiogéniques sont dues essentiellement à l'expression au sein de ces macrophages le gène codant MMP-9 qui est un facteur pro-angiogénique impliqué dans le remodelage du tissu adipeux blanc (119). Cependant, ces deux profils de macrophages représentent les extrêmes d'un continuum qui est dû aux différents stimuli co-existant dans un microenvironnement donné et activant les différentes voies de différenciation et de polarisation des macrophages (120).

### III.8 Les cellules myéloïde immuno-suppressives ou MDSCs

Les MDSCs sont une population hétérogène de cellules myéloïdes dont le nombre augmente dans des conditions pathologiques comme le cancer, l'inflammation ou l'infection et qui ont la capacité de supprimer la réponse T. Ils ont été décrits depuis 20 ans chez des patients atteints de cancer mais l'importance de leurs fonctions dans le système immunitaire n'a été découverte que récemment. Des nombreuses études ont montré que ces cellules possèdent une activité immuno-suppressive sur le système immunitaire inné et adaptatif. Chez un sujet sain, ces cellules, composées de progéniteurs myéloïdes ou immatures (*IMC : immature myeloid cells*), se forment dans la moelle osseuse et se différencient rapidement en granulocytes, cellules dendritiques ou macrophages tandis que chez un patient souffrant d'une pathologie comme le cancer, ces cellules subissent une expansion cellulaire tout en restant bloquées au stade immature (**Fig. 14 et 15**, (121)).

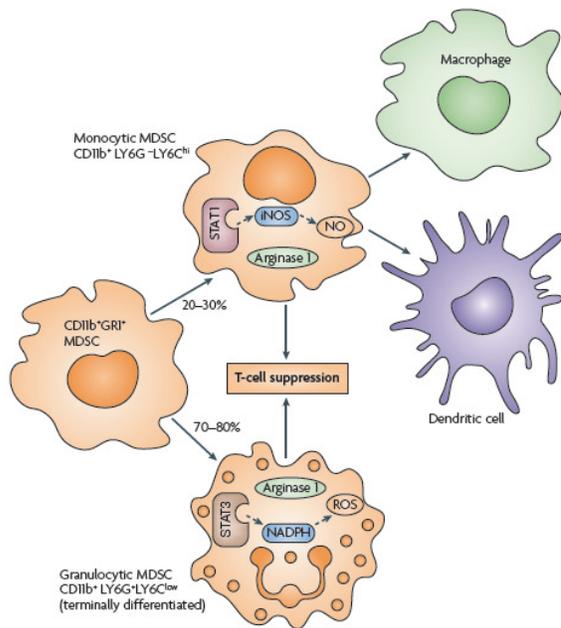
Chez la souris, les MDSCs sont caractérisées par la co-expression des deux marqueurs de surface Gr-1 et CD11b (122) tandis que chez l'humain ces cellules sont connues pour

exprimer les marqueurs CD11b, CD33 et HLA-DR (123, 124). Récemment, l'hétérogénéité morphologique des MDSCs a été mieux définie en se basant sur le niveau d'expression du marqueur Gr-1. L'utilisation de cet anticorps Gr-1 qui reconnaît deux épitopes différents (Ly6C et Ly6G) a permis de mettre en évidence deux sous-populations majeures de MDSCs. Les MDSCs au profil granulocytique (G-MDSC) possèdent les marqueurs de surface CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup> et les MDSCs au profil monocytique (M-MDSC) sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup> (125, 126). Malgré la différence morphologique entre les deux sous-populations, celles-ci possèdent le même rôle qui est de supprimer la réponse T, mais leurs fonctions immuno-suppressives passent par des mécanismes d'action différents faisant intervenir des facteurs comme l'arginase 1 et iNOS (*inducible nitric oxide synthase*).



**Figure 14. L'origine des MDSCs.** a. Les cellules myéloïdes immatures (IMCs) se développent dans la moelle osseuse sous le contrôle de cytokines inflammatoires spécifiques comme le GM-CSF, M-CSF, IL-3 et FLT3. b. Dans des conditions physiologiques, les IMCs migrent dans les tissus périphériques et se différencient en cellules dendritiques, macrophages et granulocytes. Cependant, dans des conditions pathologiques, certains facteurs sont sécrétés et vont contribuer à l'accumulation des IMCs dans les sites de l'inflammation tout en empêchant leur différenciation sans bloquer leur activation. Ces cellules possèdent des propriétés immuno-suppressives et sont appelées les MDSCs (121).

Le nombre des MDSCs augmente dans différentes conditions pathologiques comme le cancer, les infections bactériennes ou parasitaires, ainsi que la transplantation de greffe et certaines pathologies auto-immunes (**Fig. 15**).



**Figure 15. Les deux sous-populations majeures des MDSCs.** Les MDSCs co-expriment les marqueurs communs CD11b et Gr-1. L'anticorps reconnaissant la protéine Gr-1 se fixe sur deux épitopes différents permettant ainsi de distinguer deux sous-populations majeures de MDSCs : les MDSCs monocytiques (M-MDSC) CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup> et les MDSCs granulocytiques (G-MDSC) CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Les deux sous-populations possèdent des fonctions immuno-suppressives qui mettent en jeu des mécanismes moléculaires différents. Il est montré aujourd'hui que les G-MDSC sont des cellules qui ont déjà atteint leur phase terminale de différenciation tandis que les M-MDSCs sont des cellules qui sont capables de se différencier, sous l'influence de certaines cytokines spécifiques, en cellules dendritiques ou macrophages (121).

L'expansion des MDSCs est influencée par plusieurs facteurs tels que la cyclooxygénase 2, les prostaglandines (PTGS2), le M-CSF, l'IL-6, le GM-CSF et le VEGF (127-131). Ces facteurs régulent la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose de ces cellules (132). De plus, il a été montré que le facteur de transcription STAT3 joue un rôle important dans l'expansion des MDSCs en induisant l'expression des facteurs *S100 calcium-binding protein A8* (S100A8) et S100A9 et les récepteurs exprimés à la surface des cellules (133).

Les mécanismes d'activation des MDSCs mettent en jeu des facteurs différents de ceux nécessaires pour leur expansion. Ces facteurs sont exprimés d'une façon prédominante par les LcT, les cellules tumorales (134) et incluent les cytokines comme l'IFN $\gamma$  (135), l'IL-4 (136), l'IL-13 (137) et les TLRs (134) qui activent des voies de signalisation différentes impliquant les facteurs de transcription STAT6, STAT1 et NF- $\kappa$ B (134, 138, 139). Concernant les mécanismes d'activité suppressive des MDSCs, plusieurs études ont montré l'importance d'un contact cellulaire direct entre les MDSCs et la cellule cible afin d'exercer son rôle régulateur. Ces observations ont suggéré que les MDSCs agissent sur leurs cibles *via* des récepteurs exprimés à la surface et/ou *via* la libération de médiateurs solubles à courte durée de vie.

### III.8.1 Les mécanismes d'immunosuppression des MDSCs

Plusieurs mécanismes d'immunosuppression ont été décrits (**Fig. 15**) qui mettent en jeu des facteurs différents et spécifiques de chaque sous-population de MDSCs.

**III.8.1a Arginase 1 et iNOS :** Les MDSCs expriment des niveaux élevés d'arginase 1 et d'iNOS chez l'Homme et la souris et les études montrant les effets inhibiteurs sur la fonction des LcT sont bien établies (140-142). Récemment, une corrélation entre la disponibilité de la L-arginine et la prolifération des LcT a été montrée. Une augmentation de l'activité de l'arginase 1 dans les MDSCs conduit à une augmentation du catabolisme de la L-arginine, ce qui provoque la déplétion des acides aminés dans le microenvironnement. Une carence en L-arginine inhibe la prolifération des LcT par différents mécanismes comme la diminution de l'expression de la chaîne CD3 $\zeta$  et de l'expression de certains régulateurs du cycle cellulaire comme la cycline D3 et la kinase cycline dépendante 4 (CDK4) (143). D'autre part, le NO (*nitric oxide*) inhibe la prolifération des LcT en impliquant les voies JAK3 et STAT5 dans les LcT chez la souris (144), en inhibant l'expression génique du CMH de classe II (145) et en induisant l'apoptose chez l'Homme (146).

**III.8.1b Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) :** Les ROS sont des molécules employées par les MDSCs dans le but d'inhiber les fonctions effectrices des LcT. Ceci a été démontré dans des études indiquant qu'une inhibition de la production des ROS par les MDSCs bloque leur activité suppressive *in vitro* (122, 147). Enfin, cette activité immuno-suppressive des MDSCs est induite par des cytokines comme l'IL-6, l'IL-3, l'IL-10 et TGF $\beta$  (148).

**III.8.1c Le peroxy-nitrite :** Récemment, il a été montré que le peroxy-nitrite est un des médiateurs produit par les MDSCs humains et murins pour inhiber la fonction des LcT. Le peroxy-nitrite est synthétisé suite à une interaction entre le NO et l'anion superoxyde. Une augmentation des peroxy-nitrites a été observée dans les sites d'accumulation des MDSCs. Cette augmentation a été corrélée avec la progression des tumeurs dans plusieurs types de cancers et liée à une inhibition des LcT chez l'Homme (149, 150). De plus, des données montrent qu'une production des peroxy-nitrites par les MDSCs durant un contact direct avec les LcT conduit à une altération de leur activation après une stimulation avec un antigène spécifique (151).

Ces mécanismes d'immunosuppression sont spécifiques de chaque sous-population. A l'heure actuelle, deux sous-populations majeures de MDSCs sont connues (granulocytaire et monocytique). Les MDSCs-granulocytaires expriment fortement les ROS mais faiblement le NO et inversement la sous-population monocytique exprime plus de NO que des ROS, en revanche les deux expriment l'arginase 1 (125). Enfin, il a été montré que les MDSCs sont capables d'induire l'expression du facteur FoxP3 qui est nécessaire pour le développement des Tregs *in vivo* (152).

## **IV. Altérations immunes associées à l'obésité**

L'obésité est associée à un dysfonctionnement du système immunitaire. En effet, les sujets obèses sont plus susceptibles aux infections bactériennes ou virales et sont plus à risque de développer certains types de cancer. Une étude réalisée chez la souris a montré qu'un régime hyperlipidique et le développement de l'obésité accélère l'involution thymique conduisant ainsi à une restriction du répertoire lymphocytaire T (153). Chez l'humain, des études épidémiologiques ont montré que les sujets obèses sont plus susceptibles de contracter le virus de la grippe et de développer des pneumonies d'origine virale (154, 155). Finalement, une étude récente a montré chez les sujets adultes en surpoids et obèses un dysfonctionnement de la réponse immunitaire contre le virus de la grippe H1N1. En effet, les LcT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de ces patients, exposés au virus H1N1 avaient une expression plus faible des marqueurs d'activation et des cytokines inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  comparés aux cellules des sujets non infectés (156).

L'obésité est également associée à un dérèglement de la réponse inflammatoire. En effet, elle se caractérise par le développement d'une inflammation chronique dite « à bas bruit ». Durant le développement de l'obésité, le tissu adipeux blanc subit en continu des modifications morphologiques majeures en réponse à des stimuli et/ou à des altérations de la balance énergétique. Dans le cas d'un apport énergétique (apport calorique) excessif, le tissu adipeux blanc subit un réarrangement mettant en jeu un renouvellement de la matrice extracellulaire et des adipocytes afin d'assurer son expansion et le stockage de l'énergie. Ce réarrangement est accompagné d'une modification de la composition cellulaire du tissu, notamment des cellules immunes, modifiant l'homéostasie énergétique et le statut inflammatoire du tissu adipeux ainsi l'état métabolique général de l'organisme (résistance à l'insuline).

### **IV.1 L'inflammation chronique à bas bruit et la résistance à l'insuline**

Les mécanismes moléculaires provoquant l'installation de l'insulino-résistance (IR) sont très complexes. Il est possible que plusieurs stimuli interviennent dans le développement de l'IR. L'inflammation chronique à bas bruit provoquée par l'accumulation de cellules immunes sécrétant des facteurs inflammatoires au sein du tissu adipeux blanc fait partie des stimuli provoquant l'IR. En effet, des études ont montré qu'une suppression de la voie de l'IL-1 résulte d'une altération de la fonction des macrophages accompagnée d'une réduction de la

sécrétion de l'IL-6 et TNF $\alpha$  et une amélioration de la sensibilité à l'insuline (157). De plus, cette étude a montré un effet synergique de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  sur la sécrétion de l'IL-6 par les adipocytes et ceci en activant d'une façon importante la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. En outre, ces facteurs contribuent à l'installation de la résistance à l'insuline en interférant avec la voie de signalisation de l'insuline. Les facteurs inflammatoires activent les voies de signalisation JNK et NF- $\kappa$ B connues pour inhiber la voie de signalisation de l'insuline *via* l'augmentation de la phosphorylation inhibitrice des protéines IRS1 et IRS2 (*insulin receptor substrate 1 and 2*) sur des résidus sérine, une phosphorylation qui conduit à leur dégradation (158).

Ces aspects sont détaillés dans la revue qui s'intitule : « **Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines and chemokines** » acceptée dans le journal « **ISRN Inflammation** », par MAKKI K *et al.* (*cf.* Annexe). En plus des facteurs inflammatoires classiques, d'autres molécules et complexes protéiques comme les leucotriènes et l'inflammasome ont été montrés récemment associés à l'obésité et impliqués dans le développement de l'inflammation chronique à bas bruit et de la résistance à l'insuline.

#### IV.1.1 Les leucotriènes

Les leucotriènes sont des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire, la production des cytokines, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (159). Ces molécules sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique et leur voie de synthèse met en jeu deux enzymes clés, la protéine 5-LO (*5-lipoxygenase*) et la protéine FLAP (*5-lipoxygenase activating protein*). Ces protéines vont conduire à la synthèse du leucotroïène LTB<sub>4</sub>. Ce dernier est un chemoattractant et un activateur des leucocytes important. En effet, le LTB<sub>4</sub> contribue à la génération des macrophages M1 et au recrutement des LcT (160, 161). De plus, le LTB<sub>4</sub> inhibe la différenciation des Tregs et stimule celle des LcTh<sub>17</sub> (162, 163).

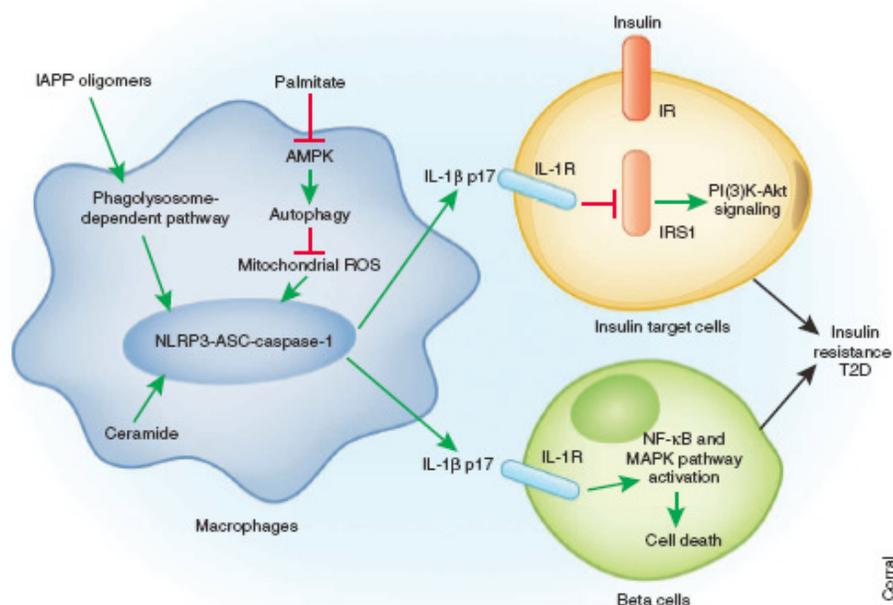
Différentes études ont montré un lien entre la voie des leucotriènes et le développement de l'inflammation du tissu adipeux blanc dans l'obésité (164). Les niveaux d'expression des deux protéines 5-LO et FLAP sont augmentées dans les adipocytes et les macrophages du tissu adipeux blanc des sujets obèses (165, 166). De plus, une étude récente a montré que le niveau de LTB<sub>4</sub> est augmenté dans le tissu adipeux des souris obèses comparés au celui des

souris minces. L'augmentation du niveau d'expression de ces protéines est délétère pour l'organisme puisqu'elles favorisent le développement de la résistance à l'insuline. En effet, les souris traitées par un inhibiteur de la protéine FLAP ou invalidées pour le gène codant le récepteur *Blt1* (*leukotriene B4 receptor*) présentaient une diminution de l'infiltration des macrophages au sein du tissu adipeux blanc et une amélioration de la sensibilité à l'insuline malgré la mise sous régime hyperlipidique (167, 168). De plus, les souris invalidées pour le gène codant la *5-Lo* présentaient une moindre infiltration des macrophages et une meilleure sensibilité à l'insuline pouvant être expliquée par une diminution de la sécrétion des chemoattractants comme MCP-1 par les adipocytes. Enfin, la diminution des macrophages dans le tissu adipeux blanc a été accompagnée par une diminution des macrophages M1 au détriment des M2, ce qui suggère un rôle de la 5-LO dans la balance M1/M2 (169).

#### IV.1.2 L'inflammasome

L'inflammasome est un complexe protéique constitué d'un senseur intracellulaire (typiquement : NLR (*nod-like receptor*)), le précurseur pro-caspase 1 et l'adaptateur ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* ou *PYCARD*). Ce complexe conduit à une activation autocatalytique de la protéase cystéine caspase-1 et au clivage des protéines inactives pro-IL-1 $\beta$  et IL-18 (170). C'est un composant crucial de notre système immunitaire inné pour détecter les signaux reconnus comme un danger. Différents inflammasomes ont été identifiés comme NLRP1/3/6 (*NLR family pyrin domain-containing*), AIM2 (*absent in melanoma 2*) et IPAF (*IL-1 $\beta$ -converting enzyme protease-activating factor*), chacun est capable de répondre à divers produits microbiens ou des signaux de danger (171). Des études récentes ont montré un rôle des inflammasomes dans le développement de la résistance à l'insuline *via* la synthèse et la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  dans différents tissus et par différents types cellulaires durant le développement de l'obésité. Plus particulièrement, plusieurs études ont montré une implication évidente du NLRP3 dans le développement de cette complication métabolique liée à l'obésité (172-175). En effet, les souris invalidées pour les gènes codant les protéines *Nlrp3*, *Casp1* et *Asc* et recevant un régime hyperlipidique, présentaient une amélioration de l'intolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline. Ces résultats montrent un lien clair entre l'inflammasome et le développement de l'insulino-résistance. Le NLRP3 est activé par les acides gras à longue chaîne comme les céramides et les palmitates, ce qui conduit à la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et à la

perturbation de l'homéostasie métabolique des tissus sensibles à l'insuline comme le muscle, le foie et le tissu adipeux blanc dans le cas de l'obésité (174, 176). De plus, l'inflammasome est impliqué dans le dysfonctionnement de la cellule  $\beta$  pancréatique (177). En effet, des dépôts de structures amyloïdes provoquées par l'amyline (*IAPP ou islet amyloid polypeptide*) sont observés chez les sujets obèses et vont provoquer l'activation du NLRP3 (178). Un autre mécanisme potentiel contribuant à l'activation de l'inflammasome durant l'obésité est la dérégulation de l'autophagie. Une délétion des gènes *Atg15l* et *Atg7* dans les macrophages des souris contribuent à l'activation de la caspase 1, à la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et donc au développement de l'inflammation qui est responsable de l'insulino-résistance (179). Enfin, une étude suggère que l'activation de NLRP3 peut provoquer une accumulation des lymphocytes durant l'obésité qui passerait par la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  connue pour favoriser la différenciation des LcTh<sub>17</sub> (lymphocytes pro-inflammatoires) (**Fig. 16**, (180)).



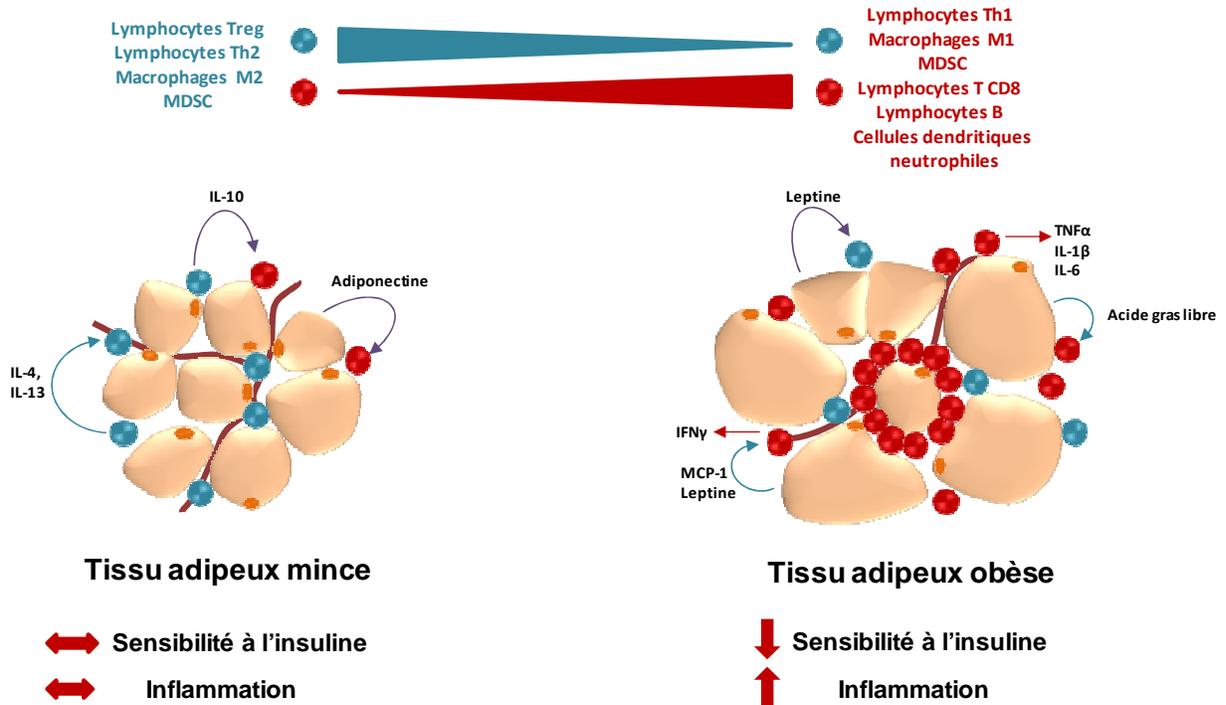
**Figure 16. Un modèle du développement du diabète de type 2 (T2D) impliquant le tissu adipeux, le pancréas et le NLRP3.** Au sein du tissu adipeux, des concentrations élevées d'acides gras libres comme le palmitate vont stimuler l'activité de la protéine AMPK et vont conduire à une dérégulation de l'autophagie au niveau de la mitochondrie. Le dysfonctionnement mitochondrial provoque la génération des ROS et la libération de l'ADN mitochondrial dans le cytosol. Ces facteurs vont activer le NLRP3 qui à son tour provoque la sécrétion de la forme active de l'IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  va activer les voies de signalisation JNK et NF- $\kappa$ B interférant ainsi avec la voie de signalisation de l'insuline. Au niveau du pancréas, l'accumulation des structures d'améloïdes active également le NLRP3 et la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  à partir des macrophages, ce qui conduit au dysfonctionnement de la cellule bêta et à l'apoptose de ces dernières. MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (180).

## IV.2 Obésité et l'inflammation chronique à bas bruit

L'obésité est associée au développement d'une inflammation systémique et chronique à bas bruit qui est délétère pour l'organisme (181-183). Les études chez les rongeurs ont permis d'établir une meilleure compréhension des mécanismes provoquant le développement de cet état inflammatoire semble être initié par l'accumulation des cellules immunes, notamment les macrophages, au niveau du tissu adipeux blanc (184). De plus l'inflammation peut être provoquée par d'autres dérégulations d'événement moléculaire au sein des adipocytes. En effet, l'hypertrophie des adipocytes contribue au changement de leur profil d'expression génique et de sécrétion ainsi qu'à une activation des voies de signalisation inflammatoires. Elle est associée à une augmentation de l'expression et de sécrétion des adipokines inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, le chemoattractant MCP-1, le TNF $\alpha$  et la leptine également connue pour avoir des propriétés inflammatoires en impactant le système immunitaire inné et adaptatif (185, 186). En parallèle, une diminution de l'expression de certaines adipokines anti-inflammatoires est observée comme l'adiponectine, une adipokine rendant les adipocytes plus sensibles à l'insuline (187). Ces changements sont attribués aux facteurs de stress comme l'hypoxie (188, 189), le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique (190, 191). De plus, ces changements induisent des voies de signalisation canoniques comme les voies NF- $\kappa$ B et JNK connues pour interférer avec la voie de l'insuline (192, 193). Les voies NF- $\kappa$ B et JNK contribuent à l'augmentation de la sécrétion des cytokines inflammatoires et donc à l'accumulation des cellules immunes inflammatoires au sein du tissu adipeux blanc. De ce fait, un microenvironnement inflammatoire se développe au sein de ce tissu défini par une inflammation locale dite à bas grade qui s'étend au niveau systémique provoquant ainsi l'installation progressive d'une résistance à l'insuline dans l'organisme.

L'inflammation initiée au sein du tissu adipeux semble également être provoquée par le recrutement de cellules immunes. Le rôle de ces cellules est devenu un champ de recherche très intéressant dans le domaine de l'obésité et de la régulation de l'homéostasie métabolique.

Le tissu adipeux d'une souris mince est composé de cellules immunes anti-inflammatoires comme les LcT régulateurs, les macrophages M2 et les cellules immuno-suppressives d'origine myéloïdes (MDSCs). Ces cellules, en interagissant avec les adipocytes, vont maintenir le tissu dans un état métabolique sensible à l'insuline (**Fig. 17**).



**Figure 17. La composition cellulaire immunitaire du tissu adipeux chez le sujet mince et obèse.** Durant l'expansion du tissu adipeux blanc, la composition cellulaire du tissu adipeux est modifiée. Des cellules inflammatoires sont recrutées comme les macrophages M1, les LcTh1, Les LcT CD8, les MDSC, les LcB et les neutrophiles, favorisant ainsi le développement de l'inflammation à bas bruit et l'installation de la résistance à l'insuline.

Chez une souris obèse, le tissu adipeux subit un réarrangement majeur touchant le nombre et la taille des adipocytes ainsi que sa vascularisation et, surtout, une modification de la composition en cellules immunes. Il se caractérise par un microenvironnement inflammatoire. Les cellules immunes anti-inflammatoires quittent le tissu adipeux et les cellules inflammatoires sont recrutées, selon des mécanismes qui restent encore à l'heure actuelle non complètement élucidés.

Ces cellules inflammatoires (*e.g.* les neutrophils, les macrophages M1, les LcT CD4<sup>+</sup> et les LcT CD8<sup>+</sup>) sont recrutées d'une manière séquentielle et vont sécréter des facteurs inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  contribuant à l'installation de l'inflammation et au développement de la résistance à l'insuline du tissu adipeux blanc puis des autres tissus métaboliques comme le foie et le muscle (**Fig. 17**).

## IV.3 Le recrutement des cellules immunes dans le tissu adipeux blanc et l'insulino-résistance

### IV.3.1 L'accumulation des macrophages

Dans des conditions physiologiques, les macrophages résidents dans les tissus possèdent un rôle important dans le maintien de leur homéostasie. Dans le tissu adipeux blanc viscéral (TAV), les macrophages résidents représentent 10 à 15% de la population cellulaire. Leur nombre, localisation et phénotype sont altérés durant l'obésité. En effet, le pourcentage de ces cellules augmente considérablement (40 à 50%) dans le TAV des souris obèses (184). Nous distinguons deux sous-populations majeures de macrophages : Les macrophages pro-inflammatoires (M1) et les anti-inflammatoires (M2). Chez les souris minces, les macrophages du TAV sont de type M2 maintenus par la production d'IL-4 par les éosinophiles et d'IL-13 par les iNKT (194). Le phénotype de ces cellules change avec l'obésité vers un profil M1 inflammatoire et il est maintenu par l'IFN $\gamma$  et les ligands des TLR qui sont produits par les Th1, les LcT CD8<sup>+</sup>, les NK et les adipocytes en nécrose (195). Il faut noter que le phénotype M1 vs. M2 chez l'Homme n'est pas aussi claire que chez les rongeurs. Dans le tissu adipeux humain, nous retrouvons une population mixte intermédiaire entre les deux états de polarisation (119, 196). Les macrophages entourent les adipocytes nécrosés en formant des structures en couronne ou « *crown-like structures* » (CLSs) (197). Plusieurs voies peuvent expliquer le phénomène de l'accumulation des macrophages dans le TAV. Ils migrent dans le tissu adipeux des souris obèses suite à une production d'adipokines comme MCP-1 (198), la fetuine A (199), les leucotriènes (LTB4/BLT1) et les acides gras libérés par les adipocytes (200). En effet, les macrophages du tissu adipeux blanc peuvent dérivés des monocytes sanguins. Ces derniers, caractérisés par l'expression du marqueur Gr-1<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> chez la souris et par les marqueurs CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> chez l'Homme, sont recrutés au sein du TAV par les chémoattractants ou par des facteurs solubles sécrétés par les adipocytes qui augmentent eux-mêmes le phénomène de la diapédèse monocyttaire et stimulent la production des molécules d'adhésion dont PE-CAM (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) et ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*) exprimées sur les cellules endothéliales (201). Récemment, une prolifération *in situ* de ces cellules a été démontrée et qui est associée au développement de l'inflammation de bas grade au sein du tissu adipeux blanc des souris et des patients obèses. Cette prolifération *in situ* des macrophages est dépendente de la cytokine chémoattractante MCP-1 (202, 203). Enfin, l'augmentation des M1 est associée à un

développement de l'IR. En effet, l'inactivation du gène codant le récepteur CCR2 dans les macrophages protège les souris du développement de l'inflammation et de l'IR (204). Enfin, de nombreuses études ont montré le rôle important des gènes codant des facteurs inflammatoires exprimés par les macrophages et leur répercussion sur le développement de l'obésité et l'IR. Par exemple, les souris invalidées pour les gènes codant les protéines IKK2 ou JNK1 sont protégées contre le développement de l'IR tandis que les souris invalidées pour les gènes SOCS1 ou PPAR $\gamma$  développent les phénotypes opposés (205-208).

### **IV.3.2 L'accumulation des cellules dendritiques**

Le rôle de ces cellules n'est pas encore bien élucidé dans le tissu adipeux du fait d'un manque important d'études décrivant leur présence dans le TAV de souris ou d'humains obèses. Une étude récente a montré une augmentation du nombre de cellules dendritiques dans le tissu adipeux au cours du développement de l'obésité, chez les souris et l'Homme (209, 210). Les cellules dendritiques (CD) exprimant les marqueurs CD11c<sup>High</sup>, B220<sup>-</sup> ont été détectées dans le tissu adipeux des souris *db/db* (défiance pour le récepteur de la leptine) et *ob/ob* (défiance pour la leptine) et leur nombre augmente dans le tissu adipeux de souris sauvages soumises à un régime hyperlipidique. De plus, ces cellules sont capables de présenter l'antigène aux LcT CD4<sup>+</sup> naïfs, induisant ainsi leur prolifération. D'une façon intéressante, les CD de souris obèses sont capables d'induire l'expansion des Th<sub>17</sub> *in vitro*. Chez l'Homme, des résultats similaires ont été obtenus, montrant une augmentation de l'expression des gènes spécifiques des cellules dendritiques dans le tissu adipeux blanc sous-cutané des patients obèses comparés aux contrôles, leur nombre corrélant avec l'indice de masse corporelle et la résistance à l'insuline.

### **IV.3.3 L'infiltration des neutrophiles**

Le rôle des neutrophiles dans le développement de l'inflammation du tissu adipeux a été étudié récemment. Chez la souris, une infiltration très précoce des neutrophiles dans le tissu adipeux est observée après 3 jours de mise sous régime hyperlipidique. Ce recrutement est rapide et transitoire. En effet, il précède le recrutement des macrophages et est absent à des stades plus tardifs de l'obésité (211). Le nombre des neutrophiles augmente de l'ordre de 20 fois dans le tissu adipeux des souris obèses. De plus, l'utilisation des approches génétique et

pharmacologique a récemment montré le rôle de l'élastase dans le développement de l'inflammation du tissu adipeux et de l'IR (212). Concernant les études chez l'Homme, une augmentation des taux sériques des enzymes telles que la myéloperoxydase (MPO) et la calprotectine (S100A8/9) (essentiellement sécrétées par les neutrophiles) a été observée chez des patients obèses. De plus, le marqueur d'activation des neutrophiles CD66b est augmenté chez les patients obèses montrant que le nombre des neutrophiles et leur état d'activation est altéré par l'obésité chez l'Homme (213).

#### **IV.3.4 Le recrutement des mastocytes**

Le nombre de mastocytes dans le tissu adipeux blanc est plus important chez la souris mise sous un régime hyperlipidique et chez les patients obèses. Les souris déficientes en mastocytes (souris Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> et Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup>), ont un gain de poids moindre sous régime hyperlipidique et présentent une meilleure sensibilité à l'insuline et une amélioration de la tolérance au glucose. L'angiogenèse du tissu adipeux de ces souris est moins importante, ce qui peut expliquer la diminution de l'infiltration des lymphocytes et la sécrétion des cytokines inflammatoires. Ces résultats permettent de supposer que les mastocytes régulent le développement de l'inflammation *via* la croissance des vaisseaux sanguins (214). Enfin, les taux sériques de certaines protéines sécrétées par les mastocytes comme les deux sérines protéinases chymase et tryptase sont élevés dans les cohortes d'individus pré-diabétiques et diabétiques, ce qui suggère un rôle de ces cellules dans le développement des perturbations métaboliques liées à l'obésité (215).

#### **IV.3.5 Le recrutement des cellules myéloïde immuno-suppressives ou MDSCs**

Très peu d'études existent aujourd'hui montrant le recrutement et le rôle de ces cellules dans le tissu adipeux blanc et leur impact sur le métabolisme énergétique. Une étude récente a cependant montré un rôle important des MDSCs dans la régulation de l'inflammation et le métabolisme chez les souris obèses. En effet, l'étude de Xia et Coll. a montré une augmentation de nombre de MDSCs dans le tissu adipeux, le foie et le sang de souris sauvages mises sous un régime hyperlipidique ainsi que de souris *ob/ob*, suggérant une implication de ces cellules dans la régulation de l'homéostasie énergétique. De plus, l'étude a

montré qu'une déplétion des MDSCs provoque une exacerbation de l'état inflammatoire chronique et de chez les souris obèses tandis qu'un transfert adoptif de ces cellules améliore l'état métabolique des animaux et atténue l'inflammation (216). Enfin, dans une autre étude, il a été montré que les MDSCs retardent l'apparition du diabète de type 1 et la résistance à l'insuline, montrant un rôle important de ces cellules dans la régulation du système immunitaire et l'homéostasie énergétique (217).

#### **IV.3.6 Le recrutement des éosinophiles**

Le rôle des éosinophiles dans le développement de l'inflammation du tissu adipeux blanc a été abordé récemment et reste controversé. Les éosinophiles sont présents essentiellement dans les tissus adipeux périgonadiques et mésentériques. D'une façon intéressante, le nombre de ces cellules diminue chez les souris mises sous un régime hyperlipidique et chez les souris *ob/ob*. Les éosinophiles dans le tissu adipeux produisent la cytokine anti-inflammatoire IL-4 qui maintient les macrophages dans un profil M2. Une étude récente a montré qu'une déplétion des éosinophiles chez la souris entraîne une intolérance au glucose et le développement d'une résistance à l'insuline tandis qu'une augmentation de leur nombre suite à une infection parasitaire améliore l'état métabolique des souris (194).

#### **IV.3.7 Le recrutement des lymphocytes B**

Le nombre des LcB augmente dans le tissu adipeux blanc des souris obèses et une déplétion de cette population améliore l'état métabolique des souris malgré une prise de poids plus importante. Les LcB affectent le métabolisme glucidique en activant les macrophages M1 (pro-inflammatoires) et en produisant des effecteurs pathogènes. De plus, les molécules CMH I et II à la surface des LcB sont impliquées dans l'activation des LcT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (218). Une étude récente a montré un rôle important des LcB dans la régulation de l'inflammation dans l'obésité et le diabète de type II. Les souris déficientes en LcB présentent une inflammation diminuée durant l'obésité. De plus, ces observations ont été associées à une augmentation du pourcentage des LcT régulateurs dans le tissu adipeux. Finalement, l'étude a montré un rôle de ces LcB qui soutient les fonctions pro-inflammatoires des LcT dans le tissu adipeux blanc des souris obèses (219). Cependant, Nishimura et Coll. ont montré l'existence d'une population de LcB régulateurs dans le TAV des souris qui diminuent avec l'obésité.

Contrairement aux LcB recrutés durant l'expansion du tissu adipeux, cette étude montre un rôle anti-inflammatoire des LcB régulateurs (exprimant les marqueurs IgM, IgD et CD22 chez la souris) résident dans le tissu des souris minces et qui sont capables de sécréter de l'IL-10 dans le but de contrôler l'inflammation au sein du tissu adipeux blanc et d'atténuer la résistance à l'insuline liée à l'obésité (220).

#### **IV.3.8 Le recrutement des lymphocytes T**

Une augmentation de la production de l'IFN $\gamma$  par les NK, les LcTh $_1$  et les CD8 $^+$ , connus pour stimuler la différenciation des macrophages pro-inflammatoires, a été observée chez les patients obèses. De plus, cette augmentation corrèle avec les complications métaboliques de ces derniers (221). Il est suggéré que l'augmentation des LcT CD4 $^+$  et des Th $_1$  dans le tissu adipeux durant l'obésité est due à une détection d'un antigène spécifique et à une expansion des cellules T. Cependant, les antigènes responsables de l'expansion des LcT ne sont pas encore identifiés dans le tissu adipeux (222). Les Th1 sont une des populations la plus importante dans le développement de l'inflammation du tissu adipeux et de la résistance à l'insuline. Une accumulation des LcT CD4 $^+$  et CD8 $^+$  est observée dans le tissu adipeux des souris après mises un régime hyperlipidique accompagnée d'une insatllation de l'IR (223-225). Cette accumulation a été également observée dans les tissus adipeux blanc omental et sous-cutanés des patients obèses avec une forte prédominance des CD4 $^+$  et une infiltration plus importante dans la masse omentale (226, 227). Même si le rôle de l'IFN $\gamma$  n'est pas encore bien clarifié, il est connu qu'il impacte sur le métabolisme oxydatif et le développement des vaisseaux sanguins nécessaires pour l'infiltration des macrophages chez la souris (198, 228). Les souris invalidées pour le gène codant l'IFN $\gamma$  développent une inflammation du tissu adipeux moins importante accompagnée d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (224).

Le nombre des lymphocytes T $_{h2}$  diminuent dans le tissu adipeux des souris obèses accompagné d'une diminution de l'expression de l'IL-4 (222, 229). Chez des patients obèses, une augmentation des LcTh2 est observée (230) sans altération du taux d'IL-4 circulant. Concernant le rôle de ces cellules dans la régulation de l'homéostasie métabolique de l'organisme, une étude a montré qu'un transfert adoptif des cellules LcT CD4 $^+$  dans des souris RAG $^{\text{null}}$  a amélioré leur statut de sensibilité à l'insuline tandis que le transfert des cellules LcT CD4 $^+$  STAT6 $^-$  (facteur de transcription essentiel pour la fonction des T $_{h2}$ ) n'a pas conduit à la

même observation (222), montrant un rôle métabolique intéressant de ces cellules. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour mieux établir le rôle de ces LcT dans la régulation de la sensibilité à l'insuline de l'organisme.

Les lymphocytes Th<sub>17</sub> jouent un rôle important dans les pathologies auto-immunes. Une augmentation des taux des cytokines IL-17 et IL-23 (spécifiques des Th<sub>17</sub>) a été observé chez les patients obèses (230). De plus, une étude a montré une augmentation du nombre des LcTh<sub>17</sub> et LcTh<sub>1</sub> et une diminution des antagonistes Tregs dans le sang des patients obèses et/ou diabétiques (231-233). Récemment, une étude a montré une augmentation des des LcTh<sub>17</sub> dans le tissu adipeux des patients obèses diabétiques comparés aux patients obèses non-diabétiques et qui a été associée à l'IR (234). Les données chez la souris montrent qu'un régime hyperlipidique augmente le niveau d'expression d'IL-17 dans les LT  $\gamma\delta$  et le nombre des LcTh<sub>17</sub> (231). L'IL-17 active la voie de signalisation JNK connue pour induire une phosphorylation sur les résidus sérine au niveau d'IRS1 contribuant ainsi à l'IR (235, 236). Cependant, les rôles d'IL-17 ne sont pas très bien élucidés. En effet, dans des modèles d'obésité chez la souris, l'IL-17 est suggérée comme étant un facteur protégeant contre la prise du poids corporel et le développement de la résistance à l'insuline (237). En effet, les souris invalidées pour le gène codant l'IL-17 sont plus obèses et leur glycémie à jeun est plus importante (231).

Les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> protègent les souris obèses contre le développement d'une inflammation excessive en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (238). Chez une souris mince, les Tregs vont maintenir un environnement anti-inflammatoire en produisant de l'IL-10 contribuant ainsi à un maintien de l'homéostasie énergétique. Chez les souris et les patients obèses, une diminution du nombre de Tregs dans le tissu adipeux viscéral a été observée, ce qui suggère un rôle important de ces cellules dans la régulation de l'homéostasie des tissus métaboliques (222, 238, 239). Le nombre des Tregs est augmentée chez les patients obèses non diabétiques comparés aux patients minces mais cette augmenation diminue chez les patients obèses diabétiques comporés aux patients contôles (232). De ce fait, de nombreuses études se sont intéressées à éclaircir le rôle des Tregs dans le métabolisme et ont montré qu'une déplétion des Tregs chez les souris minces provoque une augmentation de la sécrétion de l'insuline et des facteurs inflammatoires au niveau local (tissu adipeux blanc) et systémique (sang) (238). D'autres études ont montré qu'une injection d'IL-2 chez les souris obèses conduit à une augmentation du nombre des Tregs et des taux d'IL-10 associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose. Enfin,

des injections journalières d'un anticorps dirigé contre le marqueur de CD3 des LcT augmentent le nombre des Tregs dans le tissu adipeux après 9 semaines de traitement et qui ont été associés à une amélioration de la sensibilité à l'insuline de l'organisme (222). Ces observations montrent le rôle important des Tregs dans la régulation et le maintien de l'homéostasie métabolique de l'organisme.

Concernant les LcT CD8<sup>+</sup>, le tissu adipeux des souris et des patients obèses montre une augmentation de 3 à 4 fois du nombre des lymphocytes CD8<sup>+</sup> (222, 240). Les LcT CD8<sup>+</sup> augmentent le recrutement des macrophages M1 chez la souris, provoquant ainsi le développement de l'inflammation du tissu. En effet, une déplétion des CD8<sup>+</sup> diminue le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux et des facteurs inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IL-6 tandis qu'un transfert adoptif des CD8<sup>+</sup> chez les souris obèses provoque une accumulation des macrophages M1 dans le tissu adipeux accompagnée d'une exacerbation de la résistance à l'insuline et de l'intolérance au glucose (239).

Durant l'obésité, des événements moléculaires et cellulaires sont activés afin de pouvoir réguler plusieurs processus cellulaires. Une des voies de signalisation essentielle dans la régulation du développement de l'obésité d'une part et dans la régulation de l'activité et du recrutement de cellules immunes d'une autre part est la voie mTOR ou « *mechanistic target of rapamycin* ». Dans la partie suivante de l'Introduction, l'importance des deux complexes protéiques mTOR : mTORC1 et mTORC2 va être exposée. Je vais exposer leurs rôles dans la fonction des tissus métaboliques, des cellules immunes et leurs impacts sur l'homéostasie métabolique de l'organisme.

## V. La voie mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin*)

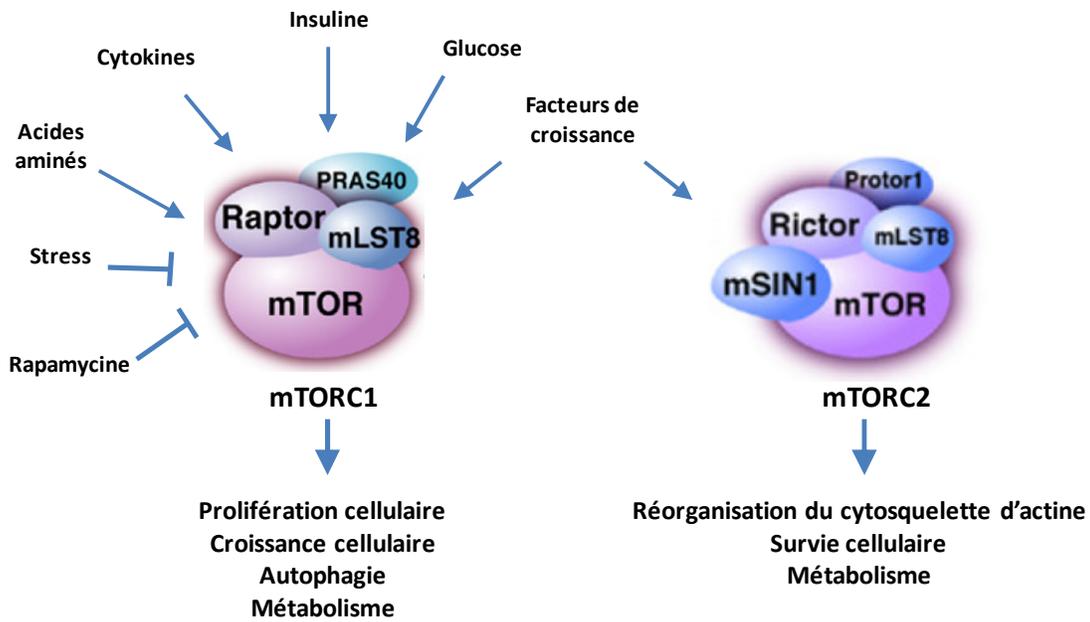
La sérine thréonine kinase mTOR est hautement conservée entre les espèces. La voie de signalisation mTOR est un senseur de nutriments et des signaux environnementaux impliquée dans la régulation de la croissance de l'organisme et de son homéostasie énergétique. mTOR régule de nombreux processus cellulaires et est impliqué dans le développement de certaines conditions pathologiques comme le cancer, le diabète de type 2 et la dégénérescence neuronale.

### V.1 Les deux complexes mTOR : mTORC1 et mTORC2

mTOR est la cible de la rapamycine ou « Sirolimus » qui est un macrolide produit par la bactérie *Streptomyces Hygroscopicus* possédant des propriétés immuno-suppressives et antiprolifératives. Dans les années 1990, un criblage génétique effectué chez la levure a identifié TOR1 et TOR2 comme des médiateurs des effets toxiques de la rapamycine chez la levure (241, 242). Peu de temps après, des approches biochimiques réalisées chez les mammifères ont permis de purifier la protéine mTOR et de montrer l'interaction physique avec la rapamycine (243, 244).

mTOR est une sérine thréonine kinase atypique appartenant à la famille des phosphoinositide 3-kinases (PI3K). Elle interagit avec différentes protéines pour former deux complexes distincts appelés mTORC1 et mTORC2. Ces deux complexes possèdent des fonctions et une sensibilité différente à la rapamycine. mTORC1 interagit avec six autres protéines afin de former le complexe et pouvoir exercer son rôle tandis que mTORC2 est un complexe composé de 7 sous-unités au total (**Fig. 18**, (245)).

Les deux complexes partagent la sous-unité catalytique mTOR, la protéine mLST8 (*mammalian lethal sec-13 protein 8*), DEPTOR (*DEP domain containing mTOR-interacting protein*) et finalement le complexe Tti1/Tel2. En revanche, les protéines RAPTOR (*regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*) et PRAS40 (*prolin-rich AKT substrate 40 kDa*) sont spécifiques du complexe mTORC1 tandis que les protéines RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSin1 (*mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1*) et PROTOR1/2 (*protein-observed with rictor*) font partie uniquement du complexe mTORC2 (**Fig. 18**).



mTORC1		mTORC2	
mTOR	Serine/threonine kinase	mTOR	Serine/threonine kinase
raptor	Scaffold protein regulating the assembly, localization, and substrate binding of mTORC1	rictor	Scaffold protein regulating the assembly and substrate binding of mTORC2
pras40	mTORC1 inhibitor	mSin1	Scaffold protein regulating the assembly of mTORC2 and its interaction with SGK1
depor	mTOR inhibitor	protor 1/2	Protor1 increases mTORC2-mediated activation of SGK1
mLST8	Unknown function, its loss does not affect mTORC1 activity towards known substrates	depor	mTOR inhibitor
tti1	Scaffold proteins regulating the assembly and the stability of mTORC1	mLST8	Unknown function, essential for mTORC2 activity
tel2		tti1	Scaffold proteins regulating the assembly and the stability of mTORC2
		tel2	

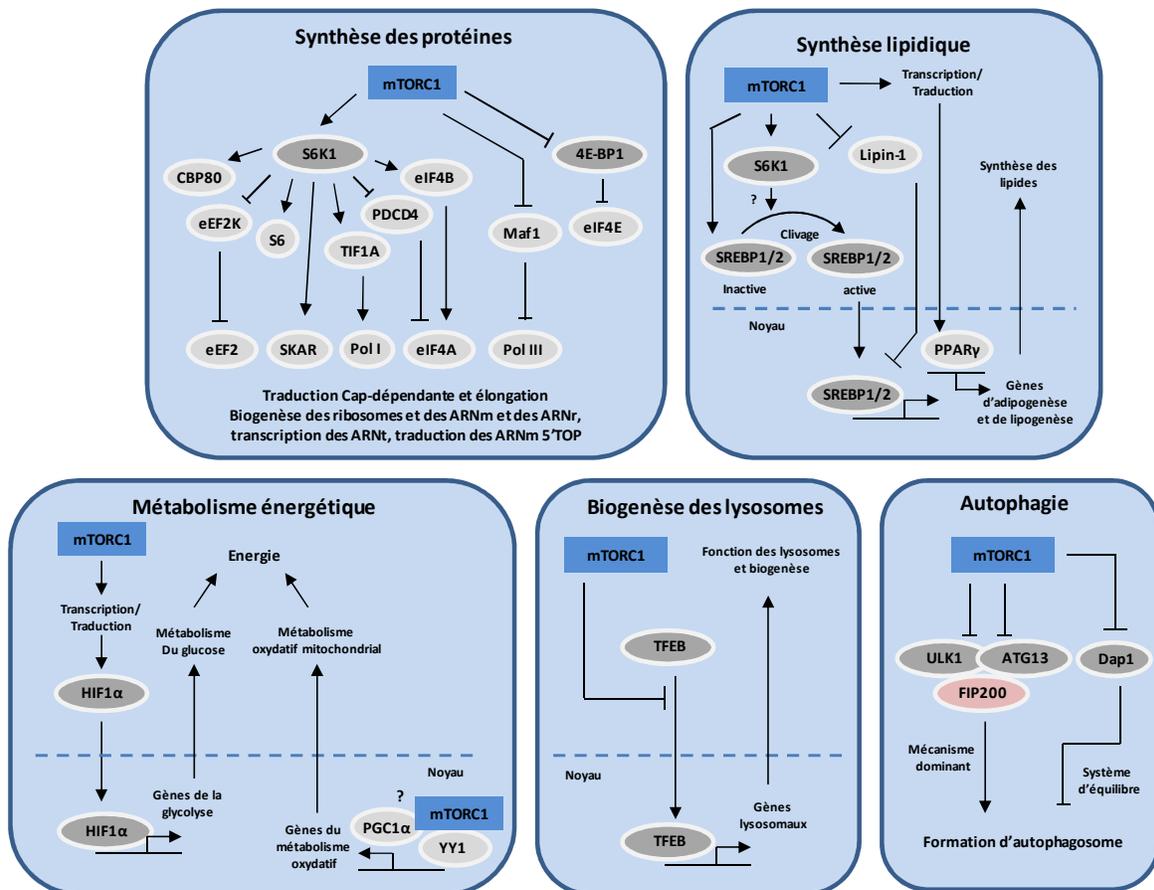
**Figure 18. Les complexes mTORC1 et mTORC2.** mTORC1 est composé de six sous-unités, et est activé par différents signaux tels que les acides aminés, le niveau d'énergie, les cytokines, les hormones. mTORC1 est impliqué dans différents processus cellulaires comme la régulation du métabolisme, la croissance, le cycle cellulaire et l'autophagie. mTORC2 est composé de sept sous-unités et activé par des hormones. Ce complexe est impliqué dans la régulation du métabolisme, la survie cellulaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine (adapté de 245).

### V.1.1 Les régulateurs de mTORC1 et son implication dans différents processus cellulaires

mTORC1 est fortement sensible à la rapamycine. En effet, des faibles doses de rapamycine, à court ou à long terme d'exposition provoque une inhibition de ce complexe. mTORC1 est capable d'intégrer au moins cinq types de signaux (le stress, la disponibilité de l'énergie, les

hormones, l'oxygène et les acides aminés) pour réguler différents processus cellulaires dans l'objectif de maintenir l'homéostasie cellulaire (Fig. 19).

Un des régulateurs clé de la voie mTORC1 est le complexe hétérodimérique TSC1/TSC2 (*Tuberos sclerosis 1/2*) qui régule négativement l'activité de ce dernier. TSC1/TSC2 inhibe mTORC1 en régulant l'activité de la protéine GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*). Le complexe TSC1/TSC2 reçoit différents signaux (e.g. l'insuline, le facteur IGF1 (*insulin-like growth factor*)) qui affectent l'activité de mTORC1 *via* les voies de signalisation PI3K et Ras. Les kinases effectrices de ces voies de signalisations - la protéine kinase B (AKT/PKB), la RSK1 (protéine ribosomale S6K) et ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1/2*) – inhibent directement le complexe TSC1/2 permettant ainsi l'activation du complexe mTORC1 qui à son tour régule les protéines P70 S6K1 et 4E-BP1 (246). L'activation de mTORC1 provoque une phosphorylation des ses deux substrats dans le but de réguler un des processus les plus importants, la traduction et la synthèse des protéines (Fig. 19).



**Figure 19. Les processus cellulaires régulés par mTORC1.** mTORC1 régule plusieurs processus biologiques *via* la phosphorylation de plusieurs protéines. S6K1 et 4E-BP1 sont les substrats le mieux caractérisés jusqu'à aujourd'hui du complexe mTORC1. Ce complexe est impliqué dans la régulation de la synthèse protéique et lipidique, la biogenèse des lysosomes, la régulation de l'autophagie et le métabolisme énergétique (adapté de 245).

De plus, mTORC1 contrôle la synthèse des lipides nécessaires pour la génération des membranes lors de la prolifération cellulaire (247). mTORC1 régule le facteur de transcription SREBP1/2 (*sterol regulatory element-binding protein 1/2*) qui contrôle l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et la synthèse du cholestérol (248) (**Fig. 19**). En outre, des études ont montré que mTORC1 régule positivement le flux glycolytique *via* le facteur HIF1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor 1 $\alpha$* ) et la biogenèse mitochondriale *via* le complexe nucléaire PGC1 $\alpha$  et le facteur de transcription YY1 (*Ying-Yang 1*) (248-251) (**Fig. 19**).

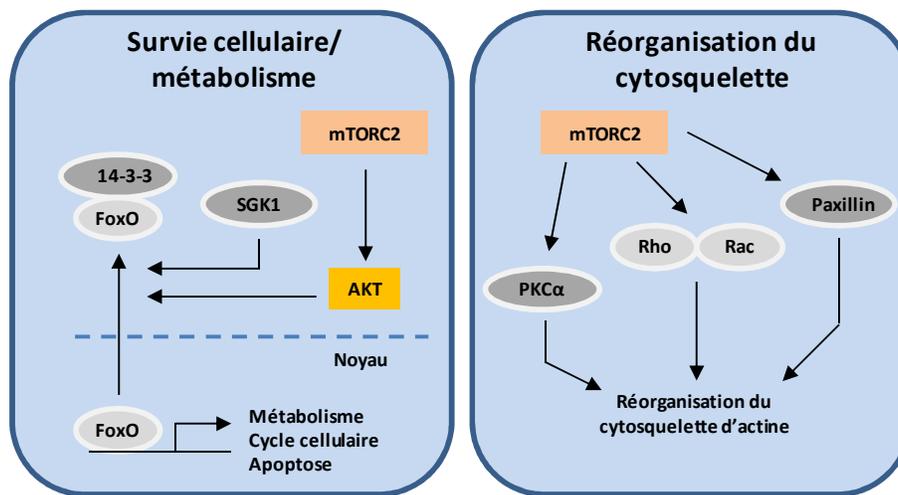
mTORC1 ne fonctionne pas uniquement dans des conditions anaboliques. Il a été montré également que ce complexe stimule la croissance en régulant négativement le processus d'autophagie. L'autophagie est un processus cellulaire employé afin de recycler les organelles endommagées et d'adapter la cellule et l'organisme en situation de carence en nutriments. mTORC1 phosphoryle directement et inhibe le complexe ULK1/ATG13/FIP200 (*unc-51-like kinase 1/ mammalian autophagy-related gene 13/ focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*) nécessaire pour initier l'autophagie (252, 253) (**Fig. 19**). mTORC1 régule négativement la biogenèse des lysosomes qui sont des organelles multifonctionnelles ayant la capacité de dégrader la plupart des composants cellulaires. Enfin, une étude récente a montré le rôle de mTORC1 dans la régulation des lysosomes *via* le facteur de transcription EB (TFEB) en inhibant la translocation nucléaire de ce dernier (254, 255) (**Fig. 19**).

### V.1.2 Les régulateurs et les processus cellulaires de mTORC2

Le complexe mTORC2 a longtemps été considéré comme étant insensible à la rapamycine. En effet, une exposition aigue à la drogue ne conduit pas à l'inhibition de son activité. Ce constat a récemment changé suite à des études qui ont montré que des conditions de traitement à long terme par la rapamycine réduisent la signalisation de mTORC2 dans certains types cellulaires, ceci en empêchant l'assemblage de l'intégralité du complexe (256, 257).

Comparativement au complexe mTORC1, la voie de signalisation de mTORC2 n'est pas très étudiée. Cette voie de signalisation n'est pas activée par les nutriments mais est stimulée par les hormones comme l'insuline selon un ou des mécanismes qui restent encore à clarifier. Récemment, il a été décrit que les ribosomes sont impliqués dans l'activation du complexe mTORC2 (258).

mTORC2 contrôle plusieurs membres des protéines kinase appartenant à la familles des AGC incluant AKT, SGK1 (*serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1*), and PKC- $\alpha$  (*protein kinase C- $\alpha$* ). AKT régule plusieurs processus cellulaires comme le métabolisme, la survie cellulaire, l'apoptose et la prolifération en phosphorylant plusieurs effecteurs (**Fig. 20**). mTORC2 active AKT en le phosphorylant sur son résidu sérine 473, un site nécessaire pour induire une activité optimale (259). De plus, mTORC2 active directement la protéine SGK1 qui contrôle le transport ionique et la croissance cellulaire (260). Enfin, PKC- $\alpha$  est la troisième protéine des AGC activée par mTORC2 et est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine (261, 262) (**Fig. 20**).

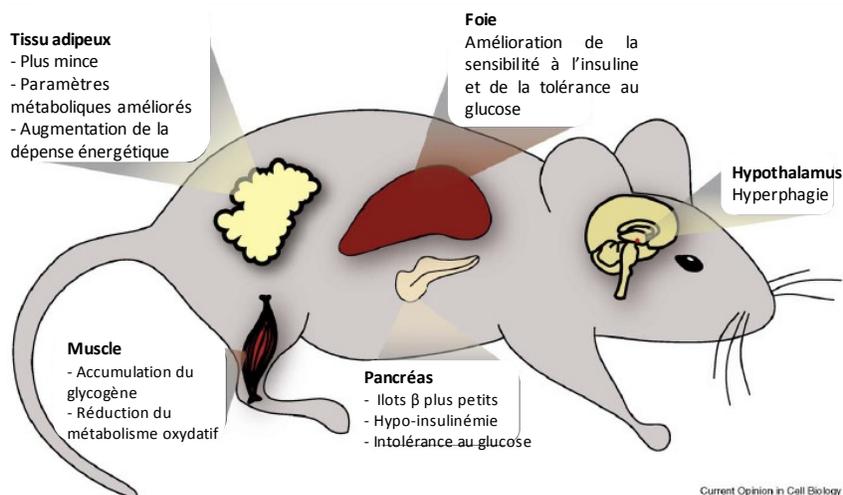


**Figure 20. Les processus cellulaires régulés par mTORC2.** mTORC2 régule plusieurs processus biologiques via la phosphorylation de plusieurs protéines. AKT et les protéines de la famille des AGC sont les substrats les mieux caractérisés. Ce complexe est impliqué dans la régulation de certains processus métabolique, le cycle cellulaire, l'apoptose et finalement il régule le cytosquelette d'actine (adapté de 245).

## V.2 La voie de signalisation de mTOR dans les tissus et ses rôles métaboliques

mTOR est un senseur de nutriments et de certaines hormones. De ce fait, une attention particulière a été portée sur le rôle de ce complexe dans la régulation du métabolisme de l'organisme.

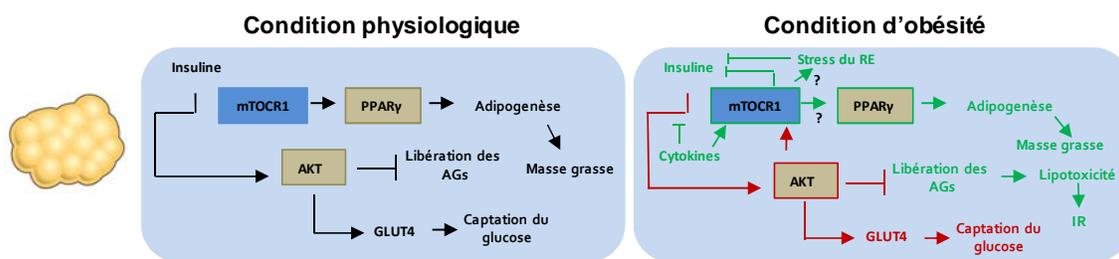
Une meilleure compréhension du rôle de mTOR dans la régulation du métabolisme *in vivo* a été limitée par le fait qu'une invalidation totale du gène codant mTOR est létale pour l'organisme (263-266). Cependant, l'utilisation des invalidations conditionnelles des gènes codant le complexe mTOR a révélé son rôle crucial dans la régulation du métabolisme dans différents tissus (**Fig. 21**, (267)). Cette partie du manuscrit synthétise les données qui permettent de relier mTOR aux différents tissus métaboliques tout en focalisant sur le rôle de cette voie dans le développement de certaines pathologies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2.



**Figure 21. Les modifications métaboliques tissu-spécifiques observées chez les souris ayant une perte de fonction de la voie de signalisation mTORC1 (267).**

## V.2.1 Le rôle de mTOR dans le tissu adipeux : La régulation de l'adipogenèse et la lipogenèse

La voie de signalisation mTOR joue un rôle essentiel dans l'adipogenèse. L'inhibition de mTORC1 *in vitro* bloque l'adipogenèse et réduit la fonction des adipocytes matures (268-270), tandis qu'une activation de mTORC1 favorise ces processus (271). Les souris ayant une invalidation spécifique de mTORC1 en utilisant le système cre-lox contrôlé par le promoteur du gène aP2 dans le tissu adipeux et recevant un régime hyperlipidique sont résistantes au développement de l'obésité. De plus, les souris ayant une perte de fonction du complexe mTORC2 ont une masse grasse normale mais présentent une altération de l'activité de la protéine AKT qui se traduit par une augmentation de la lipolyse et des taux d'acides gras libres circulants (272).

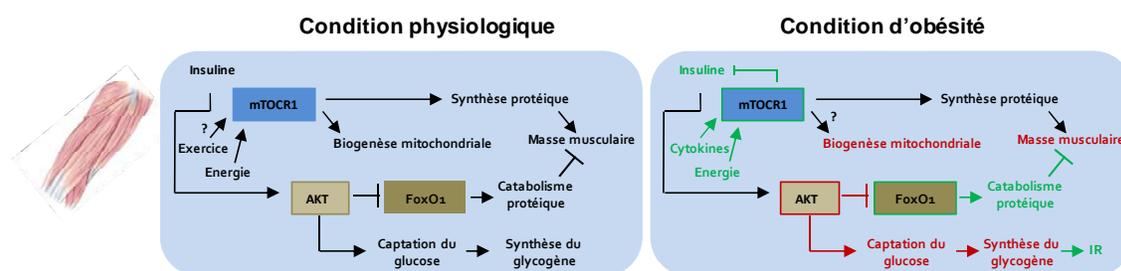


**Figure 22.** Le rôle de mTORC1 dans l'adipogenèse dans des conditions physiologiques et d'obésité (adapté de 245).

mTORC1 est sur-activé dans les tissus de souris obèses (273, 274). Les taux élevés d'insuline, de cytokines inflammatoires et de nutriments (glucose et acides aminés) provoquent l'activation de mTORC1 (**Fig. 22**). En plus de son rôle dans la contribution de l'expansion du tissu adipeux en régulant les gènes impliqués dans l'adipogenèse, mTORC1 provoque l'installation de la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux en activant son substrat S6K1. S6K1 exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation de l'insuline provoquant ainsi la dégradation des protéines IRS1 et 2 (273). Enfin, l'augmentation de la synthèse des protéines associée à l'activation de mTORC1 peut provoquer une résistance à l'insuline *via* le déclenchement d'un stress du réticulum endoplasmique et la réponse des protéines UPR (*unfolding protein response*) (275) (**Fig. 22**). Le stress du réticulum endoplasmique est un phénomène prédominant dans les plus gros adipocytes et provoque l'activation de la voie JNK qui interfère avec la voie de l'insuline et va conduire à l'installation de l'insulino-résistance (276).

## V.2.2 Le rôle de mTOR dans le muscle : La régulation de la masse musculaire, le métabolisme oxydatif et l'homéostasie glucidique

mTOR intègre d'autres types de signaux que les nutriments. Ce complexe est capable de détecter, selon des mécanismes qui restent encore à identifier, des contractions mécaniques dans le muscle qui stimulent la synthèse protéique afin de réguler l'hypertrophie musculaire (277). Une étude a montré qu'une perte de la fonction de mTORC1 spécifiquement dans le muscle réduit la masse musculaire, la biogenèse mitochondriale et conduit à une mort précoce (278). Ces effets observés sont dus à une diminution de l'expression du facteur de transcription mitochondrial PGC1 $\alpha$ . D'une part, la perte de fonction de mTORC1 dans le tissu musculaire conduit à la réduction du rétrocontrôle négatif effectué par S6K1 sur IRS1, ce qui provoque une forte activation d'AKT accompagnée d'une accumulation du glycogène dans le muscle. D'autre part, l'inhibition de mTORC2 dans le muscle conduit à une réduction de l'assimilation du glucose provoquant ainsi le développement d'une intolérance au glucose (278, 279).



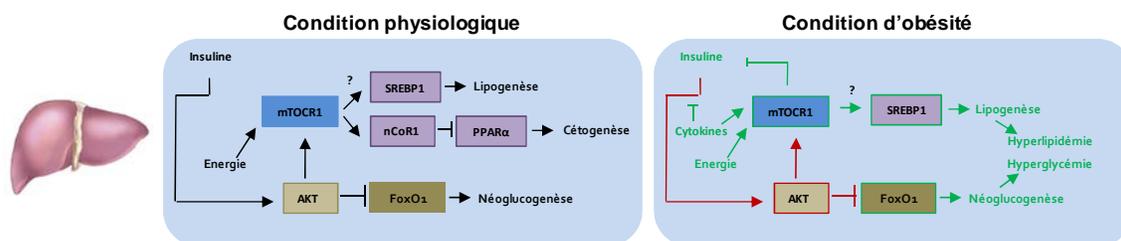
**Figure 23.** Le rôle de mTORC1 dans la masse musculaire, le métabolisme oxydatif et l'homéostasie glucidique dans des conditions physiologiques et d'obésité (adapté de 245).

Le muscle squelettique est le site majeur de consommation de glucose et une perturbation de la captation de ce nutriment dans ce tissu contribue à l'installation du diabète de type 2. La sur-activation de mTORC1 dans le muscle des souris obèses conduit à une abolition de la signalisation de l'insuline *via* S6K1, ce qui réduit la captation du glucose et provoque le développement de l'insulino-résistance associée à une perte musculaire comme cela a déjà pu être observé chez les sujets obèses et/ou insulino-résistants (273, 274). Ceci peut être expliqué par une augmentation d'un état catabolique provoqué par l'expression de l'ubiquitine ligase qui est régulée par le facteur FOXO1 (*forkhead box protein O1*) (**Fig. 23**) (280). D'une façon intéressante, la sur-activation de mTORC1 dans l'obésité et le diabète de type 2 conduit à un dysfonctionnement de la biogenèse mitochondriale (281-283). Ce paradoxe pourrait s'expliquer par le fait que la biogenèse mitochondriale n'est pas exclusivement contrôlée par

mTORC1 et qu'un autre mécanisme, qui reste à identifier, joue un rôle dans ce processus (Fig. 23).

### V.2.3 Le rôle de mTOR dans le foie : La régulation de la cétogénèse et de la lipogénèse

Le foie joue un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie lipidique et glucidique lors de la prise alimentaire ou du jeûne. mTORC1 contrôle la production des corps cétoniques par le foie utilisés par les tissus périphériques comme source d'énergie pendant le jeûne (284). Lors de cet état, l'activité de mTORC1 est diminuée et les souris ayant une sur-activation de mTORC1 durant cette période sont incapables de produire des corps cétoniques.



**Figure 24.** Le rôle de mTORC1 dans la régulation de la cétogénèse et la lipogénèse dans des conditions physiologiques et d'obésité (adapté de 245).

mTORC1 altère la fonction de PPAR- $\alpha$ , le facteur de transcription responsable de la régulation des gènes impliqués dans la cétogénèse, en provoquant l'accumulation nucléaire du corépresseur nucléaire 1 (NcoR1). De plus, mTORC1 stimule le métabolisme anabolique lors de la prise alimentaire en contrôlant la lipogénèse hépatique *via* la régulation du facteur SREBP1c (285, 286) (Fig. 24).

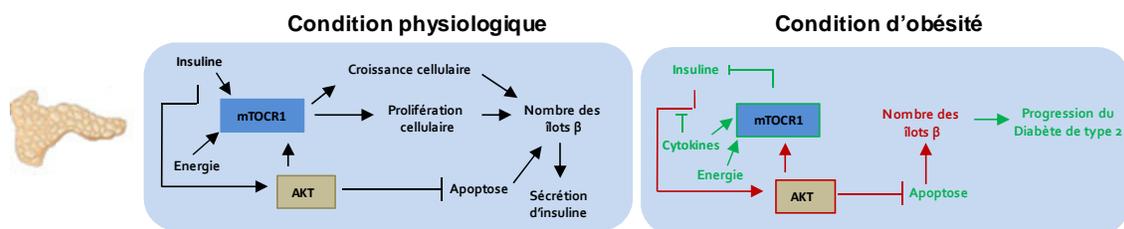
Comme déjà décrit dans le tissu adipeux et le muscle, mTORC1 est sur-activé dans le foie des souris obèses provoquant ainsi la dégradation d'IRS1 et l'installation de l'insulino-résistance hépatique (274, 287). L'altération de la voie PI3K/AKT dans le foie provoque une néoglucogénèse et contribue à une hyperglycémie et une hyperinsulinémie comme déjà observées dans le cas de l'insulino-résistance et le diabète de type 2 (Fig. 24).

L'obésité est un facteur de risque majeur pour le développement de la stéatose hépatique, une condition pathologique provoquée par une accumulation de lipides dans le foie et qui conduit à des sérieuses complications comme la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Une sur-activation de mTORC1 durant l'obésité conduit à une exacerbation de la lipogénèse *via* l'activation de SREBP1c. Ceci a été confirmé par une étude montrant qu'une perte de

fonction de mTORC1 dans le foie protège les souris du développement de la stéatose hépatique et de l'hyper-cholestérolémie induites par un régime hyperlipidique (288).

#### V.2.4 Le rôle de mTOR dans le pancréas : La régulation du nombre et de la taille des cellules $\beta$ , la sécrétion de l'insuline et de l'homéostasie glucidique

Les cellules  $\beta$  pancréatiques sécrètent l'insuline en réponse aux nutriments afin de réguler l'homéostasie glucidique. Le fait que mTORC1 joue un rôle important dans la croissance cellulaire et tissulaire a généré un intérêt pour éclaircir la fonction de mTORC1 dans la régulation des cellules  $\beta$ . Des études réalisées chez la souris ont montré qu'une sur-activation de mTORC1 dans le pancréas conduit à une hypoglycémie, une hyperinsulinémie et une amélioration de la tolérance au glucose (289, 290). Ces observations ont été associées à une augmentation de la taille et du nombre des cellules  $\beta$  qui peut être réversible suite à un traitement par la rapamycine. De plus, la protéine S6K1 semble être le substrat impliqué dans la régulation de ces processus cellulaires (**Fig. 25**). Cependant, une perte de fonction de mTORC2 dans les cellules  $\beta$  conduit à une hyperglycémie, une réduction du nombre et de la taille de ces cellules, de leur prolifération et de la synthèse et la sécrétion de l'insuline (291). Ces observations ont été liées à une réduction de l'activité d'AKT et à une activation du facteur FOXO1.



**Figure 25.** Le rôle de mTORC1 dans la régulation du nombre, de la taille et de la fonction des cellules  $\beta$  dans des conditions physiologiques et d'obésité (adapté de 245).

La résistance à l'insuline dans les tissus périphériques et l'excès de nutriments provoquent une forte pression sur la cellule  $\beta$  afin d'augmenter la synthèse et la sécrétion d'insuline. De fait, un phénomène de compensation est observé au niveau de ces cellules qui se traduit par une hypertrophie de ces dernières ou par la formation de nouvelles cellules sécrétrices d'insuline. Une activation continue de la cellule  $\beta$  peut induire son épuisement et le développement du diabète de type 2. mTORC1 est activé dans le pancréas des souris obèses (289) et joue un rôle crucial dans la régulation du nombre et de la fonction de la cellule  $\beta$  en réponse à un excès de nutriments et à l'insulino-résistance (**Fig. 25**). Même si mTORC1

régule positivement le nombre et la sécrétion de l'insuline dans la cellule  $\beta$ , une activation constitutive de cette voie contribue à l'installation de la résistance à l'insuline dans ces cellules comme dans le cas du foie, du muscle et du tissu adipeux. Ces effets sont délétères pour la cellule  $\beta$  puisqu'ils vont conduire à la réduction de la survie cellulaire et à l'apoptose (289, 292).

#### **V.2.5 Le rôle de mTOR dans l'intestin : maintien de la structure intestinale**

L'intestin est considéré aujourd'hui comme un tissu métabolique très impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique. Le rôle de mTOR dans l'intestin n'est pas encore très bien étudié. En effet, très peu d'études ont été réalisées pour comprendre le rôle de ce complexe dans la régulation de la structure et la fonction intestinale. Des études ont montré un rôle de mTORC1 dans la régulation de la synthèse des protéines, ce qui est une fonction conservée et retrouvée dans les tissus métaboliques de l'organisme (293). Cependant, l'équipe de Mayer AN a montré un rôle important de mTOR dans le contrôle de la morphogénèse épithéliale de l'intestin (294). En effet, l'utilisation de la rapamycine a inhibé la croissance des cellules épithéliales de l'intestin ainsi que sa morphogénèse. De plus, mTOR est impliqué dans la migration des cellules intestinales, ce qui suggère un rôle réparateur de ce complexe dans la fonction de barrière du tissu (295). Ceci a été conforté par une étude qui montre un rôle crucial de mTORC1 dans la maintenance de la muqueuse intestinale *in vivo* (296). Finalement, l'équipe de Sabatini DM a montré l'implication de mTORC1 dans la régulation des niches des cellules souches intestinales qui sont nécessaires pour le renouvellement de la barrière intestinale (297).

En plus de son rôle métabolique, le complexe mTOR est impliqué dans le développement, la différenciation et la fonction du système immunitaire. Dans la partie suivante de la thèse, les différents rôles de mTOR dans le développement et la fonction du système immunitaire vont être décrits montrant ainsi l'importance de ce complexe dans la régulation de l'homéostasie générale de l'organisme.

## V.3 Le rôle de mTOR dans le développement et la fonction du système immunitaire

De nos jours, il est de plus en plus reconnu que mTOR est un régulateur central de la réponse immune. En effet, mTOR joue un rôle essentiel dans la régulation de diverses cellules immunes telles que les neutrophiles, les cellules dendritiques, les mastocytes, les macrophages ainsi que les lymphocytes T et B (298-300). Dans cette partie de la thèse, le rôle de mTOR dans la différenciation, l'activation et la fonction des cellules immunes est développé.

### V.3.1 Le rôle de mTOR dans la régulation des cellules immunes

**V.3.1a Le rôle de mTOR dans les cellules dendritiques** L'utilisation de la rapamycine sur les cellules dendritiques a montré la fonction de mTOR dans le développement de la réponse immune induite par la voie des TLR (*Toll-like receptor*) (301, 302). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) jouent un rôle important dans la réponse immune antivirale *via* une production rapide de l'IFN $\gamma$ . L'inhibition de mTOR dans les pDCs empêche l'interaction entre les deux protéines TLR9 et MyD88 et la phosphorylation d'IFN regulatory factor-7 (IRF7) et sa translocation dans le noyau. L'inhibition d'IRF7 empêche la production des IFN de type 1 et altère la réponse immune antivirale (303). Ces données montrent l'importance de l'activation de la voie mTOR et son implication dans la formation de cellules dendritiques fonctionnelles. Le rôle de mTOR dans la différenciation des DCs, l'internalisation de l'antigène, la maturation et la migration des cellules a été largement étudié dans des modèles *in vitro* (304). La rapamycine inhibe la différenciation et la mobilité des DCs *in vivo* (305). De plus, l'inactivation de mTOR inhibe la macropinocytose des DCs et l'endocytose (306) tandis que, à l'inverse, l'autophagocytose est induite (307). Des études ont montré également un rôle de mTOR dans la migration des DCs et ceci en augmentant l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 suite à un traitement à la rapamycine (308).

Outre son rôle dans la régulation de la production des IFNs, mTOR régule la sécrétion d'autres cytokines par les DCs. Le traitement à la rapamycine a révélé des effets contradictoires sur la sécrétion et la production des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et anti-inflammatoires comme l'IL-10 dans les cellules dendritiques humaines (309, 310)

(Fig. 26). Des études plus approfondies sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle stimulateur ou inhibiteur de mTOR dans la fonctionnalité des DCs qui semble être spécifique de chaque sous-population.

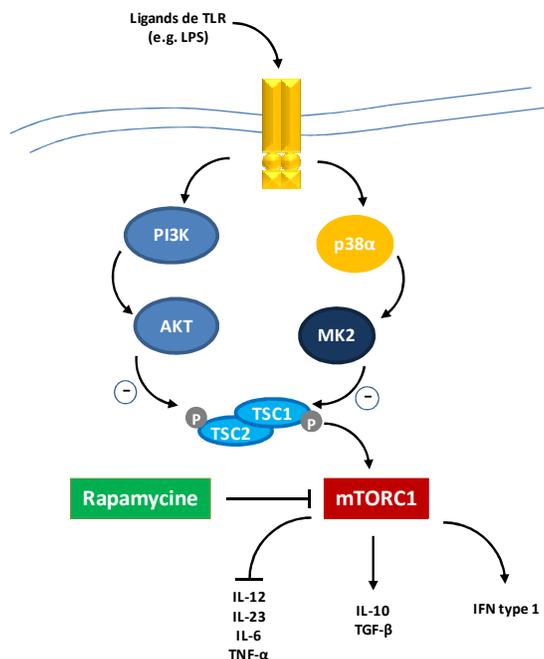


Figure 26. Le rôle de mTOR dans la régulation de l'expression des cytokines inflammatoires dans les cellules dendritiques et les macrophages.

### V.3.1b Le rôle de mTOR dans les macrophages

L'inhibition de mTOR dans les macrophages humains conduit à une augmentation importante de la production d'IL-23 (311) (Fig. 26). De plus, l'inactivation de mTOR affecte le niveau de production de NO du fait d'une altération de la sécrétion de l'IFN $\beta$  (un cofacteur autocrine pour la production de NO) (312). Une exposition à court terme à la rapamycine inhibe la phagocytose et le chimiotactisme des macrophages (313). Bien que l'inhibition de mTOR ait montré son rôle important dans la régulation de la fonction des macrophages, des études ciblant directement le complexe TSC1/2 (le complexe qui régule négativement l'activité de mTORC1) ont montré qu'une déficience en TSC1 provoque une augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires et de la production du NO en réponse à une stimulation des TLRs. Cette augmentation est due à l'activation de mTORC1 et de la voie JNK1/2 dans la cellule accompagnée d'une altération de la tolérance aux endotoxines *in vitro* et *in vivo* (314). Plus récemment, des études ont montré un rôle de mTOR dans la polarisation des macrophages. Cependant, l'implication de mTOR dans la polarisation M1 vs. M2 nécessite plus d'être encore plus clarifié du fait des résultats contradictoires qui ont été observé. En effet, Mercurio et Coll. ont montré qu'une inhibition de mTOR par la rapamycine favorise la polarisation des

macrophages vers un profil M1 tandis que dans une autre étude effectuée par Byles et Coll, les chercheurs ont montré que l'activation mTORC1 favoriserait la polarisation en M1 et bloquerait la polarisation en profil M2 (315, 316). Ces études montrent que mTORC1 et TSC1 sont des régulateurs importants de l'immunité innée. Aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent concernant le rôle de mTORC2 dans les macrophages.

**V.3.1c Le rôle de mTOR dans neutrophiles** mTOR joue un rôle dans la formation des NET (*neutrophil extracellular traps*) dans les neutrophiles primaires humains. Ceci passe par la régulation de la traduction du facteur HIF-1 $\alpha$  en réponse au LPS (317). Le complexe mTORC1 est essentiel pour l'activation des neutrophiles *via* les récepteurs TLR2 et 4 (318) et elle interagit avec le facteur STAT1 pour supprimer l'induction de l'apoptose. De plus, mTOR joue un rôle dans le chimiotactisme des neutrophiles puisqu'un traitement de ces cellules par la rapamycine inhibe ce processus cellulaire (319). Concernant mTORC2, une étude a montré son rôle dans la régulation du chimiotactisme des neutrophiles *via* la voie cAMP/RhoA, indépendamment de la réorganisation du cytosquelette d'actine (320).

**V.3.1d Le rôle de mTOR dans les mastocytes** Plusieurs études ont suggéré un rôle potentiel de mTOR dans la régulation des mastocytes. Le traitement de souris allergiques par la rapamycine atténuent la pathologie *via* un mécanisme d'immunosuppression et d'inhibition de l'hyperplasie des mastocytes intestinaux (321). La rapamycine inhibe la prolifération des mastocytes après exposition aux cytokines. Cependant, elle n'affecte que peu, voire pas du tout, la production des cytokines par les mastocytes. En revanche, elle inhibe la production des cytokines, le chimiotactisme et la survie cellulaire de ces cellules isolées à partir des tumeurs (322) indiquant que mTORC1 est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie des mastocytes. Une inhibition sélective de mTORC1 et de mTORC2 a montré un rôle de mTORC1 dans la régulation de la survie cellulaire et un rôle de mTORC2 dans la régulation de la prolifération des mastocytes (323).

Ces données montrent un rôle majeur de mTOR dans la régulation du système immunitaire inné. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre l'implication de l'axe TSC-mTOR dans le développement de ce système. Des effets contradictoires de l'inhibition de cet axe ont en effet été observés (309, 317, 324). La rapamycine possède des fonctions anti-inflammatoires sur la génération des DCs *in vitro* tandis qu'elle augmente la production des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et l'IL-23 par les macrophages

*in vitro* (309, 325). Enfin, le rôle de mTOR dans le développement, l'activation et la fonction des MDSCs n'a pas été exploré jusqu'à aujourd'hui ; une population cellulaire qui joue un rôle important dans la régulation du système immunitaire inné et adaptatif.

**V.3.1e Le rôle de mTOR dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>** Une invalidation du gène codant mTOR dans les LcT a montré un rôle fondamental de cette voie dans la différenciation et le maintien de l'homéostasie et la fonction des LcT (326, 327). En effet, une délétion de Rheb (activateur de mTORC1) a empêché la différenciation des LcT en Th1 et Th17 mais elle a maintenu la différenciation en Th2 (326). En parallèle, des études provoquant une délétion de Rictor (sous-unité du complexe mTORC2) ont montré une inhibition de la différenciation des LcT CD4<sup>+</sup> en Th1 et Th2 (328).

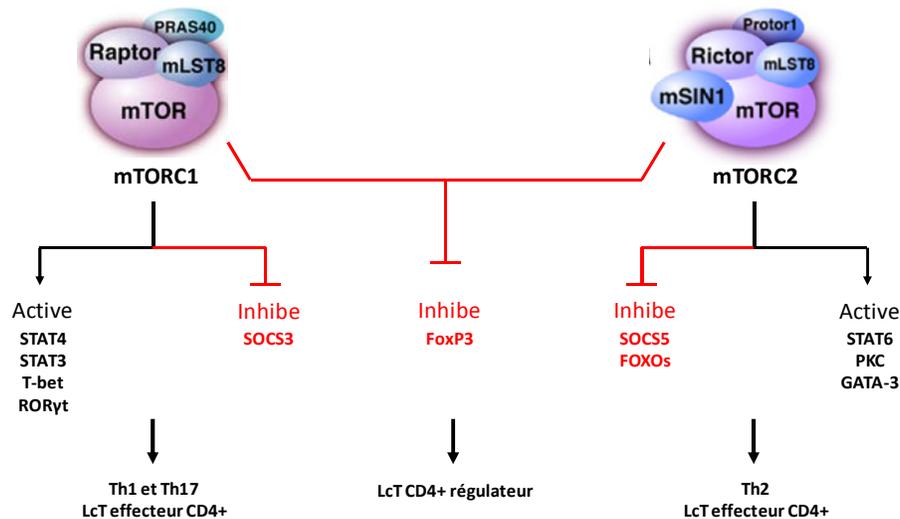


Figure 27. Rôle des deux complexes mTOR dans le développement des lymphocytes Th1, Th2 et Tregs

De plus, une inhibition de mTOR par la rapamycine conduit à la stimulation des LcT CD8<sup>+</sup> mémoires (329). Le traitement par la rapamycine n'augmente pas seulement le nombre des cellules CD8<sup>+</sup> mais améliore également leur qualité de détection des antigènes (330). L'IL-12 conduit à une augmentation et au maintien de l'activité de mTOR dans les CD8<sup>+</sup> naïfs mais en présence de la rapamycine cet effet est annulé et conduit à une diminution du facteur de transcription T-bet et à une augmentation de facteur *eomesoderin* contribuant ainsi à la génération des CD8<sup>+</sup> mémoires (331). De plus, mTOR joue un rôle crucial dans l'anergie associée à une diminution de l'activité de S6K1 (substrat de mTORC1), dans l'activation et la migration des LcT *in vivo* (332-334). Enfin, une étude récente a montré le rôle mTORC2 dans le vieillissement cellulaire et la fonction des CD4<sup>+</sup>. En effet, l'augmentation de l'activité de

mTORC2 dans ces cellules a provoqué une accélération du vieillissement cellulaire associée à une réduction de leurs fonctions (335).

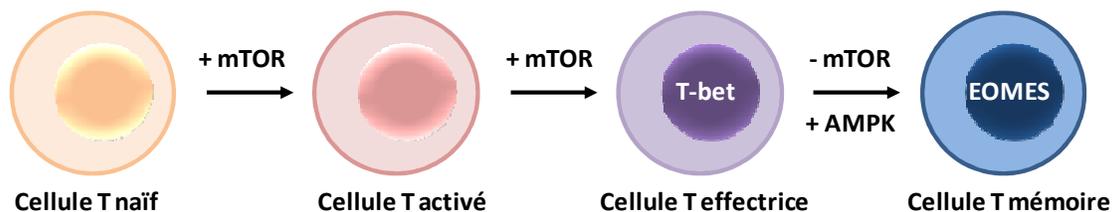


Figure 28. Rôle du complexe mTOR dans le développement des lymphocytes T CD8 mémoires.

### V.3.1f Le rôle de mTOR dans les T régulateurs CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>

Différentes études ont montré que les Tregs possèdent une activité mTOR plus importante que celle des LcT conventionnels, ce qui suggère que mTOR joue un rôle important dans la fonction de ces cellules régulatrices (336, 337). Des études récentes ont montré qu'une inhibition simultanée des deux complexes mTOR est nécessaire pour induire l'activation des Tregs FoxP3<sup>+</sup> (326). Le fait que la rapamycin favorise le développement des LcT régulateurs explique en partie ses propriétés immunorégulatrices (338, 339). De manière intéressante, une déplétion en acides aminés conduisant à une diminution de l'activité de mTOR induit une augmentation de l'expression de FoxP3 (340-342). De plus, Zeng et Coll ont montré que mTORC1 est impliqué dans la régulation de la fonction des Tregs et relie les signaux provenant de l'activation du TCR aux voies lipogéniques, montrant ainsi l'importance des voies métaboliques et leurs implications dans la régulation de la fonction immuno-suppressive des Tregs (343). Cependant, des études plus approfondies sont nécessaires afin de mieux appréhender la complexité du rôle de mTOR dans la génération et le maintien des Tregs.

### V.3.1g Le rôle de mTOR dans les lymphocytes B

La voie de signalisation PI3K-mTOR est nécessaire pour le développement, l'homéostasie et la fonction des LcB. Dans un modèle de souris ayant une perturbation partielle de l'expression du gène codant mTOR, il est observé une réduction du développement et une diminution de la prolifération cellulaire des LcB (344). De plus, une activation constitutive de mTOR conduit à une réduction significative du développement et de la maturation des LcB. Ces effets obtenus ont été partiellement restaurés après un traitement à la rapamycine et peuvent être expliqués par la contribution de chaque complexe de mTOR (345).

Après une stimulation du BCR par son antigène, l'activité de mTOR est augmentée. Cependant, une faible exposition aux antigènes active faiblement ce complexe protéique (346, 347). Ces observations suggèrent que mTOR est impliqué dans l'intégration des signaux nécessaires au fonctionnement des LcB et ceci, en fonction de l'intensité du signal ou du stimulus. De plus, des études ont montré des effets inhibiteurs de la rapamycine sur la prolifération et la différenciation des LcB stimulés avec du LPS (346, 348). Enfin, Goldfinger et Coll. ont montré que mTOR régule la synthèse protéique des immunoglobulines par les cellules B, ceci grâce à une interaction entre le complexe mTOR et le stress du réticulum endoplasmique (349). L'ensemble de ces observations montre le rôle crucial de mTOR dans le développement, la différenciation et la fonction des cellules B.

#### V.4 Les inhibiteurs de mTOR : la rapamycine

mTORC1 et mTORC2 sont deux complexes protéiques dont les activités peuvent être modulées par des molécules appelées « rapalogs » comme la rapamycine, ou par des inhibiteurs de l'activité kinase de ces deux complexes comme Torin1 et 2 (**Table 2**, (350)).

Examples of mTOR inhibitors	
Type	Drug
Rapalog	Rapamycin/sirolimus Everolimus
mTOR kinase inhibitors	Torin 1 Torin 2 PP30 PP242 OSI-027 AZD8055 KU-0063794 WYE-125132
Dual mTOR/PI3K	NVP-BEZ235 NVP-BBD130 XL765 Wortmannin

**Table 2.** Un exemple de molécules inhibant les deux complexes mTOR (350).

La rapamycine est une molécule produite par la bactérie *Streptomyces Hygroscopicus*. Chez les mammifères, il a été montré que la rapamycine exerce une activité immunosuppressive et, de ce fait, la rapamycine est utilisée comme molécule thérapeutique pour empêcher le rejet de greffe chez les patients transplantés. De plus comme nous l'avons largement exposé dans les paragraphes précédants, la rapamycine possède des propriétés antiprolifératives incitant ainsi les cliniciens à l'utiliser dans des protocoles anti-cancéreux.

D'un point de vue mécanistique, la rapamycine inhibe mTOR en se fixant sur la protéine cytosolique FKBP12 (*FK-binding protein 12*) qui est nécessaire pour la régulation du complexe mTOR. La formation du complexe rapamycine-FKBP12 empêche la protéine FKBP12 de se lier à mTOR et conduit ainsi à l'inhibition de l'activité kinase du complexe mTORC1 sans altérer l'activité du complexe mTORC2. Ainsi que nous l'avons déjà évoqué, les deux complexes mTOR ne possèdent pas la même sensibilité à la rapamycine : mTORC1 est très sensible et peut être inhibé avec des doses faibles à courte ou longue durée de traitement et mTORC2 est beaucoup moins sensible. Cependant, mTORC2 peut être également inhibé par la drogue dans certaines conditions de traitement et certains types cellulaires. L'inhibition de mTORC2 est provoquée par un traitement à forte dose et à long terme par la drogue. En revanche, les mécanismes d'inhibition de mTORC2 par la rapamycine ne sont pas encore connus. Certains auteurs suggèrent que la rapamycine pourrait empêcher l'assemblage du complexe mTORC2 à long terme, ce qui conduit à sa perte de fonction dans la cellule.

La rapamycine est un agent immuno-suppresseur approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA ou *food and drug administration*) pour une utilisation contre les rejets de greffes, certains types de cancer (cancer rénal) et certaines pathologies autoimmunes. En dépit des effets bénéfiques de la rapamycine dans ces conditions pathologiques, la drogue présente également certains effets secondaires, notamment métaboliques et inflammatoires. En effet, les patients traités par la rapamycine peuvent présenter certains inflammatoires comme des pneumonies (351, 352), des angioedemes (353), des stomatites (354) et une anémie corrélée à un état inflammatoire (355). Récemment, ces symptômes ont peu être expliqués en partie par la dérégulation de la balance des cytokines inflammatoires (356). De plus, la rapamycine entraîne dans certains cas des perturbations métaboliques comme une hyperlipidémie, une intolérance au glucose, une réduction de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de l'incidence du diabète post-transplantation (NODAT ou *new-onset diabetes after transplantation*) (357).

# **Introduction des travaux de thèse**

## Introduction des travaux de thèse

---

L'obésité est caractérisée par le développement d'une inflammation chronique dite « à bas bruit » initiée au sein du tissu adipeux blanc. Parmi les événements cellulaires et moléculaires dérégulés décrits dans la littérature et qui expliquent les mécanismes de l'installation de l'inflammation métabolique figurent les études étudiant l'accumulation séquentielle des cellules immunes et la provocation de plusieurs facteurs de stress au niveau tissulaire comme l'hypoxie et le stress du réticulum endoplasmique. Cette inflammation est délétère pour l'organisme et conduit à des perturbations métaboliques graves comme le développement d'une résistance à l'insuline. De ce fait, des stratégies thérapeutiques basées sur le principe de l'atténuation de l'inflammation, comme l'utilisation des anti-corps anti-TNF $\alpha$  (358) anti-IL-6 (359) et anti-IL-1 $\beta$  (360), ont été développées dans le but de limiter le développement de l'obésité et résoudre les désordres métaboliques associés, notamment la résistance à l'insuline. Cependant, d'autres événements cellulaires et moléculaires sont dérégulés durant l'obésité et peuvent être des cibles thérapeutiques potentielles, comme la sur-activation de la voie mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) qui peut être modulée par la rapamycine et la dysbiose observée au niveau de la composition du microbiote intestinal, cette dernière pouvant être modulée par l'administration des probiotiques.

Durant mes travaux de thèse, j'ai étudié les effets de deux stratégies d'immuno-modulation et leurs impacts sur l'homéostasie énergétique et la composition en cellules immunes dans les tissus métaboliques, notamment le tissu adipeux blanc. En effet, mon projet principal a consisté à étudier les effets de la rapamycine sur la composition en cellules immunes qui composent le tissu adipeux blanc et sur l'homéostasie énergétique des souris (**Article 1**). Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de la rapamycine sur l'évolution du poids corporel et de la prise alimentaire. Par la suite nous avons étudié les effets de la rapamycine sur les paramètres métaboliques des animaux comme la dépense énergétique, l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. Puisque l'inflammation à bas bruit est initiée au sein du tissu adipeux blanc et impacte sur l'homéostasie énergétique de l'organisme, nous avons regardé la modulation de la composition en cellules immunes dans les tissus métaboliques et le profil d'expression des adipokines pro- et anti-inflammatoires dans le but de l'associer au phénotype métabolique observé. Nous avons montré des effets immuno-modulateurs de cette drogue sur la composition de cellules immunes dans les tissus métaboliques (une

augmentation du nombre des cellules régulatrices (Tregs et MDSCs)), notamment le tissu adipeux blanc et qui semblent être associés au changement métabolique comme l'augmentation de la dépense énergétique et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des animaux. Cette étude nous a permis de mieux comprendre les effets à long terme de la rapamycine et de son impact sur le métabolisme des animaux.

En parallèle, j'ai participé au développement d'une étude qui a évalué les propriétés anti-obésogène et anti-inflammatoires de certaines souches de probiotiques sur le développement de l'obésité et la résolution des complications métaboliques associées (**Article 2**). Nous avons évalué dans un premier temps les effets de différentes souches : *Lactobacillus salivarius* 33 (Ls33) et une combinaison de souches (Mix : *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21690 et *Bifidobacterium animalis subsp lactis* LMG 23512 (ratio 1:1)) sur l'évolution du poids corporel et de la prise alimentaire dans le but de voir si les effets bénéfiques des probiotiques sur le développement de l'obésité sont spécifiques de la souche administrée. Nous avons observé un effet significatif sur le poids corporel et la prise alimentaire en utilisant le Mix avec une absence des effets avec le Ls33. Par la suite nous avons évalué les effets du Mix sur les paramètres métaboliques des animaux (test de tolérance au glucose et de tolérance à l'insuline). Nous avons dosés les hormones et cytokines sériques pour voir si l'administration du Mix a normalisé la dérégulation des paramètres plasmatiques provoquée par l'obésité. Nous avons analysé par des approches histologiques et d'expression génique par PCR quantitative l'impact du Mix sur : 1) le développement du tissu adipeux blanc, notamment l'épididymal qui a été affecté positivement (diminution de l'expression des gènes de l'adipogenèse). 2) la composition en cellules immunes (diminution de l'accumulation des macrophages associée à une diminution de l'expression des adipokines pro-inflammatoires). Enfin, nous avons procédé à une analyse de la composition du microbiote intestinal et nous avons montré que les effets observés sur l'évolution du poids corporel, le changement de la composition du tissu adipeux blanc et l'homéostasie énergétique des animaux sont associés à une modulation de la composition du microbiote intestinal.

*Article 1*

**Beneficial Metabolic Effects of Rapamycin are Associated with Enhanced  
Regulatory Cells in Diet-Induced Obese C57BL/6 Mice**



## **Objectifs de l'étude 1**

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer les effets de la rapamycine sur l'homéostasie métabolique et la réponse inflammatoire en employant un protocole d'administration. Nous avons réalisés des injections hebdomadaires de rapamycine (2mg/kg/semaine) chez des souris obèses pendant 22 semaines. Le but de l'étude était de mieux comprendre les effets métaboliques à long terme de la rapamycine et de les corrélérer aux effets immuno-modulateurs de la rapamycine sur la composition cellulaire immune des tissus métaboliques (notamment dans le tissu adipeux blanc).

## **Beneficial Metabolic Effects of Rapamycin are Associated with Enhanced Regulatory Cells in Diet-Induced Obese Mice**

Kassem Makki,<sup>1,2,3</sup> Solenne Taront,<sup>1,2,3</sup> Olivier Molendi-Coste,<sup>2,3,4</sup> Emmanuel Bouchaert,<sup>2,3,4</sup> Bernadette Neve,<sup>1,2,3</sup> Elodie Eury,<sup>1,2,3</sup> Stéphane Lobbens,<sup>1,2,3</sup> Myriam Labalette,<sup>2,5</sup> Hélène Duez,<sup>2,3,4</sup> Bart Staels,<sup>2,3,4</sup> David Dombrowicz,<sup>2,3,4</sup> Philippe Froguel,<sup>1,2,3,6,\*</sup> and Isabelle Wolowczuk<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8199, Lille Pasteur Institute, 59019, Lille, France

<sup>2</sup>Lille 2 University, 59800, Lille, France

<sup>3</sup>European Genomic Institute for Diabetes (EGID), 59037, Lille, France

<sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR1011, Lille Pasteur Institute, 59019, Lille, France

<sup>5</sup>Immunology Institute, CHRU Lille and EA2686 Lille 2 University, 59037, Lille, France

<sup>6</sup>Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, UK

\* Corresponding authors: Isabelle Wolowczuk ([isabelle.wolowczuk@good.ibl.fr](mailto:isabelle.wolowczuk@good.ibl.fr)) and Philippe Froguel ([P.froguel@imperial.ac.uk](mailto:P.froguel@imperial.ac.uk)), CNRS UMR8199, Lille Pasteur Institute, 59019, Lille, France

Running head: Rapamycin metabolic and immune effects in obesity

Nonstandard abbreviations: BAT: Brown adipose tissue; CD: Cluster of differentiation; Cpt1b: Carnitine palmitoyltransferase 1B; HFD: High-fat diet; IRS: Insulin receptor substrate; Ly6C/6G: Lymphocyte antigen 6 complex, locus C/G; G-MDSC: Granulocytic myeloid-derived suppressor cells; M-MDSC: Monocytic myeloid-derived suppressor cells; mTOR(C): Mechanistic target of rapamycin (complex); NEFA: Non-esterified fatty acid; Pgc-1  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; Prdm16: PR domain containing 16; Rapa: Rapamycin; RQ: Respiratory quotient; Tregs: Regulatory T Cells; UCP: Uncoupling protein; VWAT: Visceral white adipose tissue.

- Total word counts (including all legends and references): 7,971

- 7 Figures, 0 Tables, 53 References

- Supplementary materials: 4 Supplementary Tables, 3 Supplementary Figures

## Abstract

The “mechanistic target of rapamycin” (mTOR) is a central controller of growth, proliferation and/or motility of various cell-types ranging from adipocytes to immune cells, thereby linking metabolism and immunity. mTOR signaling is overactivated in obesity, promoting inflammation and insulin resistance. Therefore, great interest exists in the development of mTOR inhibitors as therapeutic drugs for obesity or diabetes. However, despite a plethora of studies characterizing the metabolic consequences of mTOR inhibition in rodent models, its impact on immune changes associated with the obese condition has never been questioned so far. To address this, we used a mouse model of high-fat diet (HFD)-fed mice with and without pharmacologic mTOR inhibition by rapamycin. Rapamycin was weekly administrated to HFD-fed C57BL/6 mice for 22 weeks. Metabolic effects were determined by glucose and insulin tolerance tests and by indirect calorimetry measures of energy expenditure. Inflammatory response and immune cell populations were characterized in blood, adipose tissue and liver. In parallel, the activities of both mTOR complexes (*e. g.* mTORC1 and mTORC2) were determined in adipose tissue, muscle and liver.

We show that rapamycin-treated mice are leaner, have enhanced energy expenditure and are protected against insulin resistance. Systemic as well as adipose tissue inflammation were enhanced, while liver inflammation was reduced. Importantly, immune cells with regulatory functions such as regulatory T-cells (Tregs) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) were increased in adipose tissue. These rapamycin-triggered metabolic and immune effects resulted from mTORC1 inhibition whilst mTORC2 activity was intact.

Taken together, our results reinforce the notion that controlling immune regulatory cells in metabolic tissues is crucial to maintain a proper metabolic status and, more generally, comfort the need to search for novel pharmacological inhibitors of the mTOR signaling pathway to prevent and/or treat metabolic diseases.

## Introduction

Obesity is associated with profound immune dysfunctions [1-3] as well as with chronic, low-grade inflammation that predisposes to the development of systemic insulin resistance; thus connecting metabolism and immunity [4-7]. The expanding white adipose tissue (WAT) develops a chronic inflammatory response, largely resulting from increased macrophage infiltration combined with depletion of anti-inflammatory CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) [8, 9]. Beside Tregs, a group of immature myeloid cells characterized by the co-expression of the surface markers CD11b and Gr-1 (a composite epitope between the Ly6C and Ly6G antigens) was recently reported to counter inflammation during obesity [10]. These myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) consist of two major populations depending on Ly6C or Ly6G expression: granulocytic MDSCs (G-MDSCs), which are CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>med</sup>, and monocytic MDSCs (M-MDSCs) which are CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>low</sup> Ly6C<sup>hi</sup> [11, 12]. In obese mice, depletion of MDSCs using Gr1-specific antibody increases insulin resistance and glucose intolerance whilst adoptive transfer of MDSCs improves metabolic parameters [10]. Therefore, maintaining and/or increasing adipose regulatory cells is crucial for preserving the insulin sensitive status [10, 13, 14].

The mechanistic (formerly mammalian) target of rapamycin (mTOR) is a highly conserved serine-threonine kinase that regulates cell size, survival and proliferation in response to amino acids, growth factors, nutrients and cellular energy status [15]. mTOR exists in two distinct complexes that have different downstream targets and biological functions: mTOR complex-1 (mTORC1 or Raptor) and mTOR complex-2 (mTORC2 or Rictor) [16]. mTORC1 and mTORC2 also differ regarding their sensitivity to rapamycin. mTORC1 is highly sensitive to the drug whilst only daily and chronic exposure to rapamycin can inhibit mTORC2 activity [17, 18].

During obesity-related WAT expansion and immune cell recruitment, the mTOR signaling pathway is constitutively activated, increasing insulin resistance [19, 20]. Conditional knockout of mTOR in the mouse model revealed its role in key functions of several metabolic tissues such as glycogen synthesis in muscle [21], ketogenesis and lipogenesis in the liver [22, 23] and adipogenesis in the adipose tissue [24, 25].

Recent studies revealed that mTOR is also a central regulator of innate and adaptive immune responses. Specifically, mTOR controls the differentiation, activation and function of

monocytes and macrophages as well as of B cells and CD4 and CD8 T cells [26, 27]. Furthermore, mTOR inhibition promotes the generation of Tregs both *in vitro* and *in vivo* [28, 29].

In obese animal models, treatment by rapamycin reduces adipose tissue mass, suggesting that rapamycin might be used for the treatment of obesity. However, how rapamycin impacts on energy homeostasis is still an open question since, depending on experimental models (rat, mouse) or procedures (dose, route and frequency of rapamycin administration), either protective or detrimental effects were observed [30-34]. In addition, despite the potent immunoregulatory properties of rapamycin [35], the immunological changes associated with its administration to obese mice have never been investigated so far.

In the current study, we assessed the metabolic and immunologic consequences of weekly administration of rapamycin (2mg/kg) to HFD-fed C57BL/6 mice for a period of 22 weeks. We show that, while increasing systemic and adipose inflammation, rapamycin treatment alleviates liver inflammation and ameliorates the general metabolic status of obese mice. The beneficial metabolic effects of rapamycin were associated with a remodeling of adipose tissue and liver cellular composition with increased numbers of regulatory cells such as Tregs and MDSCs. At the molecular level, rapamycin treatment inhibited mTORC1 activity whilst that of mTORC2 was likely not affected. Although mechanisms through which rapamycin impacts on regulatory cells is still elusive, the present study however extends the concept that targeting the mTOR signaling pathway deserves interest in the treatment of metabolic diseases.

## Materials and Methods

### Animals and Ethics Statement

C57BL/6JRj mice were obtained from Janvier Laboratory (Le Genest-St-Isle, France) and housed in specific pathogen-free environment in Lille Pasteur Institute's animal facilities. Animals were maintained in a temperature-controlled ( $20 \pm 2$  °C) facility room with a strict daily cycle of 12 hours light and darkness. Mice were given free access to food and water, unless stated. Housing and experimentations were carried out according to the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication n° 85-23, revised 1985) as well as to the French and European guidelines of laboratory animal care (European Communities Council Directive of 1986, 86/609/EEC) and approved by the Departmental Direction of Veterinary Services (Prefecture of Lille, France; authorization number: 59-350152).

### Diet and Drug Treatment

Six-week-old mice (n=20) were fed *ad libitum* with a high-fat diet (HFD; D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) containing 60 kcal% fat. After 5 weeks of diets, mice were randomly divided into 2 groups. One group of mice was intraperitoneally (i.p.) injected with rapamycin (Rapa; 2 mg/kg body weight; LC Laboratories, Woburn, MA, USA) once a week for 22 weeks. The second sub-group received the corresponding volume of a vehicle (Ve; sterile 10% PEG400 / 8% ethanol, followed by an equal volume of sterile 10% Tween 80) as described in [31].

### Metabolic Phenotyping

*Body weight and food intake* were measured weekly. Food consumption was estimated by subtracting the amount of remaining food from that of food supplied. Spilled food pellets were carefully collected to ensure the accuracy of food intake measurements.

For *indirect calorimetry*, animals were housed individually in metabolic cages (Oxylet, Panlab, Barcelona, Spain) for 48h to measure O<sub>2</sub> consumption (V<sub>O<sub>2</sub></sub>) and CO<sub>2</sub> production (V<sub>CO<sub>2</sub></sub>). Energy expenditure was calculated as described [36].

*Basal core body temperature* was determined using a Thermalert temperature monitor (Physitemp, Clifton, NJ, USA).

For *glucose tolerance tests (GTT)*, animals were fasted for 6 hours before being i.p. injected with D-glucose (1 g/kg body weight; Sigma-Aldrich, Lyon, France). Glucose levels were

measured by tail-tip bleeding with an automatic glucometer (ACCU-CHEK Performa, Roche, Mannheim, Germany) before injection and 15, 30, 60 and 180 minutes after glucose administration.

For *insulin tolerance tests* (ITT), animals were fasted for 6 hours before being i.p. injected with insulin (0.75 IU/kg body weight; Sigma-Aldrich). Blood glucose levels were measured before and 15, 30, 45, 60 and 75 minutes after insulin injection.

*Quantification of ketone bodies, adiponectin, leptin and insulin blood levels at sacrifice.*

Ketone bodies levels were determined in the sera of 12-hours fasted mice using beta Hydroxybutyrate (beta HB) Assay Kit (ab83390, Cambridge, UK). Adiponectin, leptin and insulin levels were measured in the sera of 6-hours fasted mice using specific ELISA kits (respectively; Quantikine Mouse Adiponectin/Acrp30 and Quantikine Mouse Leptin (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA (Merckodia, Uppsala, SWE).

### **Immunologic Phenotyping**

*Preparation of blood and stromal vascular fraction (SVF) cells.*

Blood was collected on EDTA (0.5M). After erythrocyte lysis, aliquots of  $10^6$  cells were put into 96-well microtiter plates for staining (see below).

Visceral WAT was harvested, minced and incubated for 1 hour at 37°C in digestion medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F-12; GIBCO, Life Technologies; Saint Aubin, France) supplemented with BSA (1%; Sigma-Aldrich), Gentamycin (1%; GIBCO; Life Technologies) and type I collagenase (1.5 mg/ml; Sigma-Aldrich). Cells from the stromal vascular fraction (SVF) were then collected after centrifugation for 15 min at 250 g. After erythrocyte lysis and successive filtration through 250 and 40  $\mu\text{m}$  sieves, SVF cells were resuspended in PBS containing 1% BSA and aliquots of  $10^6$  cells were put into 96-well microtiter plates.

*Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) on blood and SVF cells*

Cells were pre-incubated (20 minutes on ice) with purified 2.4G2 monoclonal antibody in order to block Fc receptors (1:50, BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Cells were then incubated (45 minutes on ice) with primary antibodies (listed in Supplementary Table I) before being resuspended in PBS containing 0.5% BSA. Acquisition was made on  $5 \times 10^5$  cells using a FACS LSR Fortessa (BD Biosciences). Data were analyzed using the FlowJo 765 (Tree Star Inc.; Ashland, OR, USA).

*Measurement of cytokine levels in adipose tissue explants and blood.*

For quantification of cytokines secreted by the visceral adipose tissue, tissue explants were cultured for 24 hours in DMEM without serum and supplemented with 1% of penicillin and streptomycin (50 U/ml, GIBCO, Life Technologies). Supernatants were harvested to quantify inflammatory cytokines (IL-6, MCP-1, TNF $\alpha$  and IL-10) using specific ELISA kits (R&D Systems). Blood IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and IL-10 levels were quantified using specific ELISA kits (R&D Systems).

## **Gene Expression Analysis**

### *RNA Extraction and Quality Assessment*

Total RNA from liver, white and brown adipose tissue (WAT and BAT, respectively) was extracted using the Qiagen RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). RNAs were quantified and assessed for purity using a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Integrity was verified with a BioAnalyser 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

### *Microarray and Clustering Analysis*

RNAs (140 ng) from pooled samples (n=5/group) was amplified and cRNA was labeled with biotin using the TargetAmp<sup>TM</sup> Biotin-aRNA Labeling Kit (Illumina, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). Biotin-labeled cRNA (1,500 ng) was hybridized to the Sentrix BeadChip Array for Gene Expression Mouse WG-6 V2 (Illumina) and incubated at 58°C for 16-20 hours in a hybridization oven (Illumina) with rocker speed at 5.

Beadchips were washed and stained according to manufacturer's protocol. Arrays were scanned by chip scanner Bead Array (Illumina), and images analyzed by Genome Studio (Illumina). Data were exported and processed using Genespring GX 11.5.1 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Data from HFD-Ve and HFD-Rapa mice were compared to data obtained from regular chow-fed mice. Genes that were differentially regulated in the experimental groups were identified using the *p*-value cut-off of 0.05. These genes were further analyzed using the Ingenuity Pathway software (Ingenuity, Redwood City, CA, USA).

### *Quantitative PCR*

RNAs (400 ng) were reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcript Kit from Applied Biosystems<sup>TM</sup> (Foster City, CA, USA). Real-time (RT) quantitative PCR was performed on the ABI-7900HT Fast RT PCR system using SYBR green chemistry (Applied Biosystems<sup>TM</sup>). Primer sequences are available upon request. EeF2 was used as an internal control to normalize gene expression using the 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> method [37].

## **Adipose Tissue Analysis**

### *Histology and Morphometric Analysis*

Liver, visceral white (VWAT) and BAT samples were overnight fixed in 4% paraformaldehyde before embedding in paraffin. Multiple sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin. For the morphometric analysis, at least 10 fields (representing approximately 100 adipocytes) per slide were analyzed. Images were acquired using an optical microscope (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Göttingen, Germany) and analyzed using the Image J software.

### *Immunohistochemical staining*

VWAT tissue sections (5 mice per group) were stained with mAb anti-F4/80 (1:500, eBioscience, San Diego, CA, USA). Staining was visualized using the Image J software. The specificity of the staining was verified by replacing each primary antibody by nonspecific IgG (Rat IgG1 $\kappa$  isotype Control (eBRG1) eBiosciences).

## **Protein Expression Analysis**

Frozen WAT, liver and muscle samples were homogenized in lysis buffer. After centrifugation of the lysates, protein concentration was estimated in the supernatant using a Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Total proteins (40  $\mu$ g) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel (Nu-PAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then transferred to Immobilon-P Polyvinylidene fluoride membranes (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked with 5% BSA in PBS 1X Tween 0.1% for one hour before being probed overnight at 4°C with specific primary antibodies (listed in Supplementary Table II). After washing, Ab binding was revealed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (2 hours incubation at room temperature, anti-Rabbit IgG HRP-linked antibody, 1:5000, #7074, Cell Signaling) and ECL (ECL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Detection System, Amersham, Buckinghamshire, UK). Signals were quantified using the ImageJ software.

## **Statistics**

Data are presented as means  $\pm$  SEM except when mentioned. The statistical significance of comparison between the different experimental groups was determined using the non-parametric Mann-Whitney U test. *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Rapamycin reduced body weight gain and increased thermogenesis

After a 5-week period of high-fat diet feeding (HFD; 60% fat), mice were injected weekly (2mg/kg/week) for 22 weeks with rapamycin (Rapa) or vehicle (Ve). Figure 1A shows that HFD-fed mice injected with rapamycin gained less weight than Ve mice. Consistent with body weight data, Rapa mice showed a significant reduction of visceral white adipose tissue (VWAT) mass, compared to controls (Figure 1B). The lower leptin and adiponectin blood levels in rapamycin-treated mice were concordant with reduced fat mass (Supplementary Figure 1A).

Despite reducing body weight gain, rapamycin treatment did not affect food intake (Figure 1C), suggesting that increased energy expenditure might be the underlying cause of resistance to HFD in rapamycin-treated mice. To explore this, we housed mice from each group in metabolic cages in order to measure oxygen consumption ( $V_{O_2}$ ), carbon dioxide production ( $V_{CO_2}$ ), and locomotor activity. We observed no consistent differences neither in respiratory quotient (RQ; an indirect indicator of lipid vs. carbohydrate utilization) nor in locomotor activity (Supplementary Figures 1B and 1C). In contrast, Rapa mice consumed more oxygen than controls (Figure 1D) and showed higher energy expenditure (Figure 1E). Consistently, basal core body temperature and serum ketone bodies levels were higher in Rapa mice when compared to controls (Figures 1F and 1G). Strikingly, mass of the brown adipose tissue (BAT; the major site of thermoregulation) was lower in Rapa mice (Figure 1B) and its histological analysis revealed less lipid accumulation (Figure 1H), suggesting that rapamycin treatment has increased thermogenesis. This was comforted by significant increased expression of genes involved in BAT function, namely uncoupling protein-1 (*Ucp-1*), carnitine palmitoyltransferase 1B (*Cpt1b*), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (*Pgc-1 $\alpha$* ) and PR domain containing 16 (*Prdm16*), whereas *Ucp-2* and *Ucp-3* expression levels were comparable in both groups (Figure 1I).

### Rapamycin increased macrophage recruitment in the adipose tissue

Histological examination of VWAT sections showed a greater cell-size heterogeneity (Figure 2A) confirmed by morphometric analysis ( $50.2 \pm 0.6$  % adipocytes with a diameter  $<60$   $\mu$ m in VWAT of Ve mice vs.  $74.9 \pm 2.2$  % in VWAT of Rapa mice;  $p < 0.001$ ). Strikingly, Rapa-

treated mice VWAT was markedly infiltrated with cells, mostly located around the smallest adipocytes (Figure 2A).

To investigate the nature of the cells infiltrating the VWAT of rapamycin-treated mice, we performed real-time quantitative PCR to compare the expression levels of genes specific for several immune cell-types known to invade the expanding adipose tissue (Figure 2B). While expression of *Cd3* (T lymphocytes) and *Cd20* (B lymphocytes) transcripts did not discriminate between rapamycin-treated and control mice, expression level of *Cd8* (cytotoxic T cells) transcript was significantly higher in VWAT from rapamycin-treated mice. In parallel, rapamycin significantly decreased the expression level of *Cd4* (T helper cells) while it increased that of *FoxP3* (Tregs), *Cd68* and *F4/80* (monocytes/macrophages) markers. The higher expression of the *Icam-1* and *Mcp-1*, two factors involved in leukocyte migration to inflamed tissues, indicated that rapamycin impacts on immune cell recruitment to VWAT [38, 39].

Immunohistochemistry analysis on VWAT sections revealed increased macrophage recruitment (Figure 2C). F4/80-positive cells (visualized by brown color) were organized as crown-like structures and the surface occupied was 3-fold increased upon rapamycin treatment ( $p<0.01$ ) (Figure 2D).

### **Rapamycin impact on inflammation differs between tissues**

To assess the inflammatory status of the adipose tissue, we first performed microarray gene expression analysis in VWAT. Compared to gene expression in the VWAT of mice fed with regular chow, 2,432 genes were deregulated by HFD (Ve group) and this number was increased by ~1.5-fold (*i.e.* 4,182 genes) upon rapamycin injection (Rapa group), as represented by Figure 3A. Genes specifically deregulated in the VWAT of Rapa mice (2,141 genes;  $p<0.01$ ) were included in Ingenuity Pathway Analysis (IPA) for pathway identification. As shown by Figure 3B, the most significant deregulated pathways are related to inflammatory response, cellular movement and immune cell trafficking. Furthermore, pathways related to inflammatory response and immune cell trafficking were predicted to be upregulated in the VWAT of rapamycin-treated mice (Figure 3C and Supplementary Table III). In contrast, pathways related to lipid or carbohydrate metabolism were predicted to be under-expressed (Figure 3C).

Then, we assessed the expression levels of pro-inflammatory cytokines (*e.g.* *Il-1* , *Il-1* , *Il-6* and *Tnfa*) and anti-inflammatory cytokines (*e.g.* *Il-4* and *Il-10*) transcripts in the VWAT.

Figure 3D shows that rapamycin had no discernible effect on the expression of *Tnf $\alpha$* , *Il-4* and *Il-10*, yet it markedly enhanced the expression of *Il-6* (3-fold increase), *Il-1* and *Il-1 $\beta$*  (2-fold increase). The expression data were further supported by protein secretion analysis from VWAT explants which showed that adipose tissue samples from rapamycin-treated mice secreted more IL-6 and MCP-1 than control explants whereas the amount of TNF $\alpha$  and IL-10 was comparable (Figure 3E).

Adipose tissue inflammation was associated with systemic inflammation, as revealed by higher blood levels of IL-6 and TNF $\alpha$  and decreased level of IL-10 in Rapa mice, compared to controls (Figure 3F). In the liver however, rapamycin treatment significantly decreased the expression of *Il-1* (1.5-fold), *Il-1* (3-fold) and *Tnf* (2-fold) transcripts whilst that of *Il-10* tended to increase, almost reaching statistical significance ( $p=0.053$ ) and that of *Il-4* increased by 9-fold (Figure 3G).

### **Rapamycin increased insulin sensitivity**

We then assessed whether the increased inflammatory profile of rapamycin-treated mice impacts on lipid and glucose homeostasis. Rapamycin slightly decreased fasting triglyceride levels in the blood of rapamycin-treated mice but had no effect on glycerol and non-esterified fatty acid (NEFA) blood levels (Supplementary Table IV).

We next examined the effects of rapamycin upon fasting glucose and glucose tolerance after glucose administration in mice. As shown in Figure 4, rapamycin had no effect on basal fasting glucose yet it decreased fasting insulin (Figures 4A and 4B). Although rapamycin treatment did not improve glucose intolerance (Figure 4C), homeostatic model for assessment of insulin resistance (HOMA-IR) values derived from both insulin and glucose levels were significantly reduced (Figure 4D), indicating higher insulin sensitivity which was confirmed by an insulin tolerance test (Figure 4E). These findings indicate that upon rapamycin treatment, HFD-fed mice progressed from being insulin resistant to have improved insulin sensitivity, as demonstrated by the decreased S612 phosphorylation of IRS-1 (insulin receptor substrate-1) in insulin sensitive tissues (*e.g.* adipose tissue, muscle and liver) (Figure 4F).

### **Rapamycin impact on immune regulatory cells in blood, adipose tissue and liver**

Despite elevated systemic and VWAT inflammation, HFD-fed rapamycin-treated mice developed less insulin resistance than HFD-Ve mice. Therefore, we investigated whether rapamycin might have promoted the accumulation of immuno-suppressive, anti-inflammatory regulatory cells in blood, adipose tissue and liver.

In blood, the percentage of CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) was significantly reduced in the group of rapamycin-treated animals (Figure 5A). In opposite, the percentage of total MDSCs was enhanced. Furthermore, within MDSCs the proportion of G-MDSCs increased while that of M-MDSCs decreased (Figure 5B). Of note, no significant changes were noticed in the percentage of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T -cells or B -cells between groups (Supplementary Figures 2A, 2B and 2C).

In the adipose stromal vascular fraction, rapamycin significantly decreased by 2-fold the percentage of CD4<sup>+</sup> T -cells yet absolute numbers normalized to fat pad weight were comparable between Rapa and Ve mice (Figure 6A). However, in contrast to blood, in adipose tissue rapamycin increased by 2-fold the percentage of CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. This enhancing effect of rapamycin on Tregs was even more pronounced after normalization to fat pad mass (Figure 6B). Regarding cells of myeloid origin, we found that the percentage of CD11b<sup>+</sup> cells was slightly higher, this increase being more pronounced after normalization to fat mass weight (Figure 6C). Among CD11b<sup>+</sup> cells, the number of F4/80<sup>+</sup> cells was significantly increased in rapamycin-treated mice cells when normalized to fat mass (Figure 6D), supporting our immunohistochemical observation (Figures 2C and 2D).

When assessing for MDSC we showed that, in adipose tissue, rapamycin increased by 2-fold the percentage of G-MDSC (Figure 6E), as well as found in blood, whereas the percentage of M-MDSCs was decreased yet their absolute numbers remained unchanged (Figure 6F).

Importantly, the positive impact of rapamycin on G-MDSCs was also observed in the liver (Figure 6G).

### **Effect of rapamycin on mTORC1 and mTORC2 activities in adipose tissue, muscle and liver**

To better define the respective actions of mTORC1 and mTORC2 on the observed effects, it was crucial to determine whether and how our protocol affected rapamycin levels and inhibited mTOR complexes. Quantification of rapamycin blood levels showed that between each injection, rapamycin returns to basal levels signifying that drug accumulation does not occur (Figure 7A). Moreover, a biochemical analysis of VWAT, muscle and liver showed that the rapamycin injection regimen decreased phosphorylation of S6K1 at T389 (direct downstream target of mTORC1) thus indicating that mTORC1 is inhibited. However, rapamycin treatment did not affect AKT phosphorylation at S473 (a down-stream target of mTORC2), which may indicate that mTORC2 activity is conserved [40] (Figure 7B).

## Discussion

Rapamycin, an immuno-suppressive drug that prevents organ transplant rejection, is a potent inhibitor of the mTOR pathway. Many studies have demonstrated the effect of rapamycin on metabolism in lean and obese rodents. In contrast, no study has yet addressed whether rapamycin metabolic effects are associated with its immunoregulatory properties. Here we showed beneficial metabolic effects of chronic rapamycin administration to HFD-fed mice that are associated with increased levels of Tregs and MDSCs in metabolic tissues. Furthermore, we suggest that these metabolic and immunological features are primarily due to rapamycin actions on mTORC1.

Compared to controls, rapamycin-treated mice were leaner with enhanced insulin sensitivity, increased oxygen consumption and ketogenesis. However, rapamycin-treated HFD-fed mice showed increased glucose intolerance due to lower basal insulin levels, decreased expression levels of GLUT4 in the adipose tissue and, in the liver, decreased lipogenesis and increased gluconeogenesis (Supplementary Figures 1D and 3).

Inhibition of mTORC1 underlies most, yet not all, of these beneficial metabolic effects. Indeed, mTORC1 exerts a positive role in adipogenesis [15, 24] and we accordingly showed decreased expression of pro-adipogenic factors in the adipose tissue of rapamycin-treated animals (Supplementary Figure 1D). Increased thermogenesis may also result from mTORC1 inhibition since adipose tissue conditional knockout of this complex results in lean mice with increased energy expenditure; phenocopying our rapamycin-treated animals [24]. Furthermore, the increased thermogenesis of rapamycin-treated mice likely resulted from enhanced BAT activity and not from higher muscle thermogenesis. Indeed, we showed altered BAT histology and gene expression pattern in rapamycin-treated mice and it has been reported that mTORC1 inhibition in muscle reduces mitochondrial biogenesis [41, 42].

Inhibition of mTORC1 partly explains the insulin sensitive state of rapamycin-treated mice, both through abrogating IRS-1 degradation and through affecting pancreatic  $\beta$ -cell insulin secretion [15]. However, mTORC2 activity is crucial to maintain insulin sensitivity, as revealed by the insulin resistant state of mice in which mTORC2 is inhibited [43]. Thereby, mTORC2 is likely not affected in rapamycin-treated mice, as indicated by the conserved serine phosphorylation of AKT (a down-stream target of mTORC2). Nevertheless, assessing additional downstream targets of mTORC1 and mTORC2 pathways (such as, respectively,

4EBP1 and PKC $\alpha$  [15]) would reinforce the demonstration that rapamycin treatment inhibited mTORC1 and not mTORC2.

Strikingly, despite improved insulin sensitivity, systemic and adipose tissue inflammation were increased in rapamycin-treated mice. This uncoupling of inflammation and insulin resistance has been already reported [44-48]. For example, mice with elevated NF- $\kappa$ B activity in adipose tissue displayed increased WAT and systemic inflammation, increased energy expenditure and enhanced insulin sensitivity [49], as we observed in our model. Besides, we showed that inflammation was decreased in the liver – an insulin-sensitive tissue that plays the major role in whole body insulin sensitivity – with beneficial effect on hepatic insulin sensitivity, as supported by the decreased serine phosphorylation of IRS-1 (Figure 4F).

Interestingly, the beneficial metabolic effects of rapamycin were associated with immune changes. Indeed, rapamycin altered the immune cell composition of blood, adipose tissue and liver. The enhanced proportion of regulatory cells in the adipose tissue and liver of rapamycin-treated mice is also thought to participate to the beneficial effect of the drug on metabolic parameters. Obesity results in adipose-resident FoxP3<sup>+</sup> Treg depletion [14] and gain-of-function experiments to expand their numbers improved insulin sensitivity [14, 50]. mTOR has recently emerged as a critical regulator of Tregs, acting both on their *de novo* generation and on their selective expansion [26], depending on the modulation of mTOR complexes [28, 29]. Our results showed that rapamycin treatment promoted Tregs in the adipose tissue, the cells being recruited from the blood, a compartment where their number decreased.

Beside Tregs, MDSCs were lately reported to also provide a key check-and-balance platform to counter inflammation and insulin resistance in obesity. Indeed, down-regulation of MDSCs in obese animals leads to the deterioration of insulin sensitivity whereas elevation of these cells has the opposite effect [10]. Supporting this hypothesis, in rapamycin-treated mice we found an increased number of MDSCs in blood, liver and adipose tissue. However, whereas the immuno-suppressive functions of Tregs and MDSCs were conserved in metabolic tissues of rapamycin-treated mice remains to be determined. While the role of mTOR pathway in MDSCs is still unknown, rapamycin may have blunted Tregs, since mTORC1 was demonstrated to be crucial for their functionality *in vivo* [51]. Furthermore, in order to dissociate the effect of mTOR inhibition on insulin sensitivity from its impact on the recruitment of regulatory cells to metabolic tissues, selective depletions of either regulatory cell-types could be envisaged.

In conclusion, the present work assessed for the first time the metabolic and immune consequences of rapamycin administration to obese mice. It showed that rapamycin improved metabolic parameters partly through acting on regulatory immune cells; thereby revealing a novel aspect of the immunoregulatory properties of rapamycin. Several previous studies on the metabolic effect of chronic rapamycin injection were controversial depending on the animal model (rat *versus* mouse), animal strain, diet, and age as well as rapamycin dose, route and frequency of administration [33, 52, 53]. Here we show that our protocol, which can be qualified as “chronic intermittent”, has beneficial effects on energy homeostasis of mice as recently reported by Fang *et al.* who used another mouse strain in a context of standard diet, a condition in which mTOR is not over-activated as it is in obesity [32].

Even if mechanistic basis has to be defined, we propose however that the protective metabolic effect of rapamycin may partly rely on immune modifications induced by this immunoregulatory drug, such as the increase of regulatory cells. Our work underscores the interest of targeting the mTOR pathway for clinical applications in humans to limit deleterious metabolic side effects, perhaps through the development of novel mTOR inhibitors that selectively inhibit mTORC1.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique.

The authors acknowledge the staff of the animal facility of the Pasteur Institute in Lille for animal husbandry and care. We thank Dr. Morgane Baron (CNRS UMR8199) for manuscript reviewing and Dr. François Trottein (CNRS UMR8204, Inserm U1019, Lille Pasteur Institute) for fruitful discussions. We also thank Emeric Deruy and Antonino Bongiovanni (CNRS UMR8204, Inserm U1019, Lille Pasteur Institute) for flow cytometry and microscopy (Axioplan 2) facility and analysis.

KM was funded by a PhD fellowship from Lille 2 University.

## Figure Legends

### Figure 1. Body weight gain, feeding behavior and thermogenesis in rapamycin-treated mice.

(A) Time course of body weight gain (%) measured over rapamycin treatment. Mice were fed on HFD for 6 weeks before receiving rapamycin (Rapa: ●) or vehicle (Ve: ○) once a week for 22 weeks.

(B) Masses (g) of visceral white adipose tissue (VWAT), subcutaneous white adipose tissue (SCWAT), brown adipose tissue (BAT), liver and pancreas at 22 weeks (Rapa: ■, Ve: □).

(C) Cumulative food intake (g/day/mouse) (Rapa: ■, Ve: □).

(D) Oxygen consumption ( $Vo_2$ ) (ml/min/kg<sup>0.75</sup>) measured by indirect calorimetry over a 36-hour monitoring period (Rapa: ●, Ve: ○).

(E) Energy expenditure (kcal/day/Kg<sup>0.75</sup>) measured using indirect calorimetry over a 36-hour monitoring period (Rapa: ■, Ve: □).

(F) Core body temperature (°C) (Rapa: ■, Ve: □).

(G) Serum total ketone bodies (mmol/l) in 12-hours fasted mice (Rapa: ■, Ve: □).

(H) Representative sections of H&E-stained BAT of Ve- or Rapa-treated mice. Scale bars represent 50µm.

(I) Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of BAT, after 22 injections (Rapa: ■, Ve: □): Expression levels of *Ucp-1*, *Ucp-2*, *Ucp-3*, *Cpt1b*, *Pgc-1* and *Prdm16* (normalized to *Eef2* expression).

(A-I) Data are expressed as mean ± S.E.M. of 8 to 10 mice per group. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ .

### Figure 2. Rapamycin's impact on VWAT.

(A) Representative sections of H&E-stained VWAT of Ve- or Rapa-treated mice. Scale bars represent 100µm. Black arrows target to infiltrating cells.

(B) RT-qPCR analysis of VWAT, after 22 injections (Rapa: ■, Ve: □): Expression levels of T-cell (*Cd4*, *Cd8*, *FoxP3*), B-cell (*Cd20*) and macrophage (*Cd68*, *F4/80*) specific markers and of leukocyte migratory factors (*Icam-1*, *Mcp-1*) specific markers (normalized to *Eef2* expression). Data are expressed as mean ± S.E.M. of 8 to 10 mice per group. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ .

(C) Representative sections of the VWAT from Ve- or Rapa-treated mice immunostained with F4/80 Ab (brown color). Scale bars represent 100 $\mu$ m.

(D) F4/80 positive signal on VWAT sections was quantified by Image J (Rapa: ■, Ve: □). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 5 mice per group. <sup>##</sup> $p < 0.01$ .

### Figure 3. Tissue-specific effects of rapamycin on inflammation.

(A) Venn diagrams of microarray data representing the number of genes deregulated in the VWAT from Ve- or Rapa-treated mice (respectively; red and blue circle). Genes deregulated at least by 1.5-fold at  $p < 0.01$  were considered for pathway analysis.

(B) IPA analysis: Functional enrichment analysis showing the top 10 biological functions significantly deregulated in the VWAT of Rapa-treated mice compared to controls.

(C) Expression profiling of genes implicated in the top deregulated pathways: downregulated genes (green) versus upregulated genes (red).

(D) RT-qPCR analysis of VWAT, after 22 injections (Rapa: ■, Ve: □): Expression levels of inflammatory cytokines (*Il-1 $\alpha$* , *Il-1 $\beta$* , *Il-6* and *Tnf $\alpha$* ) and anti-inflammatory cytokines (*Il-4* and *Il-10*) (normalized to *Eef2* expression) (n=8 to 10 mice per group).

(E) IL-6, MCP-1, TNF- and IL-10 levels in supernatants of VWAT explants (Rapa: ■, Ve: □). ELISA values were normalized to the weight of VWAT explants and are expressed in ng/ml/g VWAT (n=5 mice per group).

(F) IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 levels in blood (Rapa: ■, Ve: □). ELISA values are in pg/ml (n=8 to 10 mice per group).

(G) RT-qPCR analysis of liver, after 22 injections (Rapa: ■, Ve: □): Expression levels of inflammatory cytokines (*Il-1 $\alpha$* , *Il-1 $\beta$* , *Il-6* and *Tnf $\alpha$* ) and anti-inflammatory cytokines (*Il-4* and *Il-10*) (normalized to *Eef2* expression) (n=8 to 10 mice per group).

(D-G) Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. <sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>##</sup> $p < 0.01$ , <sup>###</sup> $p < 0.001$ .

### Figure 4. Effect of rapamycin on glucose homeostasis in HFD mice.

(A) Fasted glucose levels (mg/dl) at week-17 post-injection (Rapa: ■, Ve: □).

(B) Fasted insulin levels (g/l) at week-17 post-injection (Rapa: ■, Ve: □).

(C) Glucose tolerance test (GTT) at week-16 post-injection (Rapa: ●, Ve: ○). Blood glucose levels (mg/dl) were measured in 6 hours-fasted mice (T0) and at the indicated times following intra-peritoneal (i.p.) injection of glucose.

(D) Homeostatic model for assessment of insulin resistance (HOMA-IR) (Rapa: ■, Ve: □).  $HOMA-IR = (17^{th} \text{ week post-injection-fasted Serum Insulin} \times 17^{th} \text{ week post-injection-fasted Serum Glucose})/22.5$ .

(E) Insulin tolerance test (ITT) at week-18 post-injection (Rapa: ●, Ve: ○). Mice were fasted for 6 hours before being i.p. injected with insulin. Blood glucose levels (mg/dl) were measured from T=0 to T=75 minutes after insulin administration.

(F) Western-blot analysis of total and phosphorylated IRS-1 in VWAT, muscle and liver. Each lane represents an individual mouse (5 mice per group were analyzed, 3 representative mice per group are figured).  $\beta$ -actin was used as internal control for VWAT and liver samples and tubulin serves as control for muscle. Quantification of the signals was done using Image J (Rapa: ■, Ve: □). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 3 mice per group.  $^{\#}p < 0.05$ .

(A-E) Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 8 to 10 mice per group.  $^{\#}p < 0.05$ ,  $^{\#\#}p < 0.01$ ,  $^{\#\#\#}p < 0.001$ .

**Figure 5. Effect of rapamycin on lymphocyte T and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) subsets in blood of HFD-fed mice (at week-20 post-injection).**

(A)  $CD4^{+} FoxP3^{+}$  Treg cells were analyzed in the blood by flow cytometry (Rapa: ■, Ve: □). Results are expressed as a percentage of live cells.

(B) Total MDSCs ( $Gr-1^{+} CD11b^{+}$ ), G-MDSCs ( $CD11b^{+} Ly6G^{med} Ly6C^{hi}$ ) and M-MDSCs ( $CD11b^{+} Ly6G^{+} Ly6C^{low}$ ) were analyzed in the blood by flow cytometry (Rapa: ■, Ve: □). Results are expressed as a percentage of live cells.

(A-B) Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 8 mice per group.  $^{\#}p < 0.05$ ,  $^{\#\#}p < 0.01$ .

**Figure 6. Effect of rapamycin on T lymphocyte subsets and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in adipose tissue stromal vascular fraction (SVF) of HFD-fed mice (at week-22 post-injection).**

(A) Adipose tissue  $CD3^{+} CD4^{+}$  T-cells were analyzed by flow cytometry and expressed as a percentage of live cells (after exclusion from the analysis of  $B220^{+}$ ,  $CD19^{+}$  and  $CD11c^{+}$  cells) (left panel) or as a number ( $\times 10^3$ )/VWAT mass (g) (right panel) (Rapa: ■, Ve: □).

(B) Adipose tissue  $CD4^{+} FoxP3^{+}$  Treg cells were analyzed by flow cytometry and expressed as a percentage of  $CD3^{+} CD4^{+}$  cells (left panel) or as a number ( $\times 10^3$ )/VWAT mass (g) (right panel) (Rapa: ■, Ve: □).

(C) Adipose tissue CD11b<sup>+</sup> cells were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as a percentage of live cells (after exclusion of T and B lymphocytes from the analysis) (left panel) or as a number (x10<sup>3</sup>)/ VWAT mass (g) (right panel) (Rapa: ■, Ve: □).

(D) Adipose tissue F4/80<sup>+</sup> cells were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as a percentage of CD11b<sup>+</sup> cells (left panel) or as a number (x10<sup>3</sup>)/ VWAT mass (g) (right panel) (Rapa: ■, Ve: □).

(E) Adipose tissue MDSCs G-MDSCs (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>med</sup>Ly6C<sup>hi</sup>) were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as a percentage of CD11b<sup>+</sup> or as a number (x10<sup>3</sup>)/ VWAT mass (g) (right panel) (Rapa: ■, Ve: □).

(F) M-MDSCs (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>) were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as a percentage of CD11b<sup>+</sup> or as a number (x10<sup>3</sup>)/ VWAT mass (g) (right panel) (Rapa: ■, Ve: □).

(G) M-MDSC and G-MDSC populations in the liver were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as a percentage of CD11b<sup>+</sup> (Rapa: ■, Ve: □).

(A-G) Data are expressed as mean ± S.E.M. of 7 to 9 mice per group. #*p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001.

### **Figure 7. Effect of rapamycin on mTORC1 and mTORC2 activities**

(A) Rapamycin blood levels (Rapa: ■, Ve: □). Mice were bled before, and at days 1 and 7 post-injection. Results are expressed as mean ± S.E.M. of 2 mice per group.

(B) Western blot analysis of S6K1 (total and T389-phosphorylated) and AKT (total and S437-phosphorylated) in VWAT, muscle and liver. Each lane represents an individual mouse (5 mice per group were analyzed, 3 representative mice per group are figured). Quantification of the signals was done using Image J (Rapa: ■, Ve: □). Data are expressed as mean ± S.E.M. of 3 mice per group. #*p*<0.05.

## **Contribution statement**

IW, PF and KM designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript. KM and ST contributed to animal experiments, histology and immunohistochemistry as well as Q-PCR. KM, EE and SL performed microarray gene expression analysis. OM-C and EB performed FACS experiments. HD and ML contributed to analytic tools. BN, DD, BS and HD reviewed the manuscript. IW is the guarantor of this work and, as such, had full access to the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

## **Competing Interests**

The authors have no conflicting financial, personal, or professional interests.

## **Financial Disclosure**

The work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). K. M. was supported by a doctoral grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## References

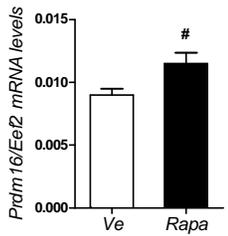
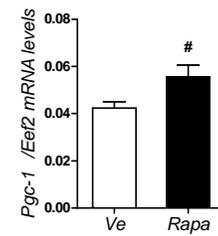
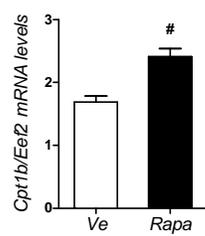
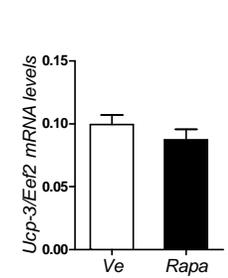
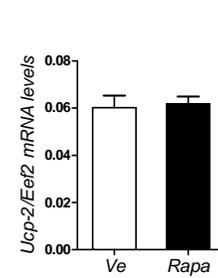
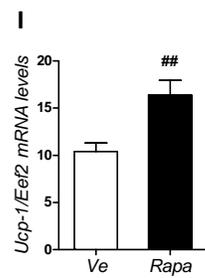
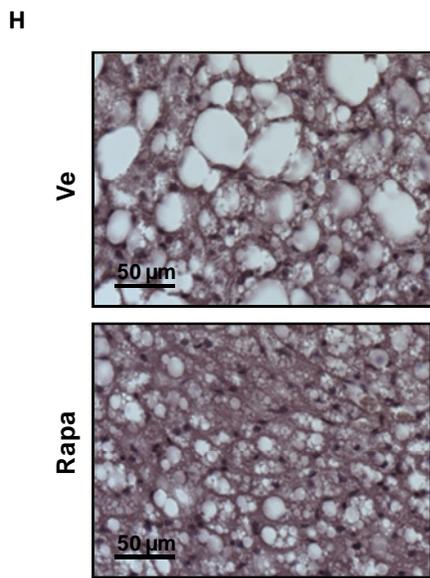
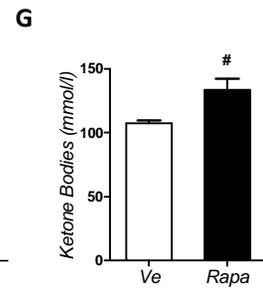
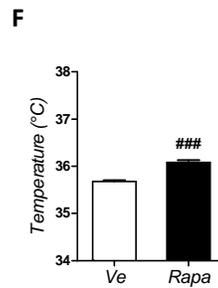
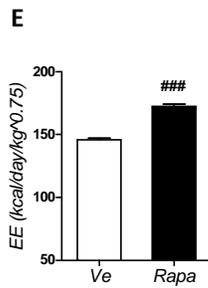
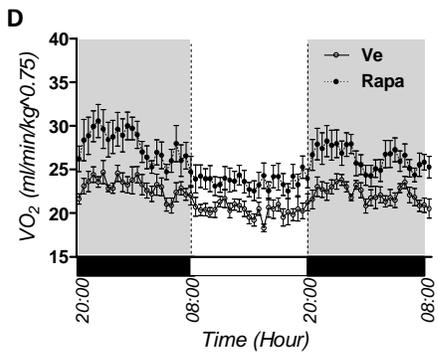
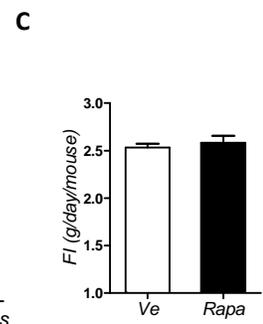
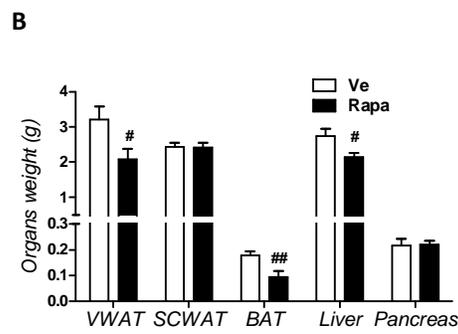
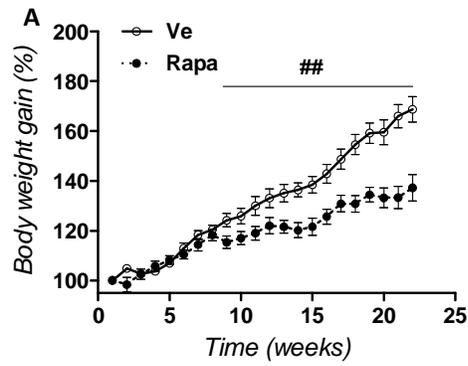
1. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, et al. (2009) Obesity accelerates thymic aging. *Blood* 114: 3803-3812.
2. Verwaerde C, Delanoye A, Macia L, Tailleux A and Wolowczuk I (2006) Influence of high-fat feeding on both naive and antigen-experienced T-cell immune response in DO10.11 mice. *Scand J Immunol* 64: 457-466.
3. Macia L, Delacre M, Abboud G, Ouk TS, Delanoye A, et al. (2006) Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice. *J Immunol* 177: 5997-6006.
4. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, et al. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116: 115-124.
5. Mathis D (2013) Immunological Goings-on in Visceral Adipose Tissue. *Cell Metab* 17: 851-859.
6. Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91.
7. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL and Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415.
8. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, et al. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808.
9. Sun S, Ji Y, Kersten S and Qi L (2012) Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. *Annu Rev Nutr*.
10. Xia S, Sha H, Yang L, Ji Y, Ostrand-Rosenberg S, et al. (2011) Gr-1+ CD11b+ myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity. *J Biol Chem* 286: 23591-23599.
11. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, et al. (2011) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 22: 238-244.
12. Lees JR, Azimzadeh AM and Bromberg JS (2011) Myeloid derived suppressor cells in transplantation. *Curr Opin Immunol* 23: 692-697.

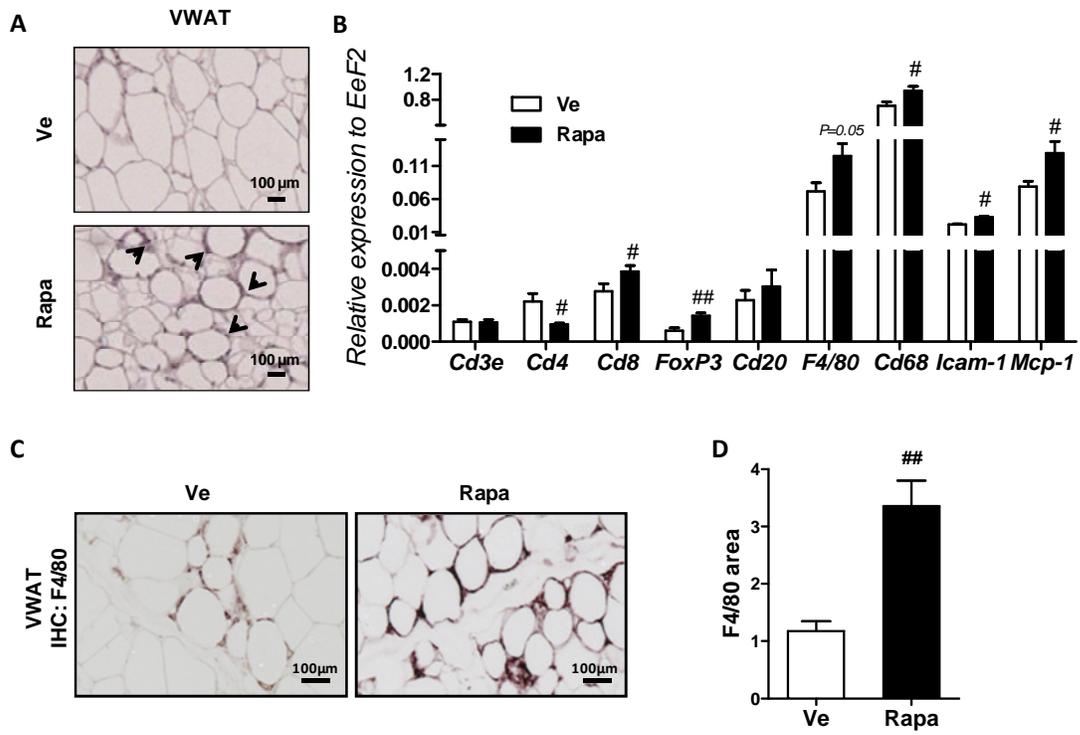
13. Chen X, Wu Y and Wang L (2013) Fat-resident Tregs: an emerging guard protecting from obesity-associated metabolic disorders. *Obes Rev* 14: 568-578.
14. Eller K, Kirsch A, Wolf AM, Sopper S, Tagwerker A, et al. (2011) Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes* 60: 2954-2962.
15. Laplante M and Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293.
16. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, et al. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10: 457-468.
17. Ye L, Varamini B, Lamming DW, Sabatini DM and Baur JA (2012) Rapamycin has a biphasic effect on insulin sensitivity in C2C12 myotubes due to sequential disruption of mTORC1 and mTORC2. *Front Genet* 3: 177.
18. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P and Snyder SH (1994) RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78: 35-43.
19. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, et al. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431: 200-205.
20. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S and Marette A (2005) Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146: 1473-1481.
21. Kumar A, Harris TE, Keller SR, Choi KM, Magnuson MA, et al. (2008) Muscle-specific deletion of rictor impairs insulin-stimulated glucose transport and enhances Basal glycogen synthase activity. *Mol Cell Biol* 28: 61-70.
22. Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S and Sabatini DM (2010) mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 468: 1100-1104.
23. Li S, Brown MS and Goldstein JL (2010) Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3441-3446.

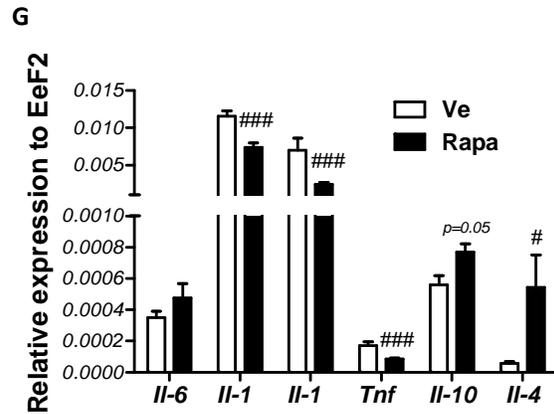
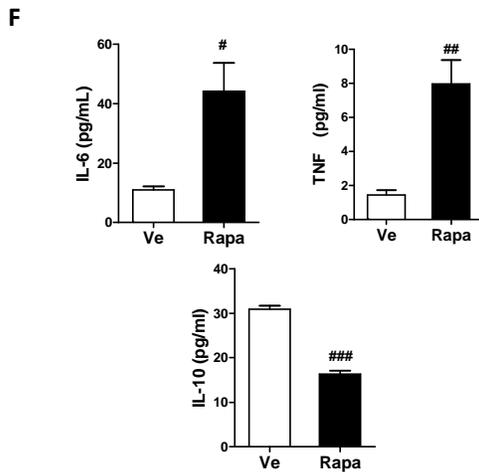
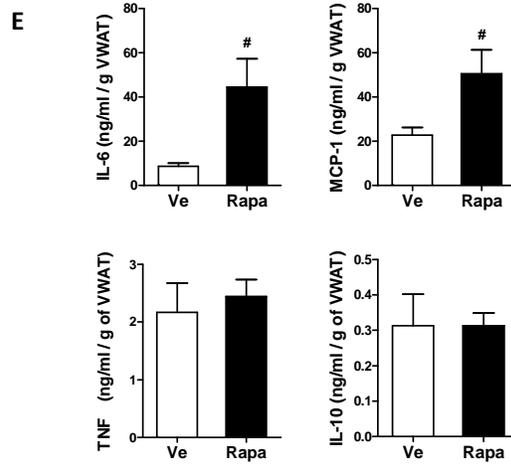
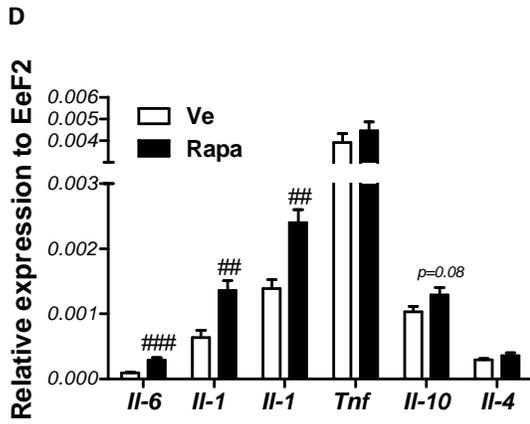
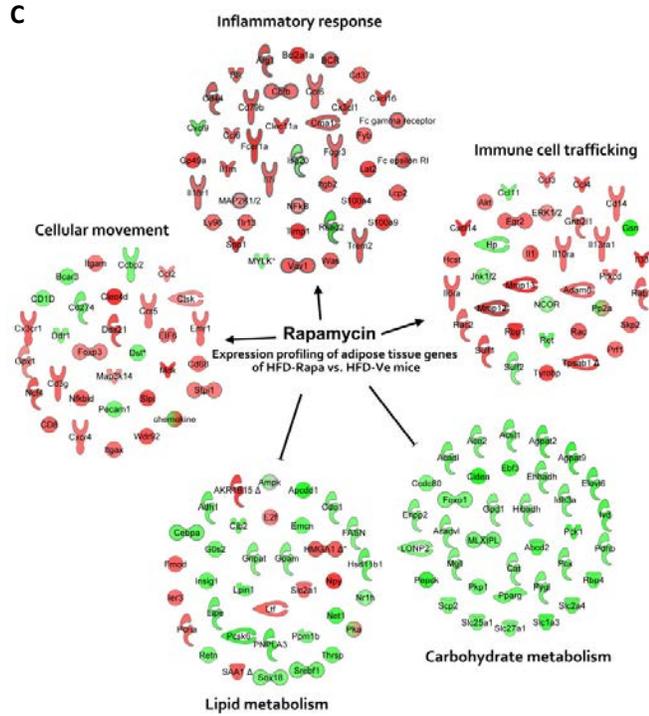
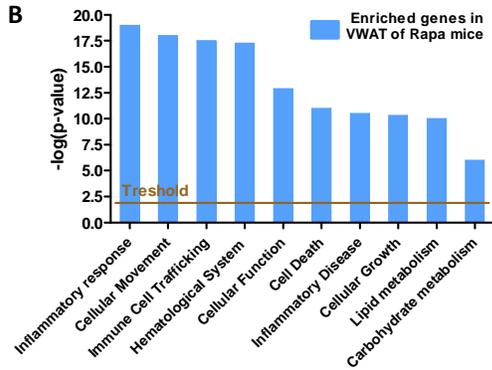
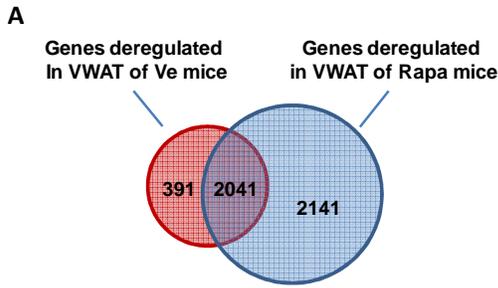
24. Polak P, Cybulski N, Feige JN, Auwerx J, Ruegg MA, et al. (2008) Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. *Cell Metab* 8: 399-410.
25. Le Bacquer O, Petroulakis E, Paglialunga S, Poulin F, Richard D, et al. (2007) Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J Clin Invest* 117: 387-396.
26. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB and Horton MR (2012) Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol* 30: 39-68.
27. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, et al. (2009) The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* 30: 832-844.
28. Gabrysova L, Christensen JR, Wu X, Kissenpfennig A, Malissen B, et al. (2011) Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF-beta-dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 41: 1242-1248.
29. Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, Heikamp E, Meyers DJ, et al. (2011) The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol* 12: 295-303.
30. Blagosklonny MV (2011) Rapamycin-induced glucose intolerance: hunger or starvation diabetes. *Cell Cycle* 10: 4217-4224.
31. Chang GR, Chiu YS, Wu YY, Chen WY, Liao JW, et al. (2009) Rapamycin protects against high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *J Pharmacol Sci* 109: 496-503.
32. Fang Y, Westbrook R, Hill C, Boparai RK, Arum O, et al. (2013) Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab* 17: 456-462.
33. Houde VP, Brule S, Festuccia WT, Blanchard PG, Bellmann K, et al. (2010) Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes* 59: 1338-1348.
34. Lamming DW, Ye L, Astle CM, Baur JA, Sabatini DM, et al. (2013) Young and old genetically heterogeneous HET3 mice on a rapamycin diet are glucose intolerant but insulin sensitive. *Aging Cell* 12: 712-718.

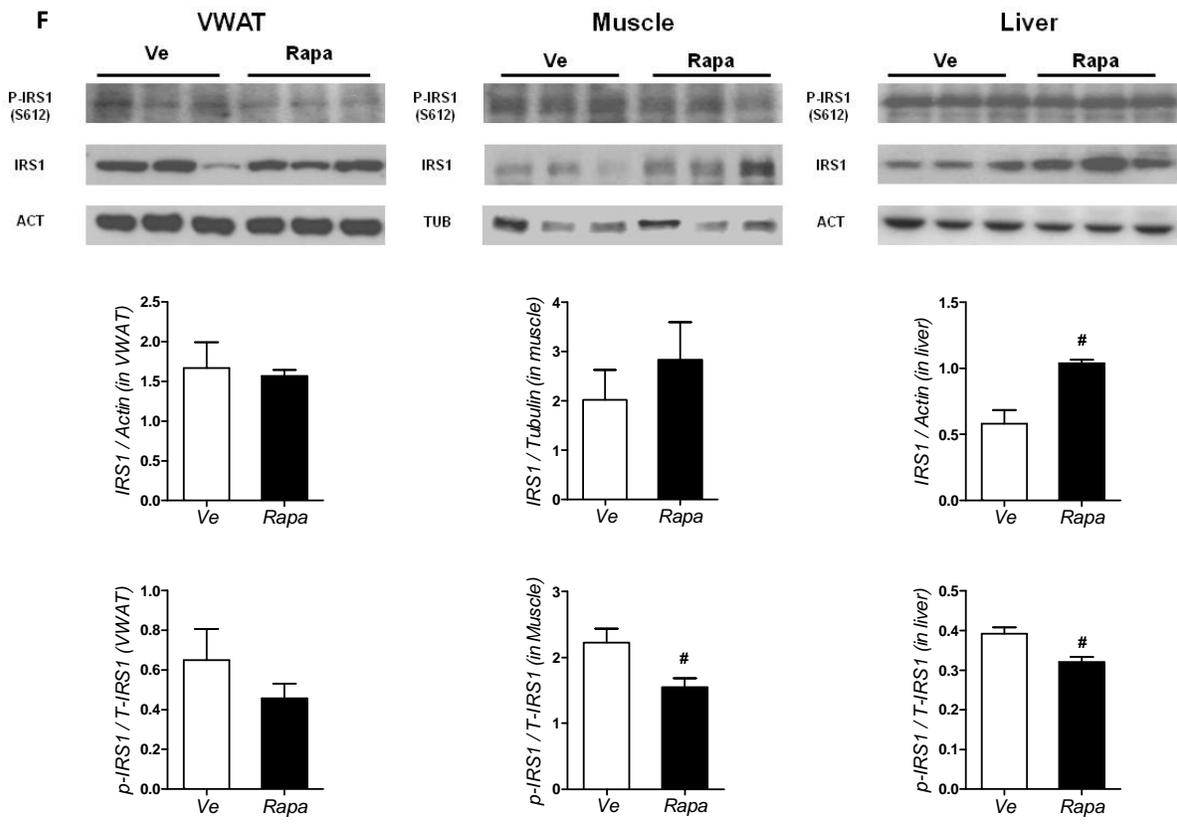
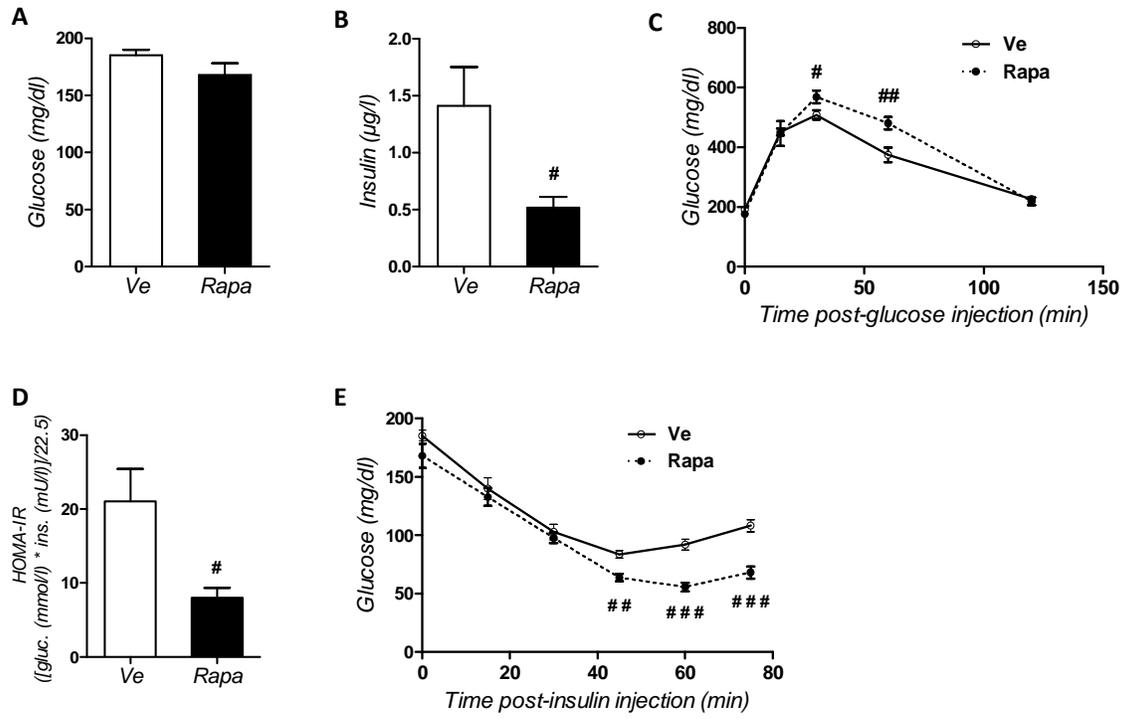
35. Thomson AW, Turnquist HR and Raimondi G (2009) Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 9: 324-337.
36. Elia M and Livesey G (1992) Energy expenditure and fuel selection in biological systems: the theory and practice of calculations based on indirect calorimetry and tracer methods. *World Rev Nutr Diet* 70: 68-131.
37. Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
38. Minhajuddin M, Fazal F, Bijli KM, Amin MR and Rahman A (2005) Inhibition of mammalian target of rapamycin potentiates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression by accelerating and stabilizing NF-kappa B activation in endothelial cells. *J Immunol* 174: 5823-5829.
39. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, et al. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116: 1494-1505.
40. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM and Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
41. Bentzinger CF, Romanino K, Cloetta D, Lin S, Mascarenhas JB, et al. (2008) Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab* 8: 411-424.
42. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, et al. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450: 736-740.
43. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, et al. (2012) Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 335: 1638-1643.
44. Chida D, Osaka T, Hashimoto O and Iwakura Y (2006) Combined interleukin-6 and interleukin-1 deficiency causes obesity in young mice. *Diabetes* 55: 971-977.
45. Garcia MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, et al. (2006) Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. *Diabetes* 55: 1205-1213.
46. Matsuki T, Horai R, Sudo K and Iwakura Y (2003) IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J Exp Med* 198: 877-888.

47. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, et al. (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8: 75-79.
48. Xu H, Hirosumi J, Uysal KT, Guler AD and Hotamisligil GS (2002) Exclusive action of transmembrane TNF alpha in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology* 143: 1502-1511.
49. Tang T, Zhang J, Yin J, Staszkiwicz J, Gawronska-Kozak B, et al. (2010) Uncoupling of inflammation and insulin resistance by NF-kappaB in transgenic mice through elevated energy expenditure. *J Biol Chem* 285: 4637-4644.
50. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, et al. (2009) Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15: 921-929.
51. Zeng H, Yang K, Cloer C, Neale G, Vogel P, et al. (2013) mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* 499: 485-490.
52. Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, et al. (2008) mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 57: 945-957.
53. Yang SB, Lee HY, Young DM, Tien AC, Rowson-Baldwin A, et al. (2011) Rapamycin induces glucose intolerance in mice by reducing islet mass, insulin content, and insulin sensitivity. *J Mol Med (Berl)* 90: 575-585.

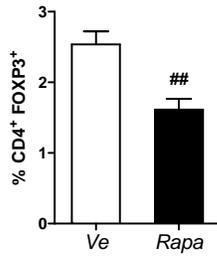




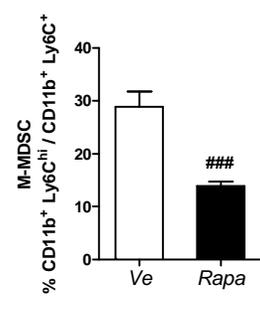
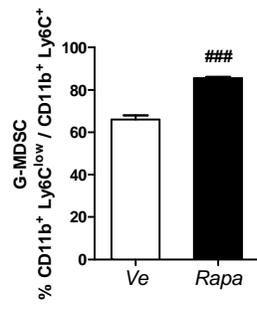
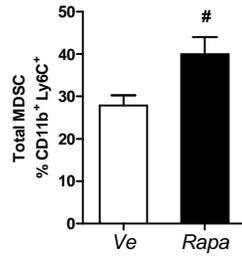




**A**



**B**



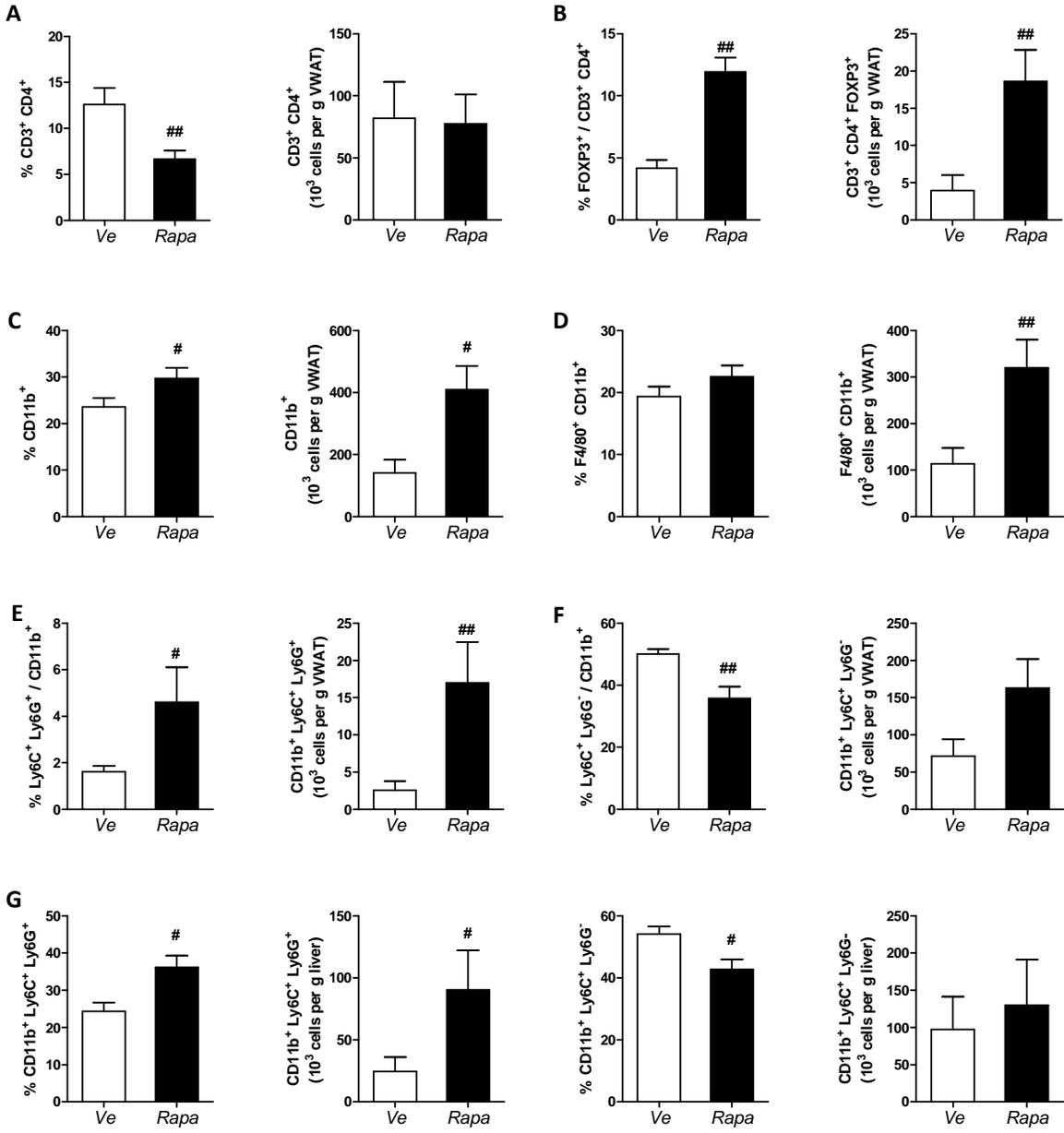
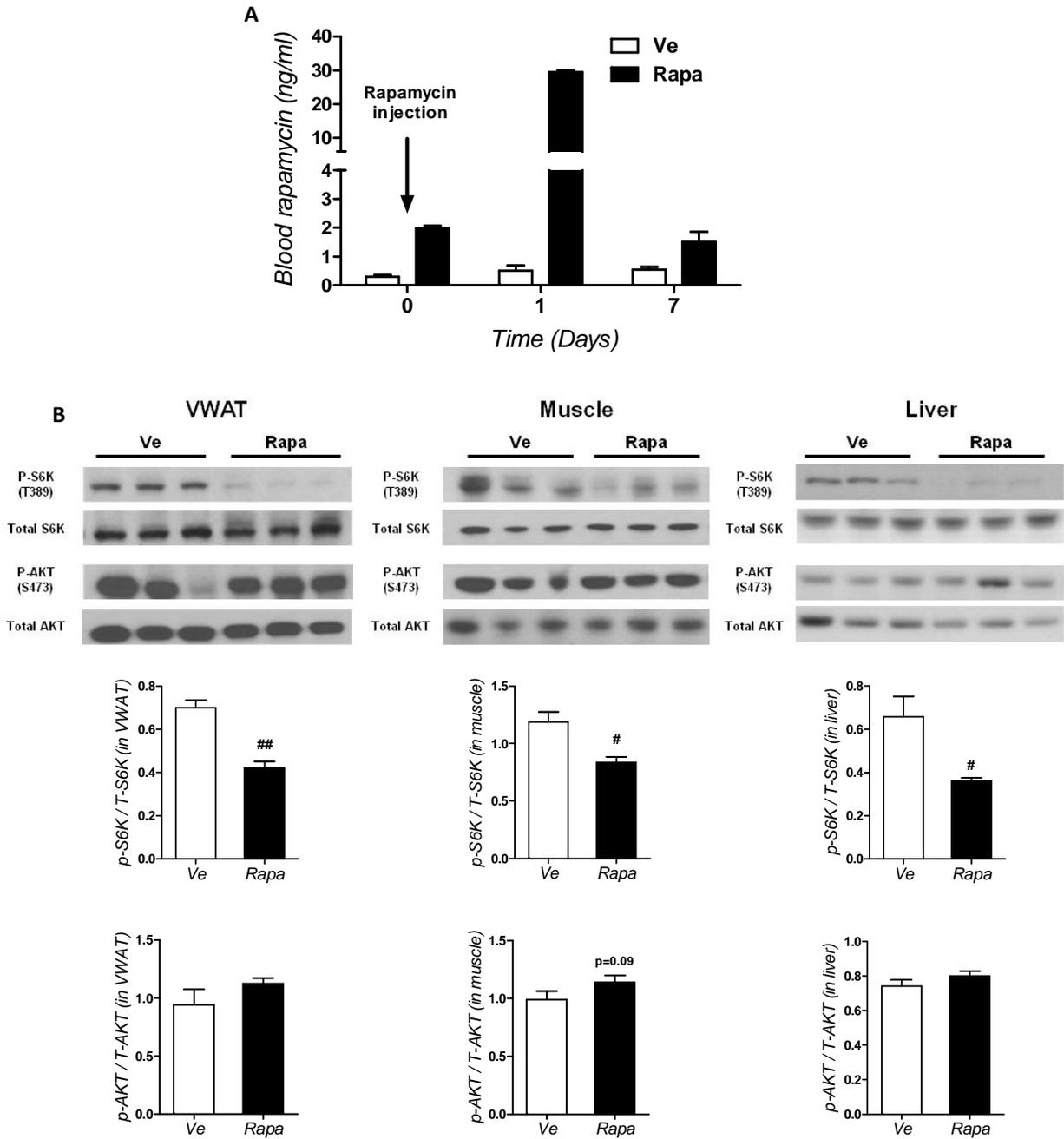


Figure 6



**Figure 7**

## **SUPPORTING INFORMATIONS.**

### **SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS.**

#### **Glycerol, triglycerides and non-esterified fatty acids (NEFAs) blood levels.**

Glycerol, triglycerides and NEFAs levels were determined in the sera of 12-hours fasted mice (at sacrifice) using colorimetric assays (respectively; Serum Triglycerides Determination Kit, Sigma-Aldrich and Free Fatty Acid Quantification Kit, BioVision, Mountain View, CA, USA).

#### **Sirolimus blood levels.**

After 16 weeks of rapamycin injections, blood samples were used to measure rapamycin levels using the sirolimus chemiluminescence magnetic microparticle immunoassay (CMIA) on the Architect-i2000® system (Abbott, IL, USA).

<b>FACS antibodies</b>	<b>Dilution</b>	<b>Reference and Origine</b>
F4/80 PE-Cy7 (BM8)	1:400	123113-Biolegend, San Diego, CA, USA
Ly6G APC (1A8)	1:1200	127613-Biolegend, San Diego, CA, USA
Ly6C Pacific Blue (HK1.4)	1:1600	128013-Biolegend, San Diego, CA, USA
CD11b PE (M1/70)	1:200	101225-Biolegend, San Diego, CA, USA
CD11c APC/Cy7 (N418)	1:100	117323-Biolegend, San Diego, CA, USA
CD3 PE-CF594 (145-2C11)	1:200	562286-BD Biosciences
CD4 Brilliant Violet 605 (RM4-5)	1:200	100547-Biolegend, San Diego, CA, USA
CD8a APC-eF780 (53-6.7)	1 :200	17-0081-81-eBioscience, San Diego, CA, USA
FoxP3 PE (FJK-16s )	1:100	25-5773-80-eBioscience, San Diego, CA, USA
B220 BD V500 (RA3-6B2)	1:100	562290-BD Biosciences
CD19 Alexa Fluor 700 (6D5)	1:400	115527-Biolegend, San Diego, CA, USA

**Supplementary Table I: Primary antibodies used for FACS analysis.**

<b>Western blot antibodies</b>	<b>Dilution</b>	<b>Reference and Origine</b>
rabbit polyclonal anti-total AKT	1:1000	#9272, Cell Signaling
rabbit polyclonal anti-phospho Ser473 AKT	1:1000	#9271, Cell Signaling
rabbit monoclonal anti-total P70 S6 kinase (49D7)	1:1000	#2708, Cell Signaling
rabbit polyclonal anti-phospho Thr389 P70 S6 kinase	1:800	#9205, Cell Signaling
rabbit polyclonal anti-phospho Ser612 IRS1	1:500	#2386, Cell Signaling
rabbit polyclonal anti-IRS1	1:500	Sc-560, Santa Cruz
rabbit polyclonal anti-IRS2	1:500	Sc-8299, Santa Cruz

**Supplementary Table II: Primary antibodies used for western blot analysis.**

### **Top 5 enriched pathways in Immune Cell Trafficking**

	<b>p-Value</b>	<b>Predicted Activation State</b>	<b># Molecules</b>
Cell movement myeloid cells	5,54E-12	Increased	54
Cell movement phagocytes	3,39E-11	Increased	52
Cell movement granulocytes	6,00E-08	Increased	38
Cell movement neutrophils	5,67E-06	Increased	28
Recruitment phagocytes	6,69E-06	Increased	25

### **Top 5 enriched pathways in Inflammatory Response**

	<b>p-Value</b>	<b>Predicted Activation State</b>	<b># Molecules</b>
Immune response	3.20E-20	Increased	144
Inflammatory response	7.69E-16	Increased	70
Cell movement phagocytes	3.39E-11	Increased	52
Chemotaxis leukocytes	4.15E-11	Increased	34
Quantity of phagocytes	3.76E-10	None	53

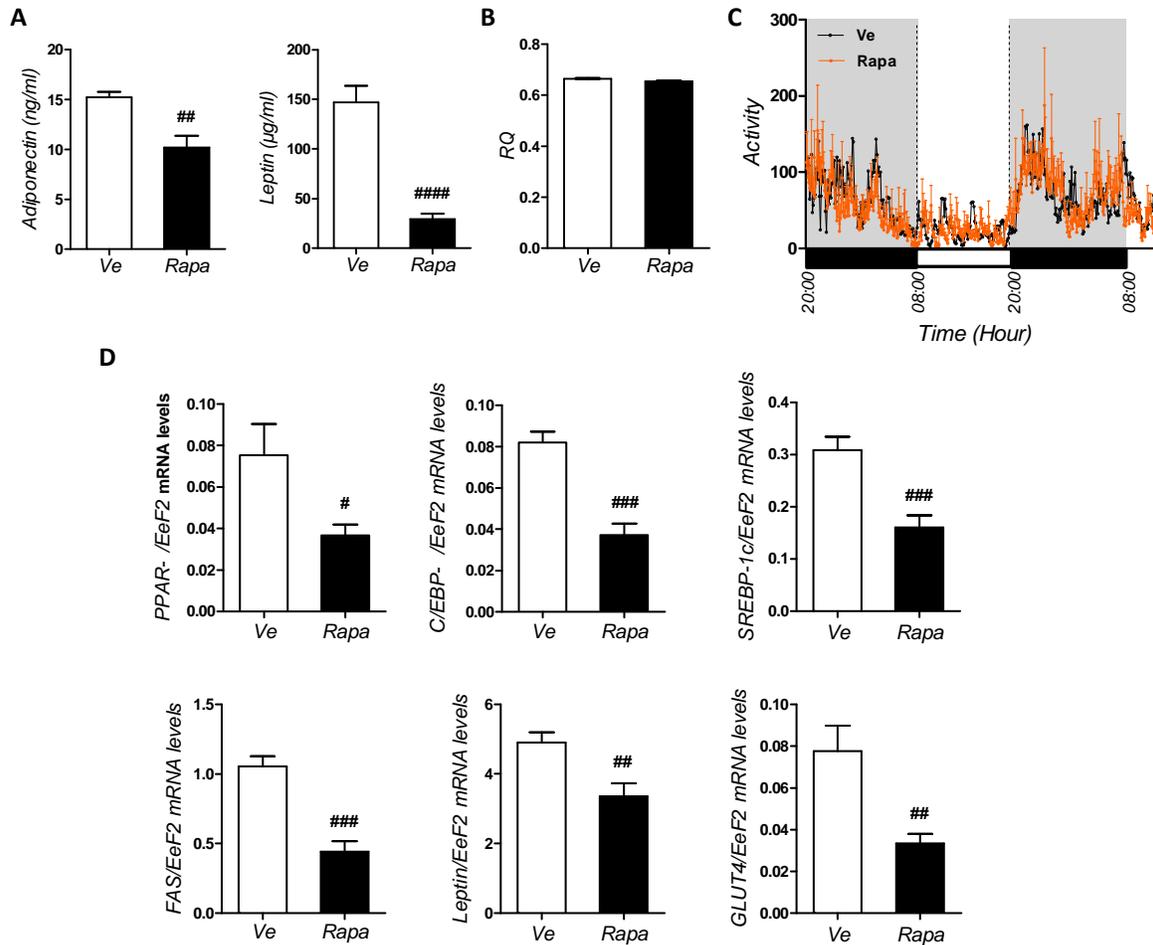
### **Supplementary Table III. Top enriched pathways in top enriched biological functions.**

The enriched pathways correspond to immune cell trafficking and inflammatory response in rapamycin-treated mice.

	<b>Ve</b>	<b>Rapa</b>
<b>Triglycerides (mmol/l)</b>	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2 <sup>#</sup>
<b>Glycerol (mmol/l)</b>	7.3 ± 2.2	6.4 ± 1.9
<b>NEFA (mmol/l)</b>	1.2 ± 0.06	1.5 ± 0.3

**Supplementary Table IV. Blood lipid profiles.**

Quantification of triglycerides, glycerol and NEFA in the blood of rapamycin- and vehicle-treated mice. Data are expressed as mean ± S.E.M. of 8 to 10 mice per group. <sup>#</sup>*p*<0.05.



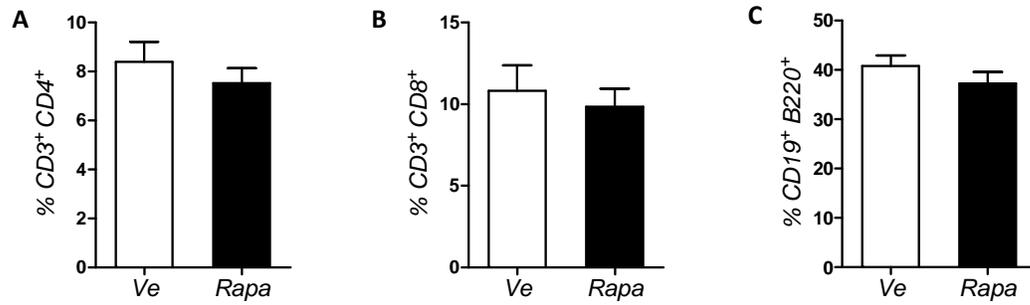
**Supplementary Figure 1. Effect of rapamycin on adiponectin and leptin blood levels, on respiratory quotient and locomotor activity and on the expression of adipogenic factors.**

(A) Adiponectin and leptin blood levels (Rapa: ■, Ve: □).

(B) Respiratory quotient (Rapa: ■, Ve: □): and (C) locomotor activity, measured over a 36-hour monitoring period (16-week post-injection).

(D) Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of the VWAT of Ve- or Rapa-treated mice, after 22 injections (Rapa: ■, Ve: □): Expression levels of *PPAR- $\gamma$* , *C/EBP $\alpha$* , *SREBP-1c*, *FAS*, *leptin* and *GLUT4*. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 8 to 10 mice per group.

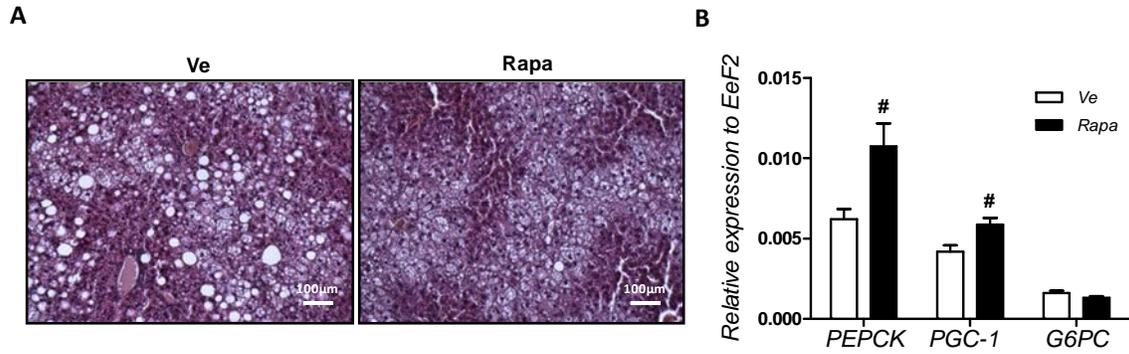
<sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>##</sup> $p < 0.01$ , <sup>###</sup> $p < 0.001$  <sup>####</sup> $p < 0.0001$ .



**Supplementary Figure 2. Effect of rapamycin on blood lymphocyte T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and B cells.**

(A) CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T -cells, (B) CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T -cells, and (C) CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> B -cells were analyzed in the blood by flow cytometry (Rapa: ■, Ve: □). Results are expressed as percentage of live cells.

Data expressed as mean ± S.E.M. of 8 mice per group.



**Supplementary Figure 3. Histology of liver and gluconeogenesis-related gene expression.**

(A) Representative sections of H&E-stained liver. Scale bars represent 100µm.

(B) Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of the liver, after 22 injections (Rapa: ■, Ve: □): Expression levels of the gluconeogenesis-related genes *PEPCK*, *PGC-1* and *G6PC*. Data are expressed as mean ± S.E.M. of 8 to 10 mice per group. <sup>#</sup> $p < 0.05$ .

## Discussion et Conclusion de l'étude 1

mTOR est une protéine kinase impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires métaboliques et immunologiques. La rapamycine, une molécule possédant des propriétés immuno-suppressives, a été proposée comme étant un médicament potentiel pour lutter contre l'obésité. Cependant, l'utilisation de la rapamycine dans cette optique reste à discuter du fait qu'elle possède des effets contradictoires, souvent délétères sur le métabolisme qui peuvent être dus à son impact sur le système immunitaire. De ce fait, une meilleure compréhension des effets de ce composé sur le système immunitaire ainsi que sur le métabolisme permettrait de mieux définir son utilisation chez l'Homme, potentiellement dans le but de l'utiliser comme un traitement contre le développement de l'obésité. Dans cette étude, nous avons évalué les effets des injections à long terme de la rapamycine sur le métabolisme et de les corrélés aux effets immuno-modulateurs de la drogue sur la composition cellulaire immune des tissus métaboliques (notamment le tissu adipeux blanc) chez la souris obèse.

Comme attendu, l'administration de la rapamycine a limité le gain de poids corporel sans altération de la prise alimentaire. Ceci peut être expliqué en partie par la diminution de l'activité de mTOR dans le tissu adipeux blanc qui est impliquée dans l'adipogenèse et le développement de la masse grasse des souris. Cette diminution au niveau de la masse du tissu adipeux viscéral, sans altération celle du sous-cutané, a été associée à une diminution du taux circulant de la leptine. Nous nous attendons à observer un phénomène d'hyperphagie chez les souris traitées par la drogue. Cependant, la prise alimentaire est comparable entre les deux groupes des souris. L'absence de l'effet sur la prise alimentaire peut être expliquée par le fait que la sensibilité à la leptine et à l'insuline au sein de l'hypothalamus est augmentée. Une résistance à la leptine et à l'insuline au sein de ce tissu a déjà été rapportée pendant le développement de l'obésité provoquant ainsi une dérégulation du contrôle de la prise alimentaire (361). Il est possible que la rapamycine ait amélioré la sensibilité du tissu à la leptine et à l'insuline d'où la prise alimentaire comparable entre les deux groupes expérimentaux.

De plus, la limite de gain de poids peut être due à l'augmentation de la dépense énergétique observée chez les souris traitées. En effet, la consommation du volume d'oxygène et la dépense énergétique sont plus importantes suite à l'administration de la rapamycine. Nous pouvons supposer que la dépense énergétique augmentée est due à la modulation de mTOR dans le tissu adipeux brun dans lequel le rôle de ce complexe reste à identifier. En effet,

aucune étude jusqu'à aujourd'hui n'a défini le rôle de mTOR dans le développement et la fonction du tissu adipeux brun. Cependant, un effet pyrogène peut être également à l'origine de l'augmentation de la dépense énergétique observée. Les cytokines inflammatoires sont connues pour avoir un effet pyrogène et peuvent provoquer une augmentation de la dépense énergétique en agissant au niveau du système nerveux central (SNC) (362). Dans notre étude, nous avons montré que les facteurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 sont augmentés dans le sang des souris traitées. Il est possible que l'augmentation systémique des cytokines inflammatoires ait agi au niveau du SNC et ait provoqué une augmentation de la dépense énergétique chez ces animaux. Finalement, nous pouvons supposer que l'augmentation de la dépense énergétique résulte d'une interaction directe entre les cellules immunes, notamment les macrophages, et le tissu adipeux brun. En effet, un rôle des macrophages alternatifs dans la régulation de la thermogenèse a été montré au sein du tissu adipeux brun. Ces cellules produisent des catécholamines afin d'augmenter la thermogenèse du tissu adipeux brun et la lipolyse dans le tissu adipeux blanc de l'organisme (363). Nous pouvons imaginer que la rapamycine a augmenté le recrutement des MDSCs dans le tissu adipeux brun, favorisant ainsi la polarisation des macrophages en profil alternatif, ces derniers pouvant avoir un rôle sur la thermogenèse des souris traitées.

Concernant l'homéostasie glucidique des souris, nous avons montré que la rapamycine a exacerbé l'intolérance au glucose des animaux tout en rendant les souris plus sensibles à l'insuline. L'intolérance au glucose peut être provoquée par la diminution de l'expression des transporteurs de glucose (*e.g.* GLUT4 dans le tissu adipeux blanc viscéral) ou par l'hypo-insulinémie observée mais également par une augmentation de la néoglucogenèse au sein du foie. Nous ne pouvons pas exclure qu'un défaut de sécrétion de l'insuline par les îlots pancréatiques peut être responsable du ralentissement de la clairance du glucose observée durant le test de tolérance au glucose. Ceci est probable puisque la rapamycine, dans certaines conditions de traitement, est connue pour avoir des effets toxiques sur la cellule  $\beta$  pancréatique contribuant ainsi à la diminution de la synthèse et de la sécrétion de l'insuline (364). En revanche, les souris traitées par la rapamycine sont plus sensibles à l'insuline malgré l'exacerbation de l'état inflammatoire local (tissu adipeux blanc) et systémique. Ce résultat peut être expliqué par plusieurs mécanismes : 1) mTORC1 est sur-activé durant l'obésité et conduit à une activation constitutive de son substrat P70 S6K1. Ce dernier exerce un rétro-contrôle négatif au niveau de la voie de signalisation de l'insuline et provoque la dégradation d'IRS1 et d'IRS2, deux protéines essentielles pour la transduction du signal de

l'insuline (245). Dans notre modèle, nous avons inhibé exclusivement mTORC1. De ce fait, l'effet du rétro-négatif exercé par P70 S6K1 sur la voie de l'insuline a été aboli, ce qui conduit à une augmentation du niveau d'expression protéique d'IRS1 (dans notre cas dans le foie). 2) une étude récente a montré qu'une altération de l'activité de mTORC2 serait le facteur responsable du développement de la résistance à l'insuline provoquée par la rapamycine, suggérant ainsi que la voie de l'insuline est régulée par mTORC2 (245). Dans notre protocole d'administration, nous n'avons pas altéré l'activité de mTORC2 dans les tissus métaboliques, révélée par l'état de phosphorylation d'AKT sur le résidu S473. Cependant, une analyse plus approfondie de l'état d'activation des deux voies de mTOR en analysant d'autres substrats des deux complexes (4EBP-1 pour la voie mTORC1 et PKC- $\alpha$  pour la voie mTORC2) pourrait être utile afin de s'assurer que notre protocole d'administration de la rapamycine a inhibé exclusivement le premier complexe de mTOR sans altérer l'activité du deuxième. 3) Cette sensibilité à l'insuline améliorée chez les souris traitées à la rapamycine peut être provoquée par la réduction du poids corporel et à la diminution de la masse grasse des animaux ou même par des modifications moléculaires au niveau du SNC comme une diminution de la résistance à l'insuline au niveau cérébral. Il est connu que le SNC régule le métabolisme glucidique comme la production du glucose hépatique, la sensibilité à l'insuline ou le développement de la masse grasse (365, 366). De ce fait, nous pouvons supposer que la rapamycine a amélioré la sensibilité à l'insuline au niveau cérébral et comme conséquence a réduit la résistance à l'insuline des tissus métaboliques des souris.

De manière intéressante, nous avons montré que l'inflammation locale (tissu adipeux blanc) et systémique est augmentée chez les souris traitées, ce qui peut expliquer la diminution du taux circulant d'adiponectine qui devrait être restauré avec la diminution de la masse grasse (367, 368). De plus, l'augmentation de l'inflammation s'oppose à l'effet bénéfique obtenu concernant la sensibilité à l'insuline. Il est reconnu aujourd'hui que la voie de signalisation de l'insuline est perturbée par l'inflammation chronique à bas bruit installée lors de l'obésité. Dans notre modèle d'étude, nous pouvons suggérer que l'inflammation n'est plus considérée à bas bruit. Des modèles de souris sur-exprimant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans le tissu adipeux blanc montrent une augmentation de l'inflammation qui est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline et à une dépense énergétique plus importante chez les souris obèses (369). L'inflammation, dépendant de son grade, peut avoir des effets contradictoires sur l'homéostasie glucidique de l'organisme. L'origine de l'inflammation

observée chez les souris traitées par la rapamycine peut être expliquée par trois phénomènes : 1) l'implication de mTOR dans la régulation de l'accumulation et de la réponse inflammatoire dans les cellules immunes comme les macrophages et les cellules dendritiques (301, 302, 311, 312) ou 2) l'implication des adipocytes eux-mêmes dans l'exacerbation de l'inflammation locale et systémique puisque ces derniers sont capables de sécréter également des adipokines ou 3) de la réduction de l'angiogenèse suite au traitement à la rapamycine (propriété anti-angiogénique dans les cancers) provoquant ainsi un milieu d'hypoxie qui peut conduire à l'augmentation des facteurs inflammatoires.

L'accumulation des cellules immunes dans le tissu adipeux des souris traitées à la rapamycine peut être responsable de l'augmentation de l'inflammation. Cette accumulation de cellules immunes, notamment les macrophages, peut être due à une augmentation du recrutement des monocytes circulants (201) à cause de l'augmentation de l'expression des facteurs chémo-attractants tels que MCP-1 ou ICAM-1, ou à une prolifération *in situ* des macrophages résidents (202, 203) en favorisant l'augmentation des nombres des macrophages pro-inflammatoires M1. Cependant, dans notre étude, nous avons analysé l'expression du marqueur CD11c par cytométrie en flux et nous avons observé que la rapamycine n'a pas altéré le nombre des macrophages CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> dans le tissu adipeux blanc des animaux (données non montrées). En revanche, cela n'empêche pas de supposer que la rapamycine a pu augmenter d'une manière qualitative la sécrétion des cytokines inflammatoires par les M1 sans augmenter leur nombre. Enfin, nous pouvons supposer que mTOR régule l'inflammation dans les adipocytes et que l'inhibition de mTORC1 conduit à une exacerbation de l'inflammation au niveau de l'adipocyte. Des données obtenues au laboratoire issues des expériences réalisées sur la lignée d'adipocytes de souris 3T3-L1 ont montré que la rapamycine augmente l'expression des cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et MCP-1 par les 3T3-L1 après 4 heures de traitement (données non montrées). Ces résultats suggèrent que l'inflammation du tissu adipeux résulte en partie de la modulation de la voie mTOR dans les adipocytes des souris traitées à la rapamycine.

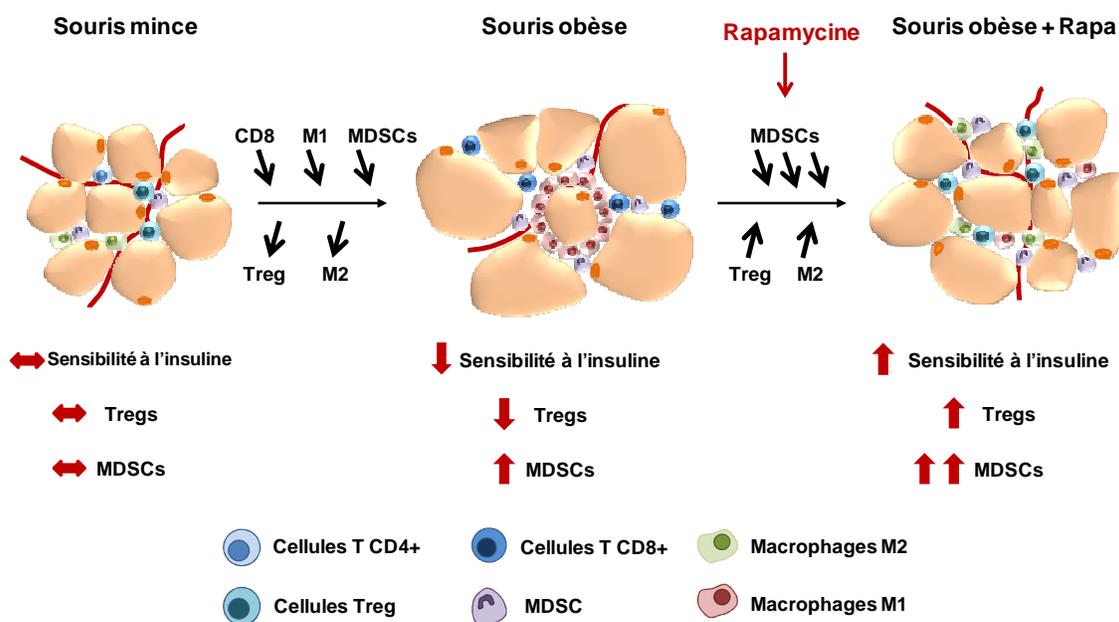
En parallèle, nous avons montré que la rapamycine a augmenté le nombre de cellules régulatrices comme les lymphocytes T régulateurs et les cellules immuno-suppressives d'origine myéloïde (MDSCs). Il est possible que ces cellules soient recrutées pour atténuer l'inflammation locale ou qu'elles soient augmentées grâce à un effet immuno-modulateur de la rapamycine au sein de ces cellules. En effet, la rapamycine est un immuno-suppresseur connu pour provoquer l'expansion des Tregs *in vitro* et *in vivo* (326, 370). Dans notre modèle,

il est possible que le protocole d'injection utilisé ait conduit à un changement de profil des lymphocytes T effecteurs vers un profil régulateur et non pas à leur recrutement. Concernant les MDSCs, aucune étude jusqu'à aujourd'hui n'a visé à identifier le rôle de la rapamycine ou de mTOR dans l'expansion, l'activation, la différenciation ou même la fonction de ces cellules. Il est possible que l'augmentation des MDSCs soit provoquée par l'exacerbation de l'inflammation locale ou par un effet intrinsèque de la rapamycine au sein de ces cellules. Nous pouvons imaginer que la rapamycine entraîne des modifications moléculaires qui passent par la voie mTOR et qui permettent l'expansion des MDSCs comme dans le cas des Tregs. En effet, une inhibition de la voie de mTOR dans les lymphocytes T provoque le développement des Tregs suite à des changements épigénétiques entraînant l'expression du facteur de transcription FoxP3 (300). Nous pouvons également penser que l'inhibition de mTOR dans les MDSCs pourrait favoriser le maintien de leur statut immature et d'empêcher leur différenciation en macrophages et cellules dendritiques. Afin de répondre à ces questions, des études *in vitro* dans un premier temps sont suggérées dans le but d'étudier l'effet de la rapamycine ou le rôle de l'inhibition des complexes mTOR dans ces sous-populations régulatrices.

Il est de plus en plus accepté et apprécié que les Tregs soient impliqués dans la régulation de la sensibilité à l'insuline dans les tissus métaboliques (222, 371). Concernant les MDSCs, une étude récente a montré un rôle de ces dernières dans la régulation de la sensibilité à l'insuline et l'atténuation de l'inflammation chez des souris obèses (216). En se basant sur ces observations, nous pouvons supposer que la rapamycine a probablement amélioré la sensibilité à l'insuline des souris traitées, en plus de son effet sur l'abolition du rétro-contrôle négatif effectué par P70 S6K1 sur IRS1 et IRS2. En effet, nous avons montré que la rapamycine a augmenté le nombre des Tregs dans le tissu adipeux et pour la première fois celui des MDSCs (le tissu adipeux blanc et le foie) qui pourront avoir un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline des tissus. De plus, nous avons montré que l'inflammation hépatique (révélée par l'expression des cytokines inflammatoires) a été diminuée chez les souris traitées, ce qui laisse supposer que les MDSCs ont eu un rôle dans l'atténuation de cette inflammation et ont peut-être amélioré la sensibilité à l'insuline des souris. Enfin, ces observations nécessitent d'approfondir l'effet de la rapamycine sur ces cellules régulatrices afin de regarder si le composé n'a pas modifié la fonction cellulaire de ces populations, puisque récemment il a été montré que mTORC1 joue un rôle important dans la régulation de la fonction des Tregs *in vivo* (343). De plus, des expériences de perte de fonction de ces populations cellulaires

(déplétion cellulaire *in vivo*) sont souhaitées pour démontrer si les effets observés de la rapamycine sur le métabolisme, notamment l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, passent *via* l'accumulation des MDSCs et des Tregs dans les tissus métaboliques.

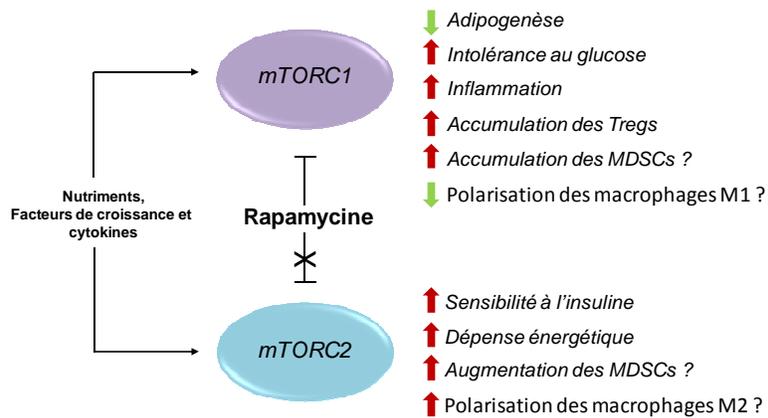
En conclusion, nous avons montré que les injections intermittentes à long terme de la rapamycine ont conduit à une amélioration des paramètres métaboliques dérégulés par le régime hyperlipidique associée à une augmentation des cellules régulatrices comme les Tregs et les MDSCs. Ces observations révèlent un nouvel aspect d'immuno-régulation de la rapamycine et suggèrent que la voie mTOR contribue à la régulation de la composition des cellules immunes dans les tissus métaboliques (*e.g.* le tissu adipeux blanc et le foie) (**Fig. 29**). Même si les mécanismes moléculaires et cellulaires restent à démontrer, nous suggérons que l'amélioration de la résistance à l'insuline observée est en partie due à l'augmentation des cellules régulatrices dans les tissus métaboliques.



**Figure 29. Schéma montrant l'effet immuno-modulateur de la rapamycine dans le tissu adipeux des souris traitées.**

Cependant, nous avons montré que la rapamycine possède des propriétés pro-inflammatoires qui peuvent conduire au développement de l'intolérance au glucose comme observé dans notre étude. Ces propriétés pro-inflammatoires semblent être indépendantes du régime hyperlipidique puisque nous avons observé une augmentation des cytokines inflammatoires sériques et une intolérance au glucose chez des souris traitées par la rapamycine et mises sous un régime standard et sans altération de la sensibilité à l'insuline.

Ces observations soulignent dans un premier temps l'importance de trouver une nouvelle molécule thérapeutique qui inhiberait sélectivement le complexe mTORC1 sans altérer l'activité de mTORC2 afin de bénéficier des effets bénéfiques et de minimiser les effets délétères (**Fig. 30**). De plus, de développer une thérapie ciblée, plus précisément cibler l'activité de mTORC1 dans un tissu spécifique comme le tissu adipeux sans altérer l'activité de mTORC1 dans les autres tissus comme le foie, le muscle ou le pancréas ou les cellules du système immunitaire inné ou adaptatif.



**Figure 30.** Schéma récapitulant les effets de la rapamycine observés dans notre protocole.

*Article 2*

**A Probiotic Mixture Alleviates Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance  
in Mice through Adipose Tissue Cell-Remodeling**

## **Objectifs de l'étude 2**

Dans cette partie de notre travail de thèse, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet de plusieurs souches de probiotiques (seules ou en combinaison de souches) connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires sur le développement de l'obésité et l'inflammation associée. Nous avons regardé leur impact sur l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux blanc et la résolution de l'état inflammatoire ainsi que les complications métaboliques comme l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline et de les associer au changement de la composition du microbiote intestinal.

## **A probiotic mixture alleviates diet-induced obesity and insulin resistance in mice through adipose tissue cell-remodeling**

Kassem Makki<sup>1,2#</sup>, Jeanne Alard<sup>1,3#</sup>, Véronique Valenti<sup>1,3</sup>, Véronique Peucelle<sup>1,3</sup>, Solenne Taront<sup>1,2</sup>, Irène Mangin<sup>4</sup>, Philippe Froguel<sup>1,2</sup>, Anne-Judith Waligora-Dupriet<sup>4</sup>, Bruno Pot<sup>1,3</sup>, Isabelle Wolowczuk<sup>1,2§</sup> and Corinne Grangette<sup>1,3\$\*</sup>

<sup>1</sup>Univ Lille Nord de France, UDSL, Lille, France ; <sup>2</sup>Genomics and Metabolic Diseases, CNRS UMR8199, Institut Pasteur de Lille (IPL), France ; <sup>3</sup>Lactic Acid Bacteria and Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Inserm U1019 - CNRS UMR 8204, IPL & IFR 142, <sup>4</sup>Intestinal Ecosystem, Probiotics, Antibiotics, Université Paris Descartes, France

\*Correspondance to: Corinne Grangette, Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Phone: (33) 3 20 87 11 88; Fax: (33) 3 20 87 11 92.

Email: [Corinne.grangette@ibl.fr](mailto:Corinne.grangette@ibl.fr)

# These authors contributed equally to the work.

\$ These authors shared leadership.

7 Figures, 2 Tables, 2 Supplementary Figures

## **Abstract**

Obesity is frequently associated with a state of subclinical and chronic inflammation that affects insulin activity in its metabolically sensitive tissues, such as liver and adipose tissue, culminating in the deregulation of glucose homeostasis. Inflammation is orchestrated by macrophage recruitment in the adipose tissue while regulatory T cells emigrate. Recently, it has been proposed that the gut microbiota might be involved in the development of obesity and its immune and metabolic complications. Here, we evaluated whether oral consumption of probiotic strains or mixture - selected for their potent anti-inflammatory capacities - could help improve metabolism and inflammation in diet-induced obese mice. We observed a strain-specific effect; some strains having neither beneficial nor detrimental impact while intervention with a probiotic mixture led to a significant limitation of body weight gain, as well as improved inflammatory and metabolic parameters, including insulin resistance. Protective metabolic effects of the mixture were associated within the adipose tissue to a restoration of PPAR expression and cell remodeling affecting both macrophages and regulatory T cells.

## Introduction

Obesity and the associated metabolic disorders insulin resistance and type 2 diabetes have become a major worldwide health problem which prevalence has dramatically increased over the last decades. Obesity frequently results in a state of chronic, low grade inflammation initiated in the white adipose tissue (WAT) which contributes to the development of insulin resistance and its connection to type 2 diabetes [1]. Indeed, the expanding adipose tissue is characterized by adipocyte hypertrophy, immune cell composition changes and increased production of proinflammatory hormones and adipokines [2, 3]. Interestingly, weight reduction in obese subjects leads to a normalization of inflammatory markers. Moreover, macrophage infiltration, occurring mainly in the visceral adipose tissue is considered a major risk factor in the development of obesity-associated cardiovascular and metabolic diseases and represents the major source of TNF , IL-6 and resistin; factors involved in the development of insulin resistance [4-8]. In the lean condition, adipose tissue contains a resident population of alternatively activated anti-inflammatory, M2 macrophages, which can suppress the inflammation of both adipocytes and macrophages partly *via* the secretion of IL-10. During obesity, a switch to inflammatory M1 macrophage polarization state occurs in adipose tissue, thereby accelerating adipose tissue inflammation [9]. The mechanism that promotes infiltration of inflammatory macrophages into obese adipose tissue is yet not completely known, however increased expression of chemokines has been implicated in the control of monocyte recruitment to the adipose tissue, highlighting a clear evidence for the pathophysiological role of the MCP-1 (also known as CCL-2) / CCR2 pathway [10, 11]. Notably, a decrease in macrophage accumulation and inflammation has been observed in the adipose tissue of mice lacking CCR2 fed a high-fat diet (HFD) [12], as well as in MCP-1-deficient mice, suggesting that therapeutic targeting of macrophages would improve inflammation and, thus, lead to the amelioration of insulin resistance. In addition to macrophages, other immune cells, such as neutrophils and NK cells, are increased in the adipose tissue during the course of obesity [13, 14] and recent evidence has also revealed a large number of T lymphocytes in the WAT of lean and obese mice. The population of CD8<sup>+</sup> T cells contributes to macrophage recruitment and WAT inflammation in obesity as well as Th1 and Th17 CD4<sup>+</sup> T cell subsets [15, 16]. Beside increased pro-inflammatory cells accumulation, dysregulated inflammation in the obese adipose tissue also results from decreased WAT resident regulatory T cells (Tregs) [17].

The contribution of the intestinal microbiota to host metabolism has been recently revisited, leading to the concept of its active role in food consumption and energy expenditure [18]. Indeed, accumulating data indicate the importance of the gut microbiota in the development of obesity. Compared with conventionalized mice, germ-free animals are protected from HFD-induced body weight gain, insulin resistance, and glucose intolerance [19]. In addition, obesity has been shown to be associated with altered composition, diversity and metabolic function of gut microbiota in mice and humans [19-21], although this needs to be confirmed in population-based studies. Moreover, this impaired flora has a potential activity of its own, since implantation of obese gut microbiota to lean mice transfers the obese phenotype [22]. Removing the gut microbiota by antibiotic treatment also confers protection from diet-induced obesity (DIO) and resulted in improved glucose tolerance in genetically obese *ob/ob* mice [23]. This protective effect was associated with reduced inflammation, suggesting that, in addition to promoting adiposity, the gut microbiota may also contribute to metabolic dysregulation by elevating the inflammatory tone. Thus, dietary strategies to manipulate the gut microbiota, notably through the therapeutic use of probiotics and prebiotics, have gained considerable momentum for obesity and metabolic syndrome management. Several prebiotics (dietary fibers such as glucans, fructans) are able to protect mice from obesity and insulin resistance by improving the gut barrier function that counteracts endotoxaemia and inflammation associated with obesity [24]. In addition to increasing the abundance of Bifidobacteria, the prebiotic treatments profoundly promoted other gut bacterial taxa, notably *Faecalibacterium prausnitzii*, or *Akkermansia muciniphila*, which have been shown to be inversely correlated with weight gain [25, 26].

The antiobesity potential of probiotics is also gaining wide attention. Most human studies conducted so far were not specifically designed to determine effects on body weight, but to determine effects on the biochemical and inflammatory markers related to metabolic disorders. Positive effects of probiotics on adiposity and body weight were only reported in two human intervention trials, and have yet to be corroborated (for review, see [27]). Several animal studies indicated that some probiotics, including lactobacilli and bifidobacteria or mixture of both, can suppress body weight gain in different models of DIO [28] or type 2 diabetes [29] while some probiotic strains have little effect [30, 31] or promote weight gain [32], even if this was associated with growth performance effects linked to better well-being of the host [33]. The potential antiobesity effects of probiotics seem to be dependent of the strains used and the underlying mechanisms governing their effects remain unclear. We and others have highlighted the strain-specific anti-inflammatory capacities of probiotics.

Therefore, since targeting the inflammatory component to limit the progression of obesity towards insulin resistance remains a challenge, we here investigated the effect of probiotic strains selected for their potent anti-inflammatory capacities on high fat diet-induced obese mice. We focused the study on the probiotic impact on WAT macrophage recruitment that represent one of the main pathological mechanisms involved in the development of metabolic syndrome.

## **Materials and Methods**

### **Animals, Bacterial Strains, and Diets**

Male C57BL/6J mice (5-week-old) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France).

The *Lactobacillus* strain *L. salivarius* Ls33 was obtained from Danisco (Madison, WI, USA). The probiotic mixture (referred to as Mix) is composed of the two strains *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21690 and *Bifidobacterium animalis subsp lactis* LMG 23512 (ratio 1:1) obtained from Vésale Pharma (Noville-sur-Mehaigne, Belgium). Both preparations were provided lyophilized (freeze-dried).

High-fat and matched control diets were purchased from Research Diets (New Brunswick, NJ, USA) (gamma-irradiated; respectively, HFD: 60% kcal fat; D12492, and LFD: 10% kcal fat; D12450B).

### **Experimental Design**

Five consecutive days per week, mice received a once-daily oral administration (30 $\mu$ l) of Ls33 ( $10^9$  colony-forming units (CFU) in sterile water (H<sub>2</sub>O) (group Ls33-H<sub>2</sub>O), sterile water (group H<sub>2</sub>O), Mix ( $5 \times 10^8$  CFU of each strain in phosphate buffer saline (PBS) (group Mix-PBS), or PBS (group PBS).

After one week, Ls33-, Mix-, and H<sub>2</sub>O- or PBS-treated mice were randomly assigned to be fed either with LFD (n=5 per group) or HFD (n=15 per group). Body weight and food intake were recorded once a week. Food consumption was estimated by subtracting the amount of remaining food from that of food supplied. Spilled food pellets were carefully collected to ensure the accuracy of food intake measurements. Blood, tissue samples (*i.e.* adipose tissue, liver, spleen, intestine and pancreas) were collected at sacrifice.

### **Intraperitoneal Glucose and Insulin Tolerance Tests**

Glucose tolerance (GTT) and insulin tolerance tests (ITT) were performed after, respectively, 12 and 14 weeks of diets. For GTT, animals were fasted 6-h before intraperitoneal (i.p.) administration of glucose (D-Glucose; 1 g/kg body weight, Sigma-Aldrich, Lyon, France). Blood glucose levels were measured by tail-tip bleeding with an automatic glucometer

(ACCU-CHEK® Performa, Roche, Mannheim, Germany) before and 15, 30, 60, 120 and 180 min after glucose injection. For ITT, 6-h-fasted mice were i.p. injected with porcine insulin (0.75 IU/kg body weight, Sigma-Aldrich). Glucose levels were measured before and 15, 30, 45, 60, and 75 min after insulin injection, as described for GTT.

Homeostatic model for assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as: (fasted serum insulin/fasted serum glucose)/22.5.

### **Blood Analysis**

Plasma levels of leptin, adiponectin, MCP-1 and insulin were measured using specific ELISA kits (for leptin, adiponectin and CCL-2/MCP-1: R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), for insulin: Crystal Chem (Downers Grove, IL, USA). Non-esterified fatty acids (NEFAs), triglyceride, glycerol, HDL cholesterol and LDL/VLDL cholesterol concentrations were determined using quantification kits provided by Abcam (Cambridge, UK).

### **Histological and Immunohistochemical Analysis**

The following tissues and organs were removed and weighed: subcutaneous and epididymal adipose tissues (respectively; SCAT and EWAT), pancreas, spleen, liver and ileum. Liver and AT samples were fixed in 4% (v/v) formalin/PBS, embedded in paraffin and then sectioned for staining with hematoxylin and eosin (H&E). Images were acquired using an optical microscope (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Göttingen, Germany). For the morphometric analysis of the EWAT, at least 10 fields (representing approximately 100 adipocytes) per slide were analyzed using the Image J software (NIH image, National Center for Biotechnology Information).

For immunohistochemical staining, EWAT tissue sections (5 mice per group) were stained with mAb anti-F4/80 (1:250, eBioscience, San Diego, CA, USA). Staining was visualized using peroxidase substrate kit DAB (VECTOR, Burlingame, CA, USA). The specificity of the staining was verified by replacing each primary antibody by nonspecific IgG (Rat IgG1k isotype control (eBRG1) eBiosciences). Staining intensity signals were quantified using Image J software.

### **Gene Expression Analysis (RT-qPCR)**

Adipose tissue fragments were put in RNAlater® (Ambion, Life Technologies, Foster City, CA, USA) and total RNA was extracted using the Trizol® Plus RNA purification kit (Ambion). RNA (1 g) was reverse-transcribed using the High capacity cDNA reverse

transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time (RT) quantitative PCR was performed on the ABI-ViiA7 Real Time PCR system using SYBR green chemistry (Applied Biosystems™). Primers were designed using the software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems) and sequences are available upon request. EeF2 was used as an internal control to normalize gene expression using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [34]. Results are expressed as fold-change compared to the LFD-PBS control group.

### **Caecal microbiota analysis**

Caecal microbiota was assessed using real-time qPCR as previously described [35]. Extraction of total stool DNA was performed using guanidium isothiocyanate and the mechanical bead beating method. Real-time qPCR was performed using an ABI 9700 Sequence Detection System apparatus (Applied Biosystem). Primers, probes and terms of use are described in **Supplementary Table I**. Standard curves were obtained from serial dilutions of a known concentration of plasmid DNA containing a 16S rRNA gene insert from each species or group. The coefficients of correlation between  $\log_{10}$  colony forming units (CFU) and rRNA gene copy numbers for each species and group were obtained from rrnDB [36], enabling calculation of the number of CFU/g of feces. When a species or bacterial group was not detected, the values of 3  $\log_{10}$  CFU/g of feces, *i.e.*, corresponding to about half of the detection limit, was used.

For *Bifidobacterium* identification, specific primers for *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. catenulatum/pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. angulatum* and *B. animalis lactis* were used in a multiplex PCR adapted from Mullié *et al.* and Kwon *et al.* [37, 38]. For *B. pseudolongum* identification, the 16S rRNA gene of the *Bifidobacterium* genus was amplified with primers Bif164f and Bif662r and PCR products were separated on TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis), using a Dcode™ system (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) and analyzed as previously described [39].

### **Ethics Statement**

Animals were housed in specific pathogen-free environment in Pasteur Institute's animal facilities (accredited no.A59107) and maintained in a temperature-controlled ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) facility room with a strict 12-hour dark/light cycle. Housing and experimentations were performed in compliance with European guidelines of laboratory animal care (2010/63/UE) and approved by national and local Animal Ethics Committee (EA 75) and by the Departmental Direction of Veterinary Services (Prefecture of Lille, France; authorization

number: 59-350152). Before experimentation, animals were provided a one week acclimation period and were given *ad libitum* access to regular mouse chow and water.

### **Statistical Analysis**

Data are presented as means  $\pm$  SEM except when mentioned. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis test followed by the non-parametric Mann-Whitney U test. All values were considered significantly significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### **Beneficial Effects of Probiotics on Body Weight and Glucose Homeostasis in Diet-induced Obese Mice are Strain-Specific**

We first assessed the impact of *Lactobacillus salivarius* Ls33 (Ls33) administration on the development of obesity and its associated metabolic alterations, in mice. Compared with the control LFD, HFD-fed animals (HFD-H<sub>2</sub>O) expectedly increased body weight (**Figures 1A and 1B**) and fat mass (both visceral and subcutaneous adipose tissues; respectively: **Figures 1D and 1E**) and developed glucose intolerance (**Figure 1C**). However, despite its potent anti-inflammatory properties [40, 41], Ls33 treatment (HFD-Ls33) had no effect (either beneficial or detrimental) on any of these metabolic parameters.

Conversely, administration of a mixture of the following probiotic strains: *L. rhamnosus* DSM 21690 and *B. animalis subsp lactis* LMG 23512 (hereafter referred to as Mix), showed significant protective effects. Indeed, the HFD-Mix group gained significantly less weight than the HFD-PBS group (respective body weight gains at sacrifice:  $80.97 \pm 4.96$  % vs  $113.51 \pm 4.89$  %;  $p < 0.01$ ) (**Figures 2A and 2B**). As shown on **Figure 2C**, HFD-fed Mix-treated mice displayed slight, yet significant, decreased cumulative food intake ( $p < 0.05$ ). Interestingly, both the effects on body weight and food intake occurred rapidly after Mix administration becoming significant ( $p < 0.05$ ) as soon as the 4<sup>th</sup> week after diet starting for weight gain limitation (**Figure 2A**). We therefore postulated that Mix may have improved glucose homeostasis in HFD-fed mice. The probiotic Mix indeed significantly lowered fasting glucose and insulin levels (**Table I**). Compared to PBS-treatment, HFD-fed mice administered with the mixture displayed lower HOMA-IR value (respectively,  $81.57 \pm 19.63$  vs  $32.04 \pm 5.86$ ;  $p < 0.01$ ), indicating greater insulin sensitivity which was confirmed by an insulin tolerance test (**Figure 3A**). Accordingly, Mix-treated mice were less intolerant to ip-glucose injection (**Figure 3B**). Moreover, while Mix treatment had no effect on non-esterified fatty acid (NEFA), glycerol or triglyceride levels, it lowered total cholesterol and HDL cholesterol (**Table I**).

### **The Probiotic Mixture Treatment limits the Adipose Tissue Mass and Adipocyte Size of Diet-induced Obese Mice**

Compared to HFD-fed PBS-treated mice, HFD-fed Mix-treated animals showed a marked decrease in the mass of both perigonadal and subcutaneous adipose tissue depots (**Figures 4A and 4B**) (respective decreases: 1.25-fold ( $p < 0.05$ ) and 1.75-fold ( $p < 0.01$ )). In addition, HFD-

Mix mice displayed a decrease in the mass of pancreas, liver and spleen (**Supplementary Figure 1**). Moreover, HFD-PBS mice developed hepatic steatosis, characterized by lipid droplets accumulation in the tissue. Importantly, administration of the probiotic mixture alleviated hepatic steatosis (**Supplementary Figure 2**).

In line with reduced fat accumulation, blood leptin levels were significantly lower in the HFD-Mix group (**Figure 4C**), whilst adiponectin levels were higher, yet without reaching significant difference ( $p = 0.4$ ) (**Figure 4D**). Histological examination of epididymal adipose tissue sections showed a higher density of smaller adipocytes in the HFD-Mix group (**Figure 4E**), which was confirmed by morphometric analysis (**Figure 4F** and **Table II**) ( $41.2 \pm 11.2$  % adipocytes with a diameter  $<60$   $\mu\text{m}$  for HFD-PBS mice vs  $62 \pm 11.2$  % for HFD-Mix mice;  $p < 0.05$ ). Importantly, whereas the adipose tissue of HFD-PBS mice was markedly infiltrated with cells surrounding adipocytes (indicated by arrows), tissue sample of mice that received the probiotic mix was less infiltrated (**Figure 4E**).

### **The Probiotic Mixture Treatment counteracts Macrophage Recruitment and Inflammatory Tone of Adipose Tissue of Diet-induced Obese Mice**

Since macrophage is the main cell-type known to invade the expanding adipose tissue [7], we analyzed whether infiltrating cells might belong to the monocyte/macrophage lineage. Therefore, we performed real-time quantitative PCR to compare the expression levels of several monocyte/macrophage lineage specific markers (*e.g.*, *Cd68*, *F4/80*, *Cd11c* and *Cd11b*) in adipose tissue samples. As expected, the expression of all these markers was strongly enhanced in the WAT of PBS-treated HFD-fed mice, when compared to the PBS-treated LFD-fed mice tissue. In opposite, monocyte/macrophage specific marker expression was drastically reduced in the adipose tissue of Mix-treated HFD-fed mice. The impact of this probiotic treatment on macrophage recruitment is further supported by the decreased expression of *Ccl2/Mcp-1* (**Figure 5A**). Immunohistochemistry on adipose tissue sections using macrophage-specific F4/80 antibodies confirmed that the mixture had decreased obesity-induced macrophage recruitment (**Figure 5B**) as quantified by the estimation of the surface occupied by specific staining (2.7-fold increase between LFD-PBS and HFD-PBS;  $p < 0.01$ , and 2.7-fold decrease between HFD-PBS and HFD-Mix;  $p < 0.01$ ).

Macrophage infiltration into adipose tissue initiates inflammation; we thus assessed the inflammatory status of the tissue. We compared the expression levels of pro-inflammatory cytokines (*e.g.* *Tnf*, *Il-1*, *Il-1*, *Il-6* and *Il-17*) (**Figure 5C**). It showed that the mixture had

no effect on the expression level of *Il-1* (data not shown), while it slightly decreased *Il-6* expression ( $p = 0.4$ ) and significantly reduced the expression of *Tnf- $\alpha$* , *Il-1* and *Il-17*.

### **The Probiotic Mixture enhances Adipose Tissue Regulatory T-cells markers in Diet-induced Obese Mice**

Whilst macrophages are recruited in the adipose tissue during the development of obesity [7], regulatory T-cells (Tregs) oppositely emigrate from this tissue [17]. We indeed found decreased expression of *FoxP3* Treg marker in the adipose tissue of HFD-PBS mice, when compared to LFD-PBS animals. Importantly enough, we showed a significant increased expression level of *FoxP3* in the adipose tissue of Mix-treated HFD-fed mice. Enhanced *FoxP3* expression was associated with an increased expression of *PPAR $\gamma$* , the master driver of adipose Treg accumulation, phenotype and function [42] (**Figure 6**).

### **The Probiotic Mixture impacts on the Microbiota Composition of Diet-Induced Obese Mice**

HFD induced dramatic changes in gut microbiota (**Figure 7**) with a significant decrease in total bacteria ( $p < 0.01$ ) and in *C. coccoides* group ( $p < 0.05$ ), a significant increase in enterococci ( $p < 0.01$ ), and an emergence of bifidobacteria and of staphylococci (**Figure 7A**). Indeed colonization with staphylococci was observed in 7 out of 10 HFD-PBS mice (median  $6.7 \log_{10}$  of CFU/g of feces,  $p < 0.05$ ) but in none of the LFD-PBS mice. Similarly, the presence of bifidobacteria was not detected in LFD-PBS mice, while observed in all HFD-PBS mice except one (median  $7.3 \log_{10}$  of CFU/g of feces,  $p < 0.01$ ). The bifidobacteria present in HFD-PBS mice were identified by TTGE as *B. pseudolongum* (**Figure 7B**), since not detected with the specific primers for *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. catenulatum/pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. angulatum* and *B. animalis lactis*. The treatment with the probiotic mixture induced a modification of bifidobacteria population: *B. pseudolongum* was no longer detected to the benefit of the administered probiotic strain *B. animalis* subsp. *Lactis* (**Figure 7B**). The probiotic mixture also induced a decrease in *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* group both under low- (LDF-Mix) and high- fat (HFD-Mix) diet ( $p < 0.01$ ), and, despite non significant, a decrease in staphylococci colonization. Colonization levels of *E. coli* (representing Enterobacteriaceae), *C. leptum* group and *Bacteroides-Prevotella* group were impacted neither by the diet nor by the probiotic supplementation.

## Discussion

Accumulating evidence indicates that the gut microbiota plays a significant role in the development of obesity, obesity-associated inflammation and insulin resistance. Obesity has been linked with alterations in the gut microbiota in animals and humans, suggesting potential causality between specific microbial taxa or gene functions and this disorder. Initially, it has been reported that in obese mice and humans the *Firmicutes* were more abundant and the *Bacteroidetes* population was depressed, compared with lean controls [20, 21]. Despite conflicting evidence on the composition of the obese microflora phenotype with regards to *Bacteroidetes/Firmicutes* ratio [43, 44], it is clear that profound microbial changes are associated with obesity thus providing the rationale for targeting the microbiota to prevent or treat metabolic diseases. Emerging therapeutic options to favorably alter the intestinal microbiota are antibiotic treatment, faecal transplantation or, more commonly used, administration of prebiotics, probiotics or synbiotics. Since the majority of probiotic bacterial species naturally inhabit the gut, their use is presently regarded as very safe. Therefore, probiotics may represent a reliable mean to restore a healthy balance of microbial species.

Obesity is also associated with systemic low-grade inflammation which is a major cause of obesity-related complications like fatty liver and insulin resistance. Thus, we here evaluated the consequences of the daily consumption of probiotic bacterial strains previously selected for their powerful anti-inflammatory potential, on the development of obesity in mice. Despite its protective anti-inflammatory activity in a model of inflammatory bowel disease [40, 41, 45], the *Lactobacillus salivarius* Ls33 strain had no detectable effect on high-fat diet (HFD)-fed mice, either beneficial or detrimental. These results are in accordance with a recent clinical study conducted in obese adolescents that reported no effect of 12-week probiotic intervention with Ls33 on a series of biomarkers related to inflammation and metabolic syndrome [46]. In opposite, the daily administration of a combination of the *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21690 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LMG 23512 to HFD-fed mice significantly reduced adiposity, body weight, and weight gain and decreased insulin resistance. Furthermore, decreased inflammation and remodeling of white adipose tissue (WAT) immune cell composition were found as the underlying mechanisms of action of the selected probiotic mixture on metabolism and adiposity.

Aside from preadipocytes, adipocytes, fibroblasts and endothelial cells, WAT also contains almost all immune cell types [47, 48]. These cells increasingly appear to play a central role in the initiation and progression of adipose tissue inflammation which contributes to the onset of

insulin resistance. Although their recruitment kinetics are different, total numbers of T cells, B cells, macrophages, neutrophils and mast cells are increased in the WAT of obese mice and humans [7, 49-53]. By contrast, specific T-cell subsets such as Th2 cells, regulatory T cells (Tregs) and invariant natural killer T (iNKT) cells as well as eosinophil and regulatory B cell numbers are decreased [54-57]. Macrophages are the most abundant immune cells found in the adipose tissue and are at the center of WAT inflammation [7, 58]. We confirmed that HFD is associated with increased WAT macrophage accumulation, as revealed by specific immunostaining as well as by the higher expression levels of macrophage-specific markers such as *F4/80*, *Cd68* and *Cd11c* and of the chemokine *Mcp-1* that is a key contributor of macrophage infiltration into the adipose tissue [11]. Importantly, we showed that the daily consumption of the selected probiotic mixture drastically reduced HFD-related WAT macrophages recruitment. Consequently, the adipose tissue of Mix-treated HFD-fed mice was significantly less inflamed than the HFD tissue, as reflected by the decreased expression levels of the inflammatory cytokines *Tnf*, *Il-1* or *Il-17*. The role of the Th17 specific cytokines IL-17 and IL-23 has not been thoroughly investigated in the obese adipose tissue; however our results are in line with the description of increased body weight of IL-17-deficient mice [59].

We also confirmed that HFD correlates with decreased Tregs in the adipose tissue, as appreciated from the reduced expression level of *FoxP3*, a transcription factor that serves as a lineage specification factor of Treg cells [60]. Interestingly enough, *FoxP3* expression level was enhanced in the adipose tissue of Mix-treated HFD-fed animals. Tregs generally play a suppressive role in inflammatory diseases and protect obese mice against excessive inflammation, by secreting anti-inflammatory cytokines [17]. Recently, PPAR $\gamma$  has been described as being crucial for Treg functions in the adipose tissue [42] and we showed here that, whilst PPAR $\gamma$  expression expectedly decreased in the adipose tissue of HFD-fed mice, this reduction was significantly lower in the tissue of Mix-treated HFD-fed animals.

In addition to its master role in adipocyte differentiation [61], and in metabolic homeostasis, PPAR $\gamma$  also exerts anti-inflammatory functions, notably through the inhibition of the nuclear factor-kappaB (NF $\kappa$ B) pathway [62]. This anti-inflammatory effect is involved in insulin sensitivity and PPAR $\gamma$  agonists (*e.g.* thiazolidinediones (TZD) or pioglitazone (Pio)) are currently used as insulin sensitizers to treat type 2 diabetes and metabolic syndrome. Moreover, PPAR $\gamma$  expression by WAT Tregs is crucial for TZD or Pio-induced restoration of insulin sensitivity in obese mice [42]. It has been reported that certain commensal bacteria or

probiotic strains can exhibit anti-inflammatory capacities, notably by promoting nuclear export of NF- $\kappa$ B subunit relA through a PPAR  $\alpha$ -dependent pathway [63]. Nevertheless, further studies are definitely warranted to define if our selected probiotic mixture impact on adipose tissue PPAR  $\alpha$ -expressing Tregs, thereby correcting the inflammation-driven metabolic dysfunction.

In line with reduced adiposity and decreased inflammation, the probiotic mixture expectedly protected mice from HFD-induced hyperglycemia and hyperinsulinemia and ameliorated whole-body glucose and insulin sensitivity. The better insulin sensitive state of Mix-treated HFD-fed mice, compared to HFD animals, is likely to partly result from preserved liver insulin sensitivity. Indeed, we showed that Mix protected mice from fatty liver disease, as shown by significant decreased deposition of triglycerides in liver cells, improving HFD-induced hepatic steatosis and, thus, insulin sensitivity. The beneficial effect of the selected probiotic mixture on liver is also reflected by the prevention from HFD-associated dyslipidemia, as shown by the significant reduction of hypercholesterolemia. This signifies that our selected probiotic combination may also protect from the development of hepatic as well as cardiovascular complications associated with obesity, as was reported for other probiotic strains [64-66].

Importantly, we showed that these changes in metabolic and immune parameters were associated with modifications in the composition of the intestinal microbiota. A significant decrease in total bacteria and in the *Clostridium coccoides* group and a significant increase in enterococci and an emergence of bifidobacteria and of staphylococci were observed in HFD-fed mice. The probiotic mixture induced a decrease in *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* group and in staphylococci colonization. Surprisingly, while the presence of bifidobacteria was not detected in LFD-PBS mice, the presence of *B. pseudolongum* was identified in HFD-PBS mice while only the administered probiotic strain *B. animalis* subsp. *lactis* was detected in Mix-treated mice. Some studies have reported that diet-induced obesity in mice markedly affects the gut microbial community; with the levels of *Bifidobacterium* spp. being significantly reduced, in accordance with the observation in humans [67]. Non-digestible carbohydrates, known to promote bifidobacteria development in the gut, are frequently used as prebiotics [68]. The administration of carbohydrates in obese animals validated the beneficial role of bifidobacteria, since their increase represents the major and common signature of the improvement of obesity-related metabolic alterations by prebiotics. However, our results indicated that the beneficial effect of bifidobacteria in obesity is obviously strain-specific. Indeed, we showed the emergence of endogenous *B. pseudologum*

in HFD-fed mice and a protective effect of *B. animalis* in Mix-treated HFD-fed mice. The beneficial effects of prebiotics are mainly attributed to their capacity to improve the gut barrier, notably through the increased production of the endogenous proglucagon-derived peptides GLP-1 and GLP-2; thus counteracting endotoxemia and inflammation associated with obesity [69-72]. In addition, the protective effects of prebiotics are associated with an inhibition of PPAR $\gamma$  and PPAR $\gamma$  target genes expression [73]. In our model however, we showed that the protective effects of the probiotic mixture was associated with PPAR and PPAR-related genes overexpression (data not shown), likely explaining the beneficial impact of the probiotics on glucose homeostasis. Additionally, we could not evidence any impact of the mixture on the intestinal permeability (data not shown).

In conclusion, we reported here beneficial metabolic effects resulting from the daily consumption of a combination of probiotics, in obese mice. We showed that the mixture led to adipose tissue cell-remodeling; with reduced macrophage recruitment and enhanced levels of regulatory T-cells. In addition, the increased expression and activation of PPAR in the adipose tissue may represent the molecular mechanism through which our selected probiotics favored Tregs accumulation and insulin-sensitizing functions. Numerous studies already reported that certain probiotics can protect from body weight gain in HFD experimental settings, yet the effects were quite limited when using either different lactobacilli strains [43, 74-76] or bifidobacteria [77]. Treatment with *L. reuteri* limited weight gain but did not improve insulin resistance [78] while *L. gasseri* limited weight gain, fat mass and adipocyte size as well as insulin and leptin levels [79]. Recently, convincing results were also reported for the VSL#3 probiotic mixture which prevented and treated obesity and diabetes in several mouse models [80]. On the other hands, some probiotics have been shown to favor weight gain [32] but this effect was later shown to rather rely on a better well-being of the host, thereby ameliorating growth performance [33, 81]. Therefore, it is admitted that therapeutic manipulation of the microbiota may be a useful strategy in the prevention or management of obesity and metabolic disorders and that different probiotics may exhibit beneficial effects through different mechanisms. The clinical impact and the precise molecular mechanisms of these probiotics remain to be identified but we believe that our results indicate that multiple strain probiotics might be more effective than single-strain probiotics against obesity and related metabolic disorders.

## Legends to Figures

**Figure 1. *L. salivarius* Ls33 strain did not counteract diet-induced obesity.** (A) Time course of body weight gain (expressed as percentage from body weights at day 0) of mice receiving Ls33 or H<sub>2</sub>O and fed either a low-fat (LFD) or a high-fat diet (HFD) for a 15-week period. (B) Mean of body weights (in g) at sacrifice. (C) Glucose tolerance test after 12 weeks of regimen. Blood glucose levels (in mg/dl) were measured in 6 hours fasted mice (T0) at the indicated times after intra-peritoneal (i.p.) glucose injection. (D) Epididymal adipose tissue (EWAT) mass (in g). (E) Subcutaneous adipose tissue (SCWAT) mass (in g).

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 10 to 15 mice per group. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . \* corresponds to the comparison of HFD vs LFD within the same administration group (regimen effect).

**Figure 2. The probiotic mixture improved body weight gain.** (A) Evolution of body weight gain (expressed as percentage from body weights at day 0) and corresponding AUC of mice receiving the mixture (Mix) or PBS and fed LFD or HFD for 17 weeks. (B) Body weights (in g) at sacrifice. (C) Cumulative food intake (g/day/mouse).

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 5 to 14 mice per group. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; #  $p < 0.05$ , ##  $p > 0.01$ , ###  $p < 0.001$ . \* corresponds to the comparison of HFD vs LFD within the same administration group (regimen effect). # corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group (treatment effect).

**Figure 3. The probiotic mixture improved obesity-induced insulin resistance.** (A) Insulin tolerance test (ITT) and corresponding AUC after 14 weeks of regimen. Blood glucose levels were measured in 6 hours fasted mice (T0) and at the indicated times after insulin administration. Results are presented as mean percentage of basal glycemia (T0) from average values  $\pm$  S.E.M. (B) Glucose tolerance test (GTT) and corresponding AUC after 12 weeks of regimen. Blood glucose levels (mg/dl) were measured in 6 hours fasted mice (T0) and at the indicated times after glucose injection.

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 5 to 14 mice per group. \*\*\*  $p < 0.001$ ; ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ . \* corresponds to the comparison of HFD vs LFD within the same administration group (regimen effect). # corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group (treatment effect).

**Figure 4. The probiotic mixture protected from obesity-induced adipose tissue mass increase and adipocyte size enhancement.** (A) Epididymal adipose tissue (EWAT) mass (in g). (B) Subcutaneous adipose tissue (SCWAT) mass (in g). (C) Blood levels of leptin (in ng/ml) measured by ELISA in the sera of 6-hours fasted mice. (D) Blood levels of adiponectin (in ng/ml) measured by ELISA in the sera of 6-hours fasted mice. (E) Representative sections of H&E-stained EWAT. Scale bars represent 100µm. Black arrows indicate infiltrating cells. (F) Adipocyte size distribution. Results are presented as percentage of adipocytes per cell-size class.

Data are expressed as mean ± S.E.M. of 10 to 15 mice per group. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ . \* corresponds to the comparison of HFD vs LFD within the same administration group (regimen effect). # corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group (treatment effect).

**Figure 5. The probiotic mixture counteracted adipose tissue macrophage recruitment and decreased WAT inflammation.** (A) Expression levels of macrophage specific genes (*F4/80*, *Cd68*, *Cd11b* and *Cd11c*) and of the chemoattractant factor *Mcp-1* by RT-qPCR analysis of the EWAT after 17 weeks of regimen (normalized to *Eef2* expression). (B) Representative sections of F4/80 immunostained EWAT of mice. Scale bars represent 100µm. F4/80 immunostaining intensity signals were quantified by Image J. (C) Expression levels of inflammatory cytokines (*Tnfa*, *Il-1α*, *Il-6* and *Il-17*) by RT-qPCR analysis of the EWAT, after 17 weeks of regimen (normalized to *Eef2* expression).

Data are expressed as mean ± S.E.M. of 5 to 14 mice per group. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p > 0.0001$  (regimen effect). \* corresponds to the comparison of HFD vs LFD within the same administration group. # corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group (treatment effect).

**Figure 6. Mice treated with the probiotic mixture exhibited increased adipose tissue expression of FoxP3 and PPAR genes.** (A) Expression levels of T -cell markers (*Cd4* and *FoxP3*) and of the transcription factor *PPARγ* by RT-qPCR analysis of the EWAT, after 17 weeks of regimen (normalized to *Eef2* expression).

Data are expressed as mean ± S.E.M. of 5 to 14 mice per group. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ . \* corresponds to the comparison of HDF vs LFD within the same

administration group (regime effect). # corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group (treatment effect).

**Figure 7. The probiotic mixture impacted on the HFD-induced modification of the microbiota composition.** (A) Level of colonization with main facultative anaerobic and strict anaerobic groups represented as a box plot. The box plot shows median (central horizontal line), the 25<sup>th</sup> centile (lower box border), and the 75<sup>th</sup> centile (upper box border). The lower and upper horizontal lines refer to the 10<sup>th</sup> and the 90<sup>th</sup> centile, respectively. (B) Identification of Bifidobacteria at the species level using TTGE for individual mice from HFD-PBS and HFD-Mix groups. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ . \* Correspond to the comparison of HFD vs LFD within the same administration group (regimen effect); # corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group (treatment effect).

**Table 1****Insulin, glucose and lipid blood levels in PBS vs Mix LFD- or HFD-fed mice.**

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 5 to 14 mice per group. \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001; # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01, ### $p$ <0.001. \* corresponds to the comparison of HFD vs LFD within the same administration group (regimen effect). # corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group (treatment effect).

**Table 2****Adipocyte-size distribution in PBS vs Mix LFD- or HFD-fed mice.**

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 5 to 7 mice per group. \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001; # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01, ### $p$ <0.001. \* corresponds to the comparison of HFD vs LFD within the same administration group (regimen effect). # corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group (treatment effect).

### **Supplementary Figure 1**

Pancreas, liver and spleen masses (in g). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ .

\*corresponds to the comparison of HDF vs LFD within the same administration group

(regimen effect). #corresponds to the comparison of Mix vs PBS in the same diet group

(treatment effect).

### **Supplementary Figure 2**

Representative sections of H&E-stained liver. Scale bars represent 100 $\mu$ m.

## **Acknowledgements**

The authors thank the staff of the animal facility of the Pasteur Institute in Lille and also Johanne Delannoy (Intestinal Ecosystem, Probiotics, Antibiotics, Université Paris Descartes, France) for her fruitful help on microbiota analysis. We are also very grateful to Danisco and Vésale for supplying, respectively, Ls33 and the bacterial mix.

This work was financially supported by “*Fondation pour la Recherche Médicale*” (FRM), the Institut Pasteur de Lille, the “*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* » (Inserm) and the “*Centre National de la Recherche Scientifique* » (CNRS). KM was funded by a PhD fellowship from Lille 2 university.

## **Contribution statement**

CG and IW designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript. CG, IW, JA, VV, and VP contributed to animal experiments. KM, JA and ST did histology, immunohistochemistry, Q-PCR and ELISA as well as analyzed data and wrote the manuscript. AJWD and IM performed the analysis of the microbiota and participated to the writing of the manuscript. BP and PF contributed to writing the manuscript and scientific discussion. CG is the guarantor of this work and, as such, had full access to data and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

## References

1. Gregor MF and Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29: 415-445.
2. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL and Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415.
3. Zou C and Shao J (2008) Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. *J Nutr Biochem* 19: 277-286.
4. Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, et al. (2005) Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8: 347-354.
5. Cancellò R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, et al. (2005) Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surg ery-induced weight loss. *Diabetes* 54: 2277-2286.
6. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, et al. (2006) Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 49: 744-747.
7. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, et al. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808.
8. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830.
9. Satoh N, Shimatsu A, Himeno A, Sasaki Y, Yamakage H, et al. (2010) Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. *Diabetes Care* 33: e7.
10. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, et al. (2006) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281: 26602-26614.
11. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, et al. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116: 1494-1505.
12. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, et al. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116: 115-124.
13. Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N and Levy R (2008) Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* 49: 1894-1903.
14. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, et al. (2010) Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 193-199.

15. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, et al. (2009) CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15: 914-920.
16. Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, et al. (2009) Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol* 39: 2629-2635.
17. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, et al. (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15: 930-939.
18. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
19. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF and Gordon JI (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 979-984.
20. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, et al. (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11070-11075.
21. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S and Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.
22. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, et al. (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 1: 6ra14.
23. Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, et al. (2008) Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *Faseb J* 22: 2416-2426.
24. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772.
25. Delzenne NM, Neyrinck AM and Cani PD (2013) Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *Br J Nutr* 109 Suppl 2: S81-85.
26. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, et al. (2011) Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9066-9071.
27. Sanz Y, Rastmanesh R and Agostoni C (2013) Understanding the role of gut microbes and probiotics in obesity: how far are we? *Pharmacol Res* 69: 144-155.
28. Yoo SR, Kim YJ, Park DY, Jung UJ, Jeon SM, et al. (2013) Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in Combination Alter Hepatic Lipid Metabolism and Suppress Diet-Induced Obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21: 2571-2578.
29. Yun SI, Park HO and Kang JH (2009) Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *Journal of applied microbiology* 107: 1681-1686.
30. Murphy EF, Cotter PD, Hogan A, O'Sullivan O, Joyce A, et al. (2013) Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut* 62: 220-226.

31. Sato M, Uzu K, Yoshida T, Hamad EM, Kawakami H, et al. (2008) Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr* 99: 1013-1017.
32. Angelakis E and Raoult D (2010) The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. *PLoS One* 5: e10463.
33. Bernardeau M, Vernoux JP and Gueguen M (2002) Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *Int J Food Microbiol* 77: 19-27.
34. Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
35. Kalach N, Kapel N, Waligora-Dupriet AJ, Castelain MC, Cousin MO, et al. (2013) Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clin Chem Lab Med* 51: 351-361.
36. Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR and Schmidt TM (2001) rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res* 29: 181-184.
37. Kwon HS, Yang EH, Lee SH, Yeon SW, Kang BH, et al. (2005) Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 250: 55-62.
38. Mullie C, Odou MF, Singer E, Romond MB and Izard D (2003) Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. *FEMS Microbiol Lett* 222: 129-136.
39. Mangin I, Suau A, Magne F, Garrido D, Gotteland M, et al. (2006) Characterization of human intestinal bifidobacteria using competitive PCR and PCR-TTGE. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 28-37.
40. Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, et al. (2007) Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 13: 236-243.
41. Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, et al. (2007) A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One* 2: e313.
42. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, et al. (2012) PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486: 549-553.
43. Karlsson CL, Onnerfalt J, Xu J, Molin G, Ahrne S, et al. (2012) The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)* 20: 2257-2261.
44. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, et al. (2012) Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog* 53: 100-108.
45. Macho Fernandez E, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, et al. (2011) Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by

- NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 60: 1050-1059.
46. Gobel RJ, Larsen N, Jakobsen M, Molgaard C and Michaelsen KF (2012) Probiotics to adolescents with obesity: effects on inflammation and metabolic syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55: 673-678.
  47. Cildir G, Akincilar SC and Tergaonkar V (2013) Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol Med* 19: 487-500.
  48. Makki K, Froguel P and Wolowczuk I (2013) Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *IRSN Inflammation* In press.
  49. Bird PI, Trapani JA and Villadangos JA (2009) Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. *Nat Rev Immunol* 9: 871-882.
  50. Divoux A, Moutel S, Poitou C, Lacasa D, Veyrie N, et al. (2012) Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E1677-1685.
  51. Matter CM and Stein MA (2009) A dual role of CD4+ T cells in adipose tissue? *Circ Res* 104: 928-930.
  52. Talukdar S, Oh da Y, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, et al. (2012) Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* 18: 1407-1412.
  53. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, et al. (2011) B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17: 610-617.
  54. Eller K, Kirsch A, Wolf AM, Sopper S, Tagwerker A, et al. (2011) Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes* 60: 2954-2962.
  55. Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, et al. (2012) Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37: 574-587.
  56. Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, et al. (2013) Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metab*.
  57. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, et al. (2011) Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332: 243-247.
  58. Lumeng CN, Bodzin JL and Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-184.
  59. Zuniga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, et al. (2010) IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 185: 6947-6959.
  60. Rudensky AY (2011) Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 241: 260-268.
  61. Spiegelman BM, Hu E, Kim JB and Brun R (1997) PPAR gamma and the control of adipogenesis. *Biochimie* 79: 111-112.
  62. Remels AH, Langen RC, Gosker HR, Russell AP, Spaapen F, et al. (2009) PPARgamma inhibits NF-kappaB-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E174-183.

63. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, et al. (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 5: 104-112.
64. Gratz SW, Mykkanen H and El-Nezami HS (2010) Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World J Gastroenterol* 16: 403-410.
65. Lourens-Hattingh A and Viljoen BC (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 11: 1-17.
66. Ma X, Hua J and Li Z (2008) Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol* 49: 821-830.
67. Teixeira TF, Grzeskowiak L, Franceschini SC, Bressan J, Ferreira CL, et al. (2013) Higher level of faecal SCFA in women correlates with metabolic syndrome risk factors. *Br J Nutr* 109: 914-919.
68. Roberfroid M (2007) Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 137: 830S-837S.
69. Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, et al. (2006) Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 55: 1484-1490.
70. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, et al. (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50: 2374-2383.
71. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, et al. (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481.
72. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, et al. (2009) Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58: 1091-1103.
73. Dewulf EM, Cani PD, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, et al. (2011) Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPARgamma-related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *J Nutr Biochem* 22: 712-722.
74. An HM, Park SY, Lee do K, Kim JR, Cha MK, et al. (2011) Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis* 10: 116.
75. Hamad EM, Sato M, Uzu K, Yoshida T, Higashi S, et al. (2009) Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *Br J Nutr* 101: 716-724.
76. Takemura N, Okubo T and Sonoyama K (2010) *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp Biol Med (Maywood)* 235: 849-856.
77. Chen J, Wang R, Li XF and Wang RL (2012) *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 107: 1429-1434.

78. Fak F and Backhed F (2012) *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One* 7: e46837.
79. Kang JH, Yun SI, Park MH, Park JH, Jeong SY, et al. (2013) Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoS One* 8: e54617.
80. Yadav H, Lee JH, Lloyd J, Walter P and Rane SG (2013) Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J Biol Chem* 288: 25088-25097.
81. Vendt N, Grunberg H, Tuure T, Malminiemi O, Wuolijoki E, et al. (2006) Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial. *J Hum Nutr Diet* 19: 51-58.

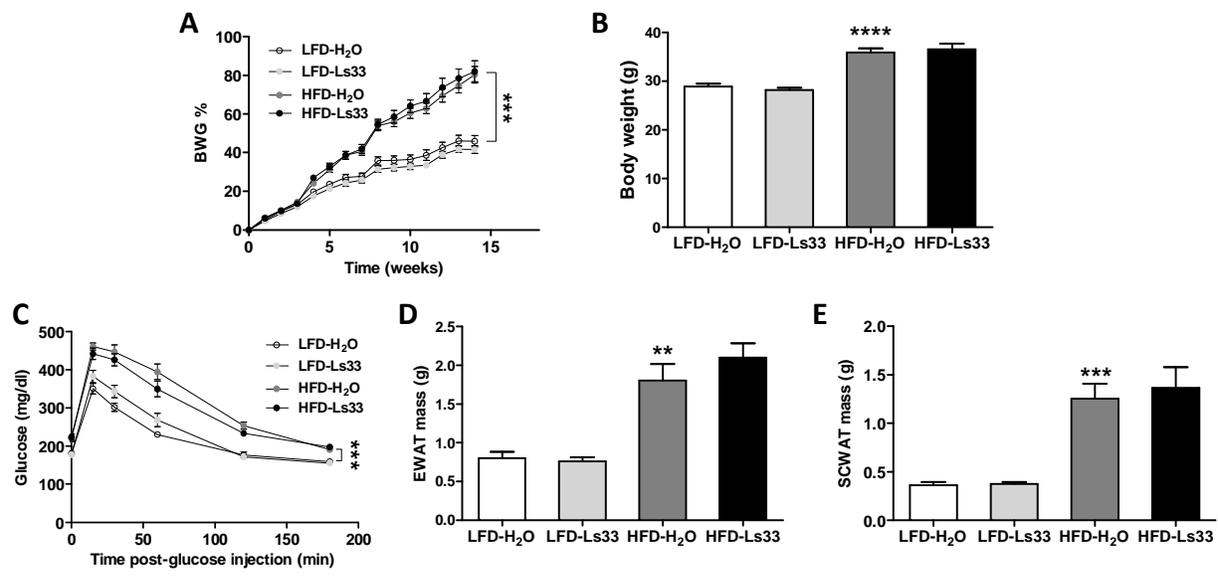


Figure 1

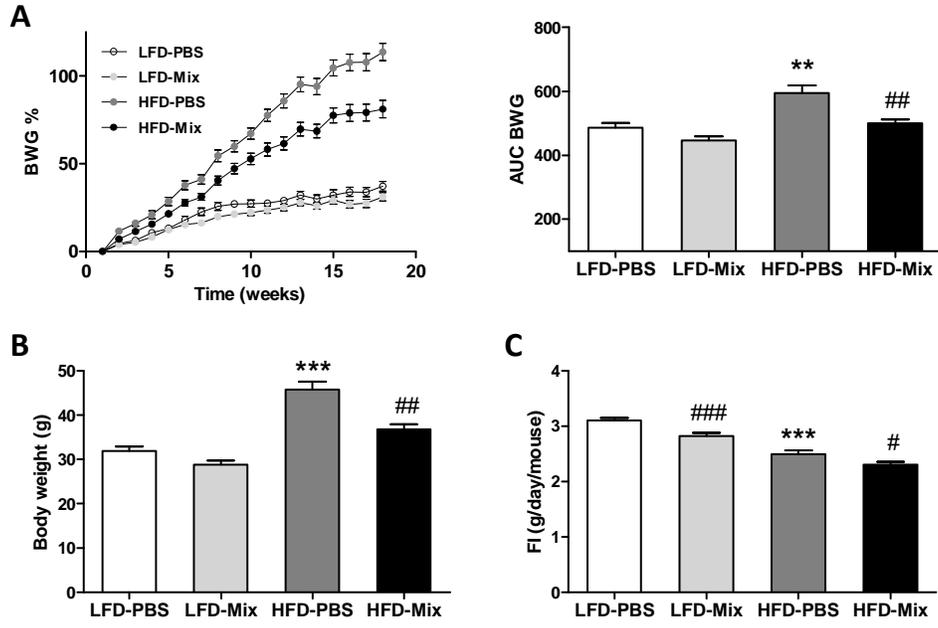


Figure 2

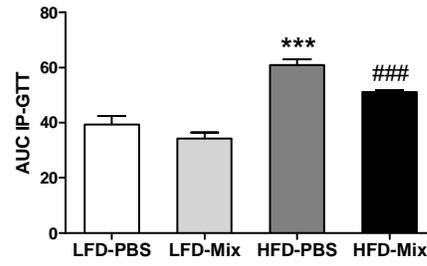
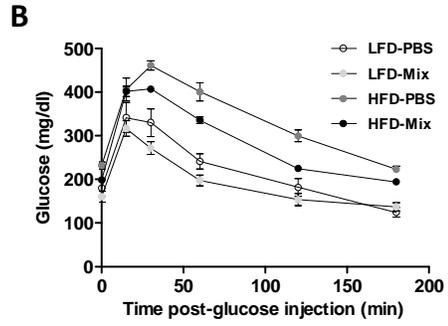
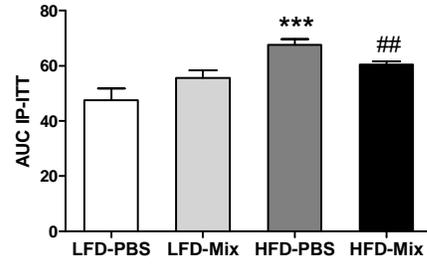
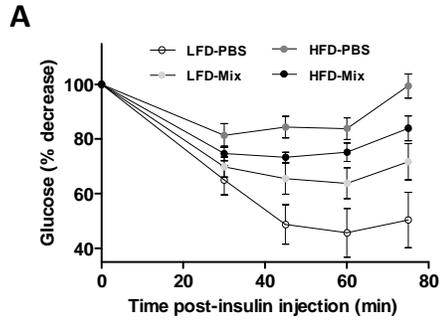


Figure 3

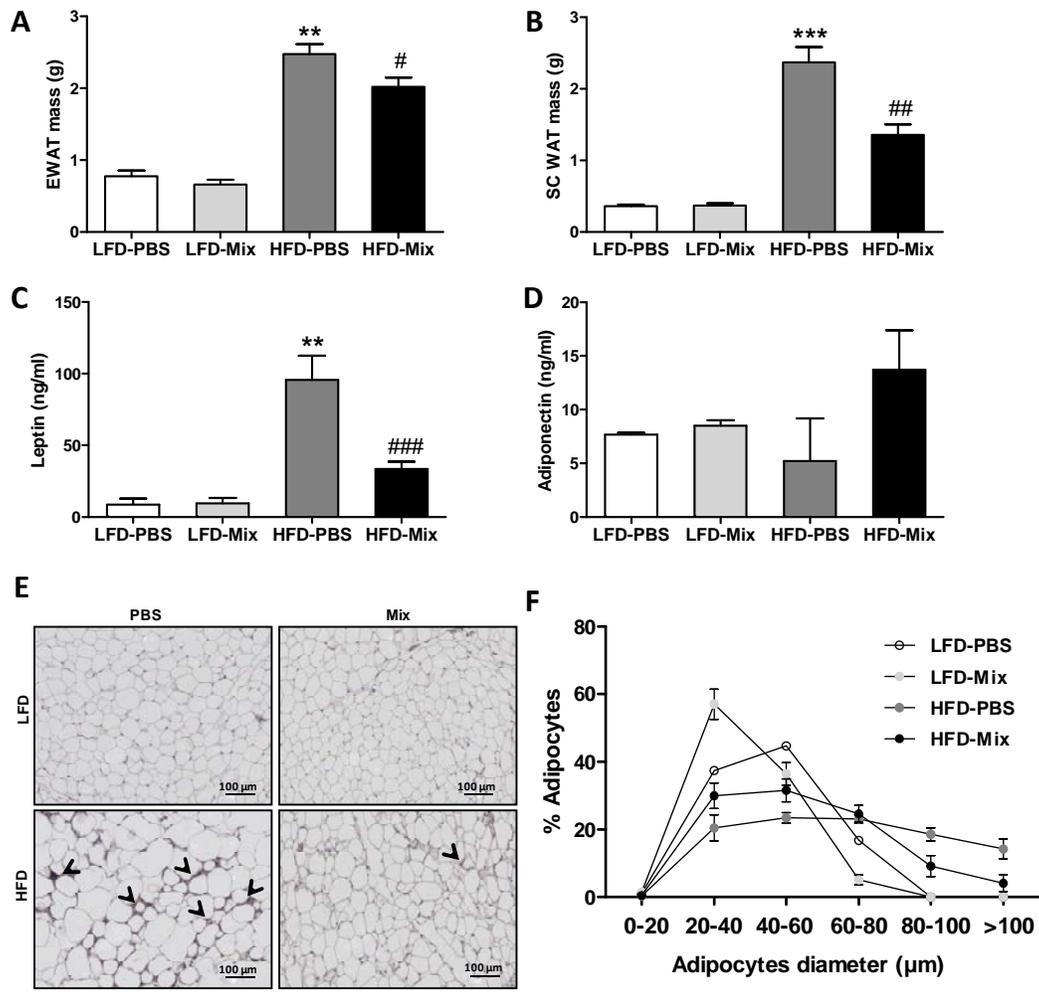


Figure 4

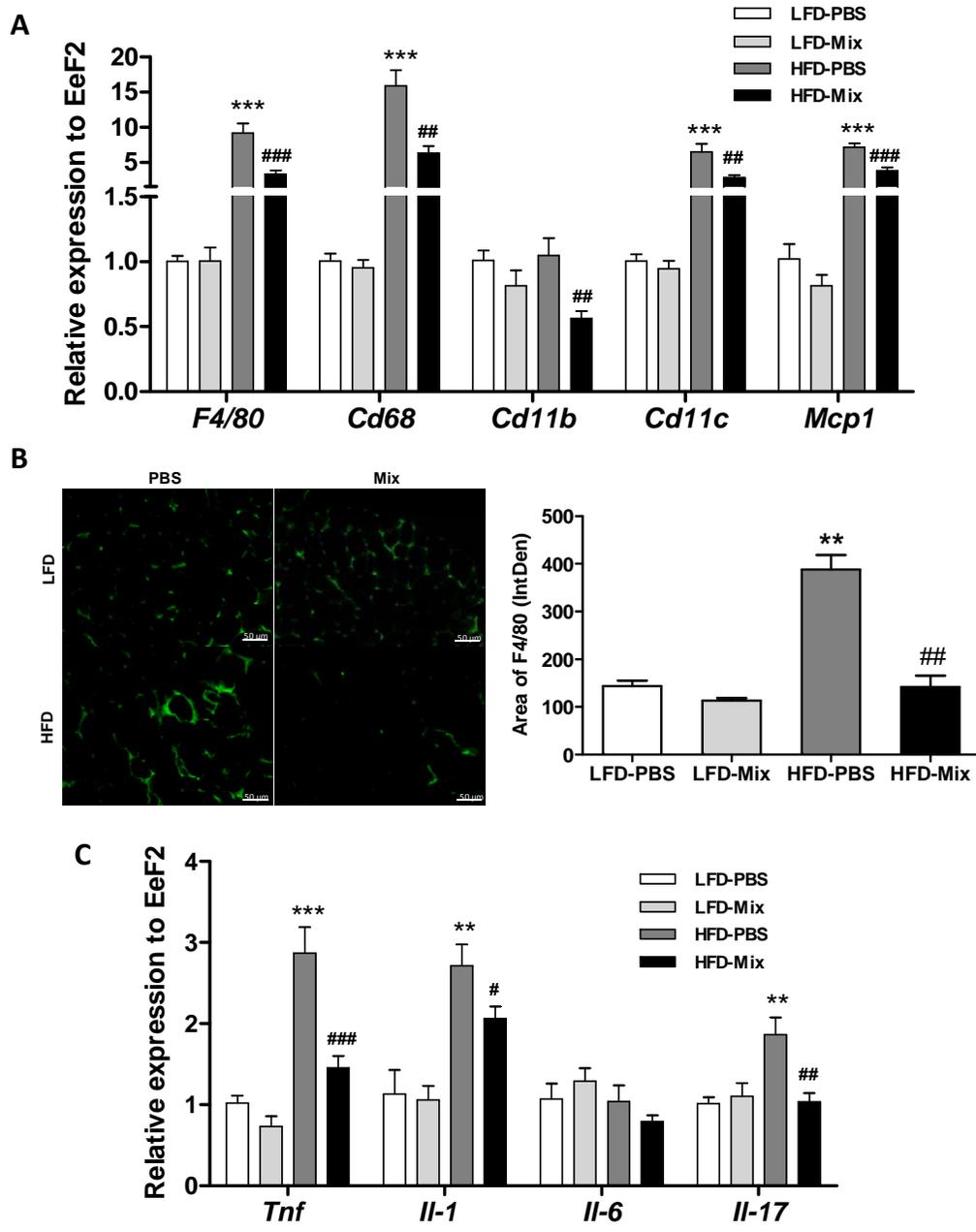


Figure 5

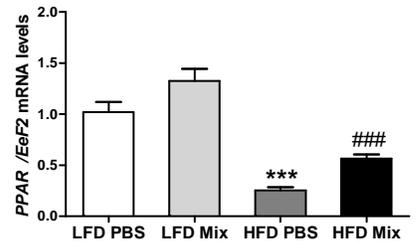
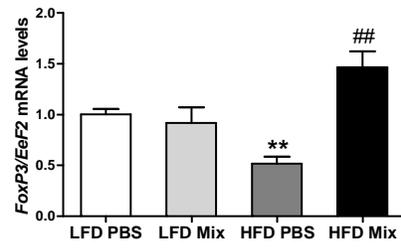
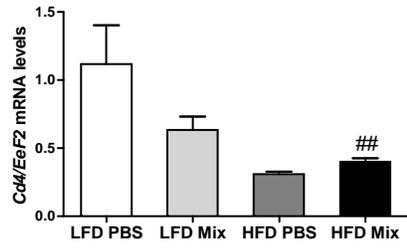
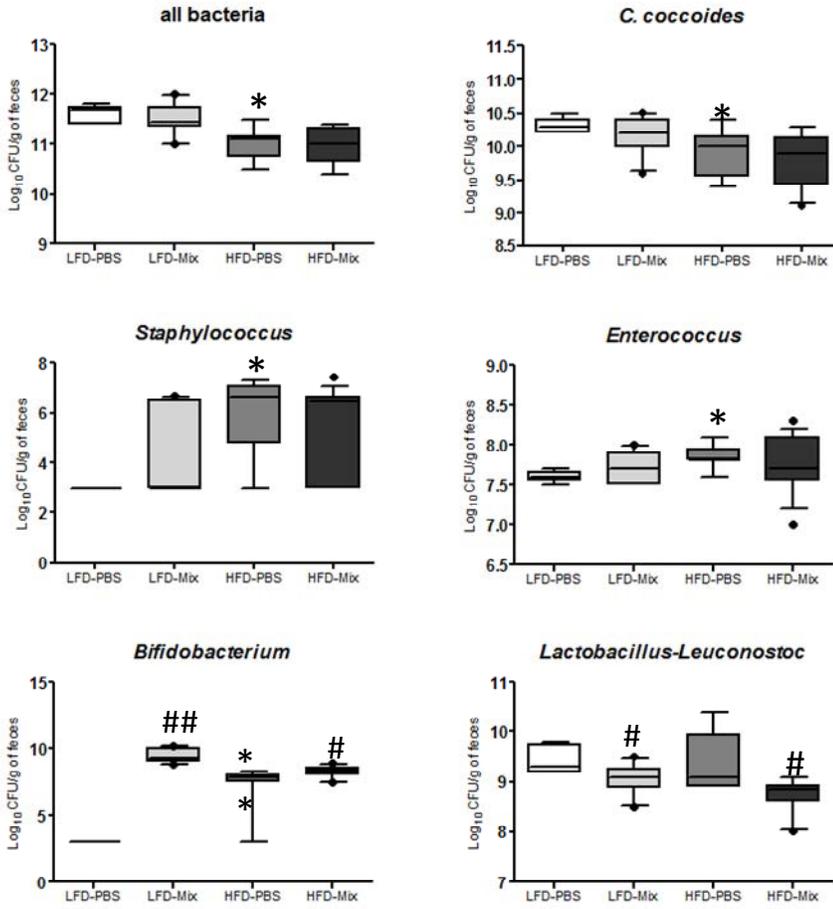


Figure 6

**A**



**B**

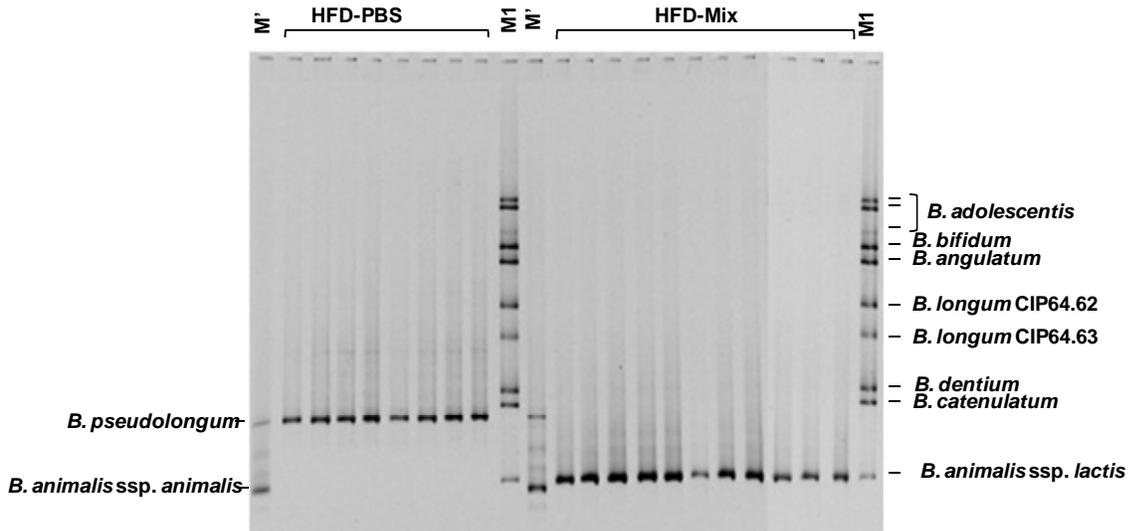


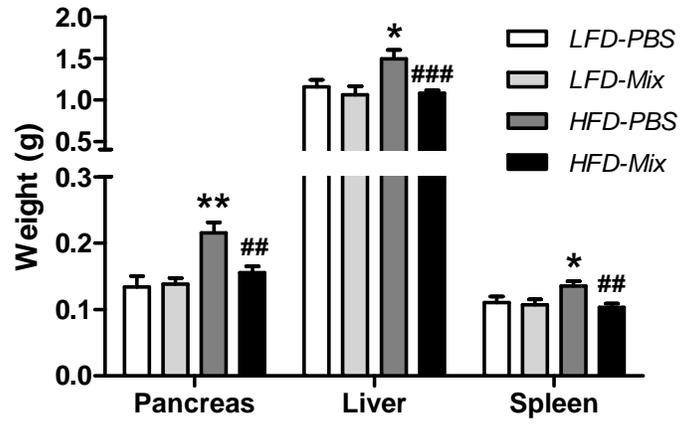
Figure 7

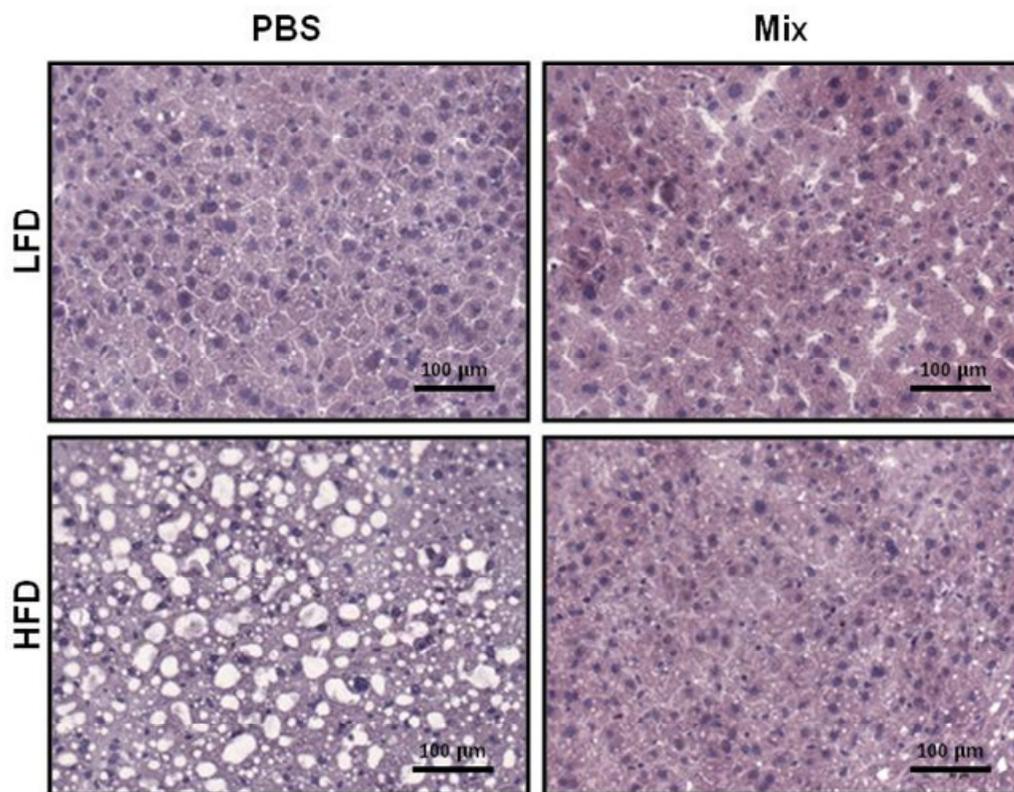
	LFD-PBS	LFD-Mix	HFD-PBS	HFD-Mix
<b>Glucose (mg/dl)</b>	180.4 ± 30.88	160.3 ± 28.96	231.67 ± 21.7*	198.43 ± 15 ##
<b>Insulin (ng/ml)</b>	0.72 ± 0.37	0.98 ± 0.24	2.96 ± 0.57 *	1.57 ± 0.23 #
<b>NEFA (mmol/l)</b>	0.85 ± 0.06	1.07 ± 0.07	1.06 ± 0.03	0.9 ± 0.08
<b>Glycerol (mmol/l)</b>	0.13 ± 0.06	0.24 ± 0.05	0.38 ± 0.1	0.34 ± 0.05
<b>TG (mmol/l)</b>	0.4 ± 0.009	0.46 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.03
<b>Cholesterol (mmol/l)</b>	1.35 ± 0.05	1.33 ± 0.05	1.94 ± 0.04***	1.72 ± 0.3 ###
<b>HDL (mmol/l)</b>	1.09 ± 0.04	1.07 ± 0.04	1.5 ± 0.01 ***	1.35 ± 0.02 ###
<b>LDL (mmol/l)</b>	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.45 ± 0.04***	0.36 ± 0.02 ###

Table 1

	LFD-PBS	LFD-Mix	HFD-PBS	HFD-Mix
<b>0-20</b>	1.1±0.5	1.5±0.5	0.2±0.3 **	0.5±0.4
<b>20-40</b>	37.4±2	57±8.1 ##	19.0±9.3 **	30.0±6.5 #
<b>40-60</b>	44.7±1.2	36.4±6.5 #	22.6±3 ***	31.6±5 #
<b>60-80</b>	16.8±1.9	5.1±3.2 ###	23.4±2.6 **	22.6±3.7
<b>80-100</b>	0,0	0,0	19.4±4.6 ***	9.2±5.4 ##
<b>&gt;100</b>	0,0	0,0	15.4±6.9 **	6.1±4.3 #

Table 2





Supplementary Figure 1

## Discussion et Conclusion de l'étude 2

La composition du microbiote intestinal est altérée durant l'obésité et est influencée par le changement du poids corporel (27, 28). En effet, plusieurs études ont montré un rôle du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité, de l'inflammation chronique à bas bruit et de l'installation de la résistance à l'insuline (32, 372). Une dérégulation du nombre et de la diversité bactérienne correspondant à une augmentation du nombre des bactéries de genre *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes*, a été montrée dans l'intestin des animaux et sujets obèses (44, 373). Les recherches se sont orientées dernièrement vers la compréhension de l'interaction entre le microbiote et la barrière intestinale et les repercussions sur le développement de l'obésité et la résistance à l'insuline, pour essayer en conséquence de trouver des stratégies thérapeutiques pour restaurer l'équilibre du microbiote. Les probiotiques ont été suggérés comme étant des outils potentiels pour réguler la dysbiose installée durant l'obésité et pour résoudre les désordres métaboliques qui y sont associés. En effet, certaines études ont montré des effets bénéfiques des probiotiques qui sont spécifiques de la souche administrée, comme une diminution du poids corporel, une amélioration de la stéatose hépatique et une diminution de la résistance à l'insuline (374-376). Dans ce travail, nous avons évalué les effets sur le développement de l'obésité et de l'inflammation de plusieurs souches de probiotiques.

Nous avons montré que l'administration quotidienne et à long terme de certaines souches de probiotiques a des effets bénéfiques sur le développement de l'obésité et le métabolisme des souris recevant un régime hyperlipidique. Malgré ses propriétés anti-inflammatoires, l'administration de la souche *Lactobacillus salivarius* Ls33 n'a aucun effet sur le gain de poids corporel chez les souris obèses. L'intolérance au glucose provoquée par le régime riche en graisses est comparable aux souris obèses contrôles. De plus aucun effet n'a été observé au niveau de l'expression des marqueurs de cellules immunes (lymphocytes T et macrophages) et des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans les tissu adipeux blanc des souris (données non montrées). Cependant, l'administration de la mixture de probiotiques composée de *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21690 et de *Bifidobacterium animalis subsp lactis* LMG 23512 a limité significativement le gain de poids corporel et a amélioré les paramètres métaboliques et inflammatoires des souris obèses.

La réduction de la prise de poids corporel a été reflétée en partie par la diminution de la masse grasse sous-cutanée et viscérale. Cet effet peut être dû à la diminution significative de la prise

alimentaire observée chez les souris recevant les probiotiques. L'origine de l'hypophagie observée chez ces animaux peut être due à une augmentation de la sécrétion du peptide anorexigène GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) par les cellules entéro-endocrines (377). De plus, il est possible que les probiotiques aient conduit à une augmentation de la dépense énergétique et/ou à une diminution de l'absorption lipidique au niveau de l'intestin ou même à une réduction de stockage des lipides au sein du tissu adipeux blanc.

Les probiotiques produisent des métabolites qui peuvent être absorbés au niveau intestinal et véhiculés vers les tissus métaboliques (le tissu adipeux blanc ou brun, le foie et le muscle) par la voie sanguine. Les produits les mieux caractérisés sont les acides gras à chaîne courte (AGCC) dont les plus connus sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Ces AGCC se fixent sur deux récepteurs GPR41 et GPR43 qui sont exprimés à la fois dans les cellules immunes et dans les cellules des tissus métaboliques (378-380). Ces acides gras possèdent différents rôles, souvent bénéfiques sur le métabolisme et le système immunitaire de l'organisme. De ce fait, la réduction de la prise de poids corporel peut être due également à une augmentation de la dépense énergétique chez les souris recevant les probiotiques. En effet, les AGCC jouent un rôle dans l'oxydation des acides gras en activant la voie de l'APMK au niveau du muscle et dans la régulation de la thermogénèse (20).

L'administration des probiotiques a amélioré l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. Ces effets bénéfiques peuvent être dus à la réduction de l'inflammation à bas bruit observée dans le tissu adipeux blanc des souris et à la diminution des gouttelettes lipidiques dans le foie (réduction potentielle de la stéatose hépatique) ou à la réduction du poids corporel observé. De ce fait une approche de per feeding est souhaitable pour conclure si les effets bénéfiques observés sont dus à l'administration des probiotiques et à leurs métabolites ou à la réduction du poids corporel qui peut impacter sur les paramètres métaboliques des animaux.

L'administration des probiotiques a diminué l'expression des facteurs inflammatoires dans le tissu adipeux blanc des souris obèses. Cette diminution peut être expliquée par la réduction de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux, reflétée par la diminution de l'expression des marqueurs cellulaires de ces cellules (*Cd68*, *Cd11b* et *Cd11c*). Les AGCC issus des probiotiques possèdent des propriétés anti-inflammatoires et sont capables d'inhiber l'activité de NF- $\kappa$ B et de bloquer l'expression et la sécrétion de l'IL-6 et du TNF $\alpha$  par les cellules immunes (381, 382). Même si cela reste à démontrer, il est possible que les souches de probiotiques utilisées dans notre étude aient augmenté le taux systémique des AGCC

diminuant ainsi l'activité des voies de signalisation inflammatoire comme la voie NF- $\kappa$ B ou JNK. De plus, la diminution de l'inflammation peut être expliquée par l'augmentation potentielle de la population des lymphocytes T régulateurs reflétée par de l'expression du facteur FoxP3 dans le tissu adipeux blanc des souris accompagnée d'une augmentation de l'expression du facteur anti-inflammatoire PPAR $\gamma$ . Des données récentes ont montré un rôle des AGCC dans la génération des T régulateurs périphériques (383). Il est possible que les probiotiques aient conduit à la génération des T régulateurs dans les tissus périphériques *via* le facteur PPAR $\gamma$ , un facteur essentiel pour la fonction des T régulateurs du tissu adipeux blanc (384). Ces résultats peuvent également expliquer l'amélioration de l'intolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline, deux paramètres métaboliques dérégulés par l'inflammation chronique à bas bruit et qui peuvent être améliorés par l'augmentation des lymphocytes T régulateurs dans le tissu adipeux blanc (371).

En parallèle, nous avons montré une diminution du dépôt des gouttelettes lipidiques dans le foie. Ce phénotype concorde avec la sensibilité à l'insuline observée chez les souris recevant les probiotiques. Nous pouvons supposer que la diminution de la stéatose hépatique est due à la diminution du taux du cholestérol total dans le sang des souris ou au changement de la composition du microbiote intestinal. En effet, plusieurs études ont montré un lien direct entre la composition du microbiote et le développement de la stéatose hépatique (375, 376). De plus, il est possible que les AGCC aient diminué la lipogenèse au sein du foie et probablement amélioré l'inflammation hépatique en agissant au niveau des cellules immunes résidant dans le tissu hépatique conduisant ainsi à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Finalement, nous avons montré que les changements métaboliques et immunologiques sont associés à une modification de la composition du microbiote intestinal. Nous avons montré une diminution du nombre total des bactéries et du groupe *C. coccoides* et une augmentation significative des entérocoques, des staphylocoques et une émergence des bifidobactéries dans l'intestin des souris obèses contrôles. L'administration des probiotiques a diminué le nombre des staphylocoques et du *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus*. De manière intéressante, le *Bifidobacterium pseudolongum* est augmenté chez les souris obèses et diminue dans le groupe recevant les probiotiques, dans lequel uniquement la souche *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* a été détectée. Les glucides non digestibles, appelés également prébiotiques, sont des substrats métabolisés par les bactéries de l'intestin et sont connus pour stimuler le développement des bifidobactéries (385). En effet, leur utilisation a mis en évidence le rôle bénéfique des bifidobactéries sur l'amélioration des désordres métaboliques liés à l'obésité.

De plus, la restauration du nombre des bifidobactéries a été négativement corrélée à l'endotoxémie observée durant l'obésité (386). De manière intéressante, les prébiotiques jouent un rôle important dans la régulation de la fonction et la perméabilité de la barrière intestinale dérégulées durant l'obésité (387, 388). La dérégulation de la perméabilité intestinale durant l'obésité se caractérise par une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées comme ZO-1, les claudines et l'occludine, ce qui conduit à la translocation des toxines et de certains ligands des TLRs comme le LPS vers la circulation sanguine qui vont activer les cellules immunes et contribuer au développement de l'inflammation chronique à bas bruit (32, 389, 390). Cependant, l'administration des probiotiques n'a pas réduit la perméabilité intestinale reflétés par des niveaux d'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées comme l'occludine et ZO-1 comparables entre les souris obèses recevant les probiotiques et les souris obèses contrôles (données non montrées). De plus, un test de perméabilité intestinal réalisé par l'administration du FITC-dextran n'a montré aucune différence entre les deux groupes d'intérêt (données non montrées). De ce fait, la réduction de l'inflammation dans le tissu adipeux blanc semble être provoquée par un mécanisme indépendant de l'amélioration de la fonction de la barrière intestinale comme l'effet des AGCC sur la génération des T régulateurs dans les tissus périphériques et potentiellement l'inhibition des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et JNK dans les cellules immunes et les tissus métaboliques.

En conclusion, nous avons montré des effets bénéfiques de l'administration des probiotiques sur le développement de l'obésité et les complications métaboliques qui y sont associées comme la résistance à l'insuline. Ces observations renforcent le concept que le changement de la composition du microbiote intestinal peut influencer le développement de l'obésité et peut résoudre l'inflammation chronique à bas bruit et améliorer la sensibilité à l'insuline de l'organisme. Même si les mécanismes moléculaires restent à démontrer, nous suggérons que les effets bénéfiques observés sont dus à une modulation du système immunitaire, et plus précisément à une augmentation de la génération des lymphocytes T régulateurs dans les tissus périphériques par un mécanisme dépendant du rôle anti-inflammatoire du facteur PPAR $\gamma$ .

## Conclusion générale et perspectives

Ces travaux montrent que la rapamycine et les probiotiques peuvent être des outils potentiels pour lutter contre le développement de l'obésité et résoudre les complications métaboliques qui y sont associées. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre comment, quand et dans quel but utiliser la rapamycine afin de bénéficier de ses effets avantageux. La rapamycine est un inhibiteur spécifique de mTOR. Elle inhibe les deux complexes mTOR (C1 et C2) dans des conditions d'administration différentes. L'inhibition de chaque complexe résulte en une conséquence différente pour l'organisme. Nous avons montré dans notre protocole d'injection, une réduction de la prise de poids corporel et une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les souris recevant un régime hyperlipidique malgré l'exacerbation de l'état inflammatoire et le développement d'une intolérance au glucose. Nous avons observé à la fois des effets bénéfiques et délétères pour l'organisme. De ce fait, il faut rester prudent concernant l'utilisation de la molécule comme un médicament anti-obésité chez l'Homme.

Il faut noter que la souris est un modèle d'étude intéressant mais qui possède ses limites surtout concernant les études sur le système immunitaire et le métabolisme. Des différences existent entre l'Homme et la souris au niveau du système immunitaire inné et adaptatif. Nous ne pouvons pas extrapoler les données observées dans cette étude de la souris à l'Homme. Le système immunitaire des deux espèces diffère au niveau de la composition cellulaire en cellules immunes, des marqueurs de surface pour certaines populations mais également au niveau de la régulation et les voies de signalisation de ces cellules. De plus, les expériences chez le modèle animal sont réalisées dans un milieu contrôlé très faiblement exposé aux pathogènes et aux infections, ce qui n'est pas le cas de l'Homme qui est exposé d'une façon continue à des agressions pathogènes qui peuvent influencer son système immunitaire. En outre, l'étude a été effectuée dans un modèle d'obésité induite dans lequel nous avons contrôlé le temps de développement et d'installation de l'obésité, ce qui n'est pas le cas chez les patients obèses. De ce fait, il faut être prudent par rapport au fait que l'obésité chez les rongeurs ne peut pas refléter réellement l'obésité installée chez l'Homme. De plus, la composition cellulaire en cellules immunes dans le tissu adipeux entre l'Homme et la souris est différente. En conséquence, il faut rester vigilant quant à l'utilisation des résultats obtenus dans cette étude pour expliquer certaines observations chez l'Homme, notamment dans le cadre des études qui concernent les effets des molécules comme les immuno-suppresseurs.

Cependant, cette étude nous a permis de montrer des effets immuno-modulateurs de la rapamycine. Elle a provoqué une augmentation des cellules régulatrices (Tregs et MDSCs) dans les tissus métaboliques qui pourraient impacter la sensibilité à l'insuline des animaux. Ces effets ont été corrélés à une inhibition du complexe mTORC1, potentiellement sans altération de l'activité du complexe mTORC2. De plus, plusieurs questions ont été soulevées comme par exemple l'implication du complexe mTOR dans l'accumulation des cellules immunes, notamment les macrophages et leurs rôles dans le tissu adipeux.

Les questions posées sont : **1) Quel est le rôle du complexe mTORC1 dans les macrophages du tissu adipeux blanc et son impact sur le développement de l'inflammation chronique à bas bruit ? Est-ce que mTORC1 est activé dans les macrophages M1 du tissu adipeux blanc durant l'obésité et joue-t'il un rôle dans le développement de l'inflammation chronique dite à bas bruit ?**

**2) Quel est le rôle du complexe mTORC1 dans la régulation de l'expansion, la différenciation et la fonction immuno-suppressive des MDSCs ?** Il est important d'approfondir les études concernant le rôle de mTORC1 dans ces cellules, c'est-à-dire de voir si l'inhibition de ce complexe augmente la fonction immuno-suppressive des MDSCs, ce qui peut ouvrir des pistes thérapeutiques intéressantes comme dans le cas de l'utilisation des lymphocytes T régulateurs. Bien évidemment, il faudra toujours tenir compte des différences entre l'Homme et la souris. Chez la souris les MDSCs sont représentées par deux sous-populations majeures (G- et M-MDSCs). Chez l'Homme, les MDSCs possèdent des phénotypes plus complexes, ce qui nécessite des études spécifiques des effets de la rapamycine qui seront effectuées sur des MDSCs humains.

**3) Quel est le rôle des MDSCs dans la régulation de la sensibilité à l'insuline ?** Il est intéressant d'effectuer des études plus approfondies pour comprendre l'interaction des MDSCs avec les tissus métaboliques et les cellules immunes pour réguler la sensibilité à l'insuline. Est-ce qu'il s'agit d'une interaction directe entre les MDSCs et les adipocytes ou les hépatocytes par exemple ou d'une interaction indirecte qui implique d'autres cellules immunes comme la polarisation des macrophages M1 en M2, des Th1 en Th2 ou l'augmentation des Tregs ?

**4) Quels rôles les cellules immunes comme les macrophages et les MDSCs jouent-elles dans la régulation de la fonction du tissu adipeux brun ?** Les macrophages alternatifs M2 jouent un rôle dans la régulation de la fonction de ce tissu dans des conditions de stress

comme une exposition au froid. En conséquence, il sera intéressant de regarder si la composition cellulaire du tissu adipeux brun en cellules immunes est altérée durant l'obésité. Il est possible que l'obésité provoque une accumulation des macrophages M1 au sein de ce tissu, associée au développement d'un micro-environnement inflammatoire qui peut altérer la réponse du tissu à certains stimuli comme les catécholamines provoquant ainsi une dérégulation du processus de la thermogénèse.

**5) Est-ce que les effets métaboliques et immuns observés par la rapamycine sont dus à un changement de la composition du microbiote intestinal ?** La rapamycine est un macrolide qui peut avoir un effet potentiel sur la composition du microbiote intestinal. Il est possible que les effets observés soient dus à un changement de la composition du microbiote intestinal. Il sera intéressant d'analyser si des changements au niveau de cet organe ont eu lieu et de pouvoir les associer aux effets métaboliques et immuns observés.

En parallèle, nous avons montré un rôle bénéfique des probiotiques sur le développement de l'obésité et l'amélioration des paramètres métaboliques et inflammatoires. L'administration des probiotiques a limité le gain de poids corporel chez les souris recevant un régime hyperlipidique, elle a amélioré l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline et a réduit l'inflammation chronique dite à bas bruit. De ce fait, deux questions peuvent être posées :

**1) Quel est l'effet des probiotiques sur la modulation de la voie mTOR ?** Nous pouvons supposer que les effets bénéfiques observés peuvent être dus à une modulation de la voie mTOR dans les différents tissus métaboliques et immuns. Nous pouvons nous attendre à une diminution de l'activité de la voie mTORC1, ce qui contribuerait à la réduction du poids corporel, à la réduction de l'appétit et l'amélioration des paramètres métaboliques et inflammatoires chez la souris.

**2) Par quels mécanismes les probiotiques pourraient moduler la voie mTOR et quels sont les métabolites produits par le microbiote intestinal qui pourraient être impliqués dans cette modulation ?**

**3) Quel est l'effet de ces souches étudiées dans ce protocole sur le développement de l'obésité chez l'Homme ? Est-ce qu'elles peuvent être utilisées comme un traitement potentiel, préventif ou thérapeutique ?**

Finalement, il est vrai que les protocoles actuels d'utilisation de la rapamycine possèdent des effets secondaires chez les patients ayant subi une transplantation d'un greffon. Cependant, les causes de ces effets doivent être mieux élucidées puisque la rapamycine est capable d'inhiber les deux complexes de mTOR. En effet, il est possible qu'une partie des effets secondaires observés chez ces patients résultent d'une perturbation du complexe mTORC2 qui joue un rôle important dans la régulation de certains processus métaboliques comme la sensibilité à l'insuline. Nos observations renforcent l'importance de trouver un traitement qui ciblerait spécifiquement le complexe mTORC1 au sein d'un tissu spécifique pour diminuer les effets délétères de l'inhibition de cette voie ou de réévaluer les protocoles d'administration en diminuant la dose et/ou le nombre des injections de la molécule. De plus, ces protocoles peuvent être combinés à d'autres types de traitement comme l'administration des probiotiques afin de bénéficier de leurs effets potentiels anti-diabéto-gènes et anti-inflammatoires. Un effet synergique bénéfique pourrait être obtenu grâce à l'utilisation des deux traitements. L'utilisation des probiotiques résoudrait probablement certains effets secondaires provoqués par l'utilisation de la rapamycine chez les patients ayant subi une transplantation comme une amélioration de la glycémie, une réduction de l'hypercholestérolémie, une diminution de la résistance à l'insuline et de certains paramètres inflammatoires. En effet, les injections de la rapamycine provoquent une perturbation du profil inflammatoire chez les patients qui pourrait être atténuée par l'utilisation des probiotiques. De plus, ils pourraient potentiellement diminuer l'incidence du diabète qui est souvent observé chez les patients transplantés.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension des effets potentiels d'outils thérapeutiques dans le développement de l'obésité et de l'inflammation associée.

## Références

---

1. Despres, J. P. 2006. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 38:52-63.
2. Yusuf, S., S. Hawken, S. Ounpuu, T. Dans, A. Avezum, F. Lanas, M. McQueen, A. Budaj, P. Pais, J. Varigos, and L. Lisheng. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364:937-952.
3. Pouliot, M. C., J. P. Despres, A. Nadeau, S. Moorjani, D. Prud'Homme, P. J. Lupien, A. Tremblay, and C. Bouchard. 1992. Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 41:826-834.
4. Saeed, S., T. A. Butt, M. Anwer, M. Arslan, and P. Froguel. 2012. High prevalence of leptin and melanocortin-4 receptor gene mutations in children with severe obesity from Pakistani consanguineous families. *Mol Genet Metab* 106:121-126.
5. Holder, J. L., Jr., N. F. Butte, and A. R. Zinn. 2000. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 9:101-108.
6. Bonnefond, A., A. Raimondo, F. Stutzmann, M. Ghossaini, S. Ramachandrapa, D. C. Bersten, E. Durand, V. Vatin, B. Balkau, O. Lantieri, V. Raverdy, F. Pattou, W. Van Hul, L. Van Gaal, D. J. Peet, J. Weill, J. L. Miller, F. Horber, A. P. Goldstone, D. J. Driscoll, J. B. Bruning, D. Meyre, M. L. Whitelaw, and P. Froguel. 2013. Loss-of-function mutations in SIM1 contribute to obesity and Prader-Willi-like features. *J Clin Invest* 123:3037-3041.
7. Ghossaini, M., F. Stutzmann, C. Couturier, V. Vatin, E. Durand, C. Lecoeur, F. Degraeve, B. Heude, M. Tauber, S. Hercberg, C. Levy-Marchal, P. Tounian, J. Weill, M. Traurig, C. Bogardus, L. J. Baier, J. L. Michaud, P. Froguel, and D. Meyre. 2010. Analysis of the SIM1 contribution to polygenic obesity in the French population. *Obesity (Silver Spring)* 18:1670-1675.
8. Durand, E., P. Boutin, D. Meyre, M. A. Charles, K. Clement, C. Dina, and P. Froguel. 2004. Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes* 53:2483-2486.
9. Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
10. O'Hara, A. M., and F. Shanahan. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7:688-693.
11. Simren, M., G. Barbara, H. J. Flint, B. M. Spiegel, R. C. Spiller, S. Vanner, E. F. Verdu, P. J. Whorwell, E. G. Zoetendal, and C. Rome Foundation. 2013. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 62:159-176.
12. Zoetendal, E. G., M. Rajilic-Stojanovic, and W. M. de Vos. 2008. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 57:1605-1615.
13. Dominguez-Bello, M. G., E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer, and R. Knight. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11971-11975.
14. Gronlund, M. M., O. P. Lehtonen, E. Eerola, and P. Kero. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28:19-25.
15. Palmer, C., E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, and P. O. Brown. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* 5:e177.
16. Yatsunenko, T., F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, R. N. Baldassano, A. P. Anokhin, A. C. Heath, B. Warner, J. Reeder, J. Kuczynski, J. G. Caporaso, C. A. Lozupone, C. Lauber, J. C. Clemente, D. Knights, R. Knight, and J. I. Gordon. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486:222-227.
17. O'Toole, P. W., and M. J. Claesson. 2010. Gut microbiota: changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal* 20:281-291.
18. Sonnenburg, J. L., J. Xu, D. D. Leip, C. H. Chen, B. P. Westover, J. Weatherford, J. D. Buhler, and J. I. Gordon. 2005. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 307:1955-1959.

19. Backhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15718-15723.
20. Backhed, F., J. K. Manchester, C. F. Semenkovich, and J. I. Gordon. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:979-984.
21. Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027-1031.
22. Cabou, C., P. D. Cani, G. Campistron, C. Knauf, C. Mathieu, C. Sartori, J. Amar, U. Scherrer, and R. Burcelin. 2007. Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56:2872-2877.
23. Erridge, C., T. Attina, C. M. Spickett, and D. J. Webb. 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 86:1286-1292.
24. Ghanim, H., S. Abuaysheh, C. L. Sia, K. Korzeniewski, A. Chaudhuri, J. M. Fernandez-Real, and P. Dandona. 2009. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes care* 32:2281-2287.
25. Pendyala, S., J. M. Walker, and P. R. Holt. 2012. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology* 142:1100-1101 e1102.
26. Pussinen, P. J., A. S. Havulinna, M. Lehto, J. Sundvall, and V. Salomaa. 2011. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes care* 34:392-397.
27. Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11070-11075.
28. Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, S. Klein, and J. I. Gordon. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022-1023.
29. Larsen, N., F. K. Vogensen, F. W. van den Berg, D. S. Nielsen, A. S. Andreasen, B. K. Pedersen, W. A. Al-Soud, S. J. Sorensen, L. H. Hansen, and M. Jakobsen. 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5:e9085.
30. Furet, J. P., L. C. Kong, J. Tap, C. Poitou, A. Basdevant, J. L. Bouillot, D. Mariat, G. Corthier, J. Dore, C. Henegar, S. Rizkalla, and K. Clement. 2010. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59:3049-3057.
31. Brun, P., I. Castagliuolo, V. Di Leo, A. Buda, M. Pinzani, G. Palu, and D. Martines. 2007. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G518-525.
32. Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, and R. Burcelin. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57:1470-1481.
33. Muccioli, G. G., D. Naslain, F. Backhed, C. S. Reigstad, D. M. Lambert, N. M. Delzenne, and P. D. Cani. 2010. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular systems biology* 6:392.
34. Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 73:386S-392S.
35. Marteau, P. R. 2002. Probiotics in clinical conditions. *Clin Rev Allergy Immunol* 22:255-273.
36. Kaur, I. P., A. Kuhad, A. Garg, and K. Chopra. 2009. Probiotics: delineation of prophylactic and therapeutic benefits. *J Med Food* 12:219-235.
37. Sato, M., K. Uzu, T. Yoshida, E. M. Hamad, H. Kawakami, H. Matsuyama, I. A. Abd El-Gawad, and K. Imaizumi. 2008. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr* 99:1013-1017.

38. Lee, K., K. Paek, H. Y. Lee, J. H. Park, and Y. Lee. 2007. Antiobesity effect of trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *J Appl Microbiol* 103:1140-1146.
39. Hamad, E. M., M. Sato, K. Uzu, T. Yoshida, S. Higashi, H. Kawakami, Y. Kadooka, H. Matsuyama, I. A. Abd El-Gawad, and K. Imaizumi. 2009. Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *Br J Nutr* 101:716-724.
40. Angelakis, E., D. Bastelica, A. Ben Amara, A. El Filali, A. Dutour, J. L. Mege, M. C. Alessi, and D. Raoult. 2012. An evaluation of the effects of *Lactobacillus ingluviei* on body weight, the intestinal microbiome and metabolism in mice. *Microbial pathogenesis* 52:61-68.
41. Angelakis, E., and D. Raoult. 2010. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. *PLoS One* 5:e10463.
42. Bernardeau, M., J. P. Vernoux, and M. Gueguen. 2002. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *International journal of food microbiology* 77:19-27.
43. Zhou, J. S., Q. Shu, K. J. Rutherford, J. Prasad, M. J. Birtles, P. K. Gopal, and H. S. Gill. 2000. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. *International journal of food microbiology* 56:87-96.
44. Million, M., and D. Raoult. 2012. Publication biases in probiotics. *European journal of epidemiology* 27:885-886.
45. Vendt, N., H. Grunberg, T. Tuure, O. Malminiemi, E. Wuolijoki, V. Tillmann, E. Sepp, and R. Korpela. 2006. Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association* 19:51-58.
46. Luoto, R., M. Kalliomaki, K. Laitinen, and E. Isolauri. 2010. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. *Int J Obes (Lond)* 34:1531-1537.
47. Kadooka, Y., M. Sato, K. Imaizumi, A. Ogawa, K. Ikuyama, Y. Akai, M. Okano, M. Kagoshima, and T. Tsuchida. 2010. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European journal of clinical nutrition* 64:636-643.
48. Tremaroli, V., and F. Backhed. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489:242-249.
49. Cohen, J. C., J. D. Horton, and H. H. Hobbs. 2011. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332:1519-1523.
50. Poirier, P., T. D. Giles, G. A. Bray, Y. Hong, J. S. Stern, F. X. Pi-Sunyer, and R. H. Eckel. 2006. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 113:898-918.
51. Jubber, A. S. 2004. Respiratory complications of obesity. *Int J Clin Pract* 58:573-580.
52. Pischon, T., U. Nothlings, and H. Boeing. 2008. Obesity and cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society* 67:128-145.
53. Gukovsky, I., N. Li, J. Todoric, A. Gukovskaya, and M. Karin. 2013. Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 144:1199-1209 e1194.
54. Crowson, C. S., E. L. Matteson, J. M. Davis, 3rd, and S. E. Gabriel. 2013. Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 65:71-77.
55. Cypess, A. M., S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A. B. Goldfine, F. C. Kuo, E. L. Palmer, Y. H. Tseng, A. Doria, G. M. Kolodny, and C. R. Kahn. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509-1517.
56. Sanchez-Gurmaches, J., and D. A. Guertin. 2013. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta*.

57. Virtanen, K. A., M. E. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. J. Savisto, S. Enerback, and P. Nuutila. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360:1518-1525.
58. Jimenez-Preitner, M., X. Berney, M. Uldry, A. Vitali, S. Cinti, J. G. Ledford, and B. Thorens. 2011. Plac8 is an inducer of C/EBPbeta required for brown fat differentiation, thermoregulation, and control of body weight. *Cell Metab* 14:658-670.
59. Bartelt, A., O. T. Bruns, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Ittrich, K. Peldschus, M. G. Kaul, U. I. Tromsdorf, H. Weller, C. Waurisch, A. Eychmuller, P. L. Gordts, F. Rinninger, K. Bruegelmann, B. Freund, P. Nielsen, M. Merkel, and J. Heeren. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 17:200-205.
60. Frontini, A., and S. Cinti. 2010. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab* 11:253-256.
61. Kajimura, S., and M. Saito. 2013. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. *Annu Rev Physiol*.
62. Saito, M., Y. Okamatsu-Ogura, M. Matsushita, K. Watanabe, T. Yoneshiro, J. Nio-Kobayashi, T. Iwanaga, M. Miyagawa, T. Kameya, K. Nakada, Y. Kawai, and M. Tsujisaki. 2009. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58:1526-1531.
63. Yoneshiro, T., S. Aita, M. Matsushita, T. Kayahara, T. Kameya, Y. Kawai, T. Iwanaga, and M. Saito. 2013. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest* 123:3404-3408.
64. Snitker, S., Y. Fujishima, H. Shen, S. Ott, X. Pi-Sunyer, Y. Furuhata, H. Sato, and M. Takahashi. 2009. Effects of novel capsinoid treatment on fatness and energy metabolism in humans: possible pharmacogenetic implications. *Am J Clin Nutr* 89:45-50.
65. Almind, K., M. Manieri, W. I. Sivitz, S. Cinti, and C. R. Kahn. 2007. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2366-2371.
66. Young, P., J. R. Arch, and M. Ashwell. 1984. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* 167:10-14.
67. Cousin, B., S. Cinti, M. Morroni, S. Raimbault, D. Ricquier, L. Penicaud, and L. Casteilla. 1992. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 103 ( Pt 4):931-942.
68. Timmons, J. A., K. Wennmalm, O. Larsson, T. B. Walden, T. Lassmann, N. Petrovic, D. L. Hamilton, R. E. Gimeno, C. Wahlestedt, K. Baar, J. Nedergaard, and B. Cannon. 2007. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4401-4406.
69. Seale, P., B. Bjork, W. Yang, S. Kajimura, S. Chin, S. Kuang, A. Scime, S. Devarakonda, H. M. Conroe, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. A. Rudnicki, D. R. Beier, and B. M. Spiegelman. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961-967.
70. Lee, M. J., Y. Wu, and S. K. Fried. 2012. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 34:1-11.
71. Kersten, S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2:282-286.
72. Le Lay, S., I. Lefrere, C. Trautwein, I. Dugail, and S. Krief. 2002. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. *J Biol Chem* 277:35625-35634.
73. McTernan, P. G., A. L. Harte, L. A. Anderson, A. Green, S. A. Smith, J. C. Holder, A. H. Barnett, M. C. Eggo, and S. Kumar. 2002. Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes* 51:1493-1498.
74. Osuga, J., S. Ishibashi, T. Oka, H. Yagyu, R. Tozawa, A. Fujimoto, F. Shionoiri, N. Yahagi, F. B. Kraemer, O. Tsutsumi, and N. Yamada. 2000. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:787-792.

75. Lafontan, M. 2005. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:119-146.
76. Holm, C., T. Osterlund, H. Laurell, and J. A. Contreras. 2000. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr* 20:365-393.
77. Zimmermann, R., J. G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter, and R. Zechner. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386.
78. Lass, A., R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J. G. Strauss, G. Gorkiewicz, and R. Zechner. 2006. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3:309-319.
79. Granneman, J. G., H. P. Moore, R. L. Granneman, A. S. Greenberg, M. S. Obin, and Z. Zhu. 2007. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* 282:5726-5735.
80. Avram, M. M., A. S. Avram, and W. D. James. 2005. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 1. Introduction. *J Am Acad Dermatol* 53:663-670.
81. Tang, Q. Q., and M. D. Lane. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81:715-736.
82. Hausman, G. J., and R. L. Richardson. 2004. Adipose tissue angiogenesis. *Journal of animal science* 82:925-934.
83. Rupnick, M. A., D. Panigrahy, C. Y. Zhang, S. M. Dallabrida, B. B. Lowell, R. Langer, and M. J. Folkman. 2002. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10730-10735.
84. Brakenhielm, E., R. Cao, B. Gao, B. Angelin, B. Cannon, P. Parini, and Y. Cao. 2004. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res* 94:1579-1588.
85. Rodriguez, A. M., C. Elabd, E. Z. Amri, G. Ailhaud, and C. Dani. 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87:125-128.
86. Bjorntorp, P., M. Karlsson, H. Pertoft, P. Pettersson, L. Sjostrom, and U. Smith. 1978. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res* 19:316-324.
87. Sengenès, C., K. Lolmede, A. Zakaroff-Girard, R. Busse, and A. Bouloumie. 2005. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 205:114-122.
88. Miranville, A., C. Heeschen, C. Sengenès, C. A. Curat, R. Busse, and A. Bouloumie. 2004. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110:349-355.
89. Rodriguez, L. V., Z. Alfonso, R. Zhang, J. Leung, B. Wu, and L. J. Ignarro. 2006. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12167-12172.
90. Erickson, G. R., J. M. Gimble, D. M. Franklin, H. E. Rice, H. Awad, and F. Guilak. 2002. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290:763-769.
91. Halvorsen, Y. D., D. Franklin, A. L. Bond, D. C. Hitt, C. Auchter, A. L. Boskey, E. P. Paschalis, W. O. Wilkison, and J. M. Gimble. 2001. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7:729-741.
92. Rodriguez-Pinto, D. 2005. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 238:67-75.
93. Liu, Z., H. Fan, and S. Jiang. 2013. CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunol Rev* 252:183-191.
94. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R. A. Kastelein. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19:641-644.
95. Murray, H. W., G. L. Spitalny, and C. F. Nathan. 1985. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol* 134:1619-1622.
96. Martinez-Moczygemba, M., and D. P. Huston. 2003. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 112:653-665; quiz 666.

97. Martinez, G. J., R. I. Nurieva, X. O. Yang, and C. Dong. 2008. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1143:188-211.
98. Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma, and B. Xia. 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012:925135.
99. Annunziato, F., and S. Romagnani. 2011. Mouse T helper 17 phenotype: not so different than in man after all. *Cytokine* 56:112-115.
100. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
101. Maloy, K. J., L. Salaun, R. Cahill, G. Dougan, N. J. Saunders, and F. Powrie. 2003. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197:111-119.
102. Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi. 2013. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38:414-423.
103. Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chavez, and R. Lascrain. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6:15-25.
104. Sutton, C. E., L. A. Mielke, and K. H. Mills. 2012. IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol* 42:2221-2231.
105. Bonneville, M., R. L. O'Brien, and W. K. Born. 2010. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10:467-478.
106. Lee, P. T., A. Putnam, K. Benlagha, L. Teyton, P. A. Gottlieb, and A. Bendelac. 2002. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* 110:793-800.
107. Berzins, S. P., K. Kyparissoudis, D. G. Pellicci, K. J. Hammond, S. Sidobre, A. Baxter, M. J. Smyth, M. Kronenberg, and D. I. Godfrey. 2004. Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for human studies. *Immunol Cell Biol* 82:247-252.
108. Bendelac, A., M. N. Rivera, S. H. Park, and J. H. Roark. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15:535-562.
109. Simoni, Y., J. Diana, L. Ghazarian, L. Beaudoin, and A. Lehen. 2013. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol* 171:8-19.
110. Odemuyiwa, S. O., A. Ghahary, Y. Li, L. Puttagunta, J. E. Lee, S. Musat-Marcu, A. Ghahary, and R. Moqbel. 2004. Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol* 173:5909-5913.
111. MacKenzie, J. R., J. Mattes, L. A. Dent, and P. S. Foster. 2001. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol* 167:3146-3155.
112. Piliponsky, A. M., G. J. Gleich, I. Bar, and F. Levi-Schaffer. 2002. Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. *Mol Immunol* 38:1369.
113. Galli, S. J., S. Nakae, and M. Tsai. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135-142.
114. Burke, S. M., T. B. Issekutz, K. Mohan, P. W. Lee, M. Shmulevitz, and J. S. Marshall. 2008. Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood* 111:5467-5476.
115. Biedermann, T., M. Kneilling, R. Mailhammer, K. Maier, C. A. Sander, G. Kollias, S. L. Kunkel, L. Hultner, and M. Rocken. 2000. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med* 192:1441-1452.
116. Orinska, Z., E. Bulanova, V. Budagian, M. Metz, M. Maurer, and S. Bulfone-Paus. 2005. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood* 106:978-987.
117. Gordon, S. 2003. Do macrophage innate immune receptors enhance atherogenesis? *Dev Cell* 5:666-668.
118. Wynn, T. A., A. Chawla, and J. W. Pollard. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496:445-455.
119. Bourlier, V., A. Zakaroff-Girard, A. Miranville, S. De Barros, M. Maumus, C. Sengenès, J. Galitzky, M. Lafontan, F. Karpe, K. N. Frayn, and A. Bouloumie. 2008. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117:806-815.

120. Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122:787-795.
121. Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162-174.
122. Kusmartsev, S., Y. Nefedova, D. Yoder, and D. I. Gabrilovich. 2004. Antigen-specific inhibition of CD8<sup>+</sup> T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 172:989-999.
123. Ochoa, A. C., A. H. Zea, C. Hernandez, and P. C. Rodriguez. 2007. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:721s-726s.
124. Almand, B., J. I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N. R. English, S. C. Knight, D. P. Carbone, and D. I. Gabrilovich. 2001. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166:678-689.
125. Youn, J. I., S. Nagaraj, M. Collazo, and D. I. Gabrilovich. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181:5791-5802.
126. Hestdal, K., F. W. Ruscetti, J. N. Ihle, S. E. Jacobsen, C. M. Dubois, W. C. Kopp, D. L. Longo, and J. R. Keller. 1991. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 147:22-28.
127. Sinha, P., V. K. Clements, A. M. Fulton, and S. Ostrand-Rosenberg. 2007. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67:4507-4513.
128. Serafini, P., R. Carbley, K. A. Noonan, G. Tan, V. Bronte, and I. Borrello. 2004. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 64:6337-6343.
129. Pan, P. Y., G. X. Wang, B. Yin, J. Ozao, T. Ku, C. M. Divino, and S. H. Chen. 2008. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 111:219-228.
130. Gabrilovich, D., T. Ishida, T. Oyama, S. Ran, V. Kravtsov, S. Nadaf, and D. P. Carbone. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92:4150-4166.
131. Bunt, S. K., L. Yang, P. Sinha, V. K. Clements, J. Leips, and S. Ostrand-Rosenberg. 2007. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* 67:10019-10026.
132. Bromberg, J. 2002. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109:1139-1142.
133. Foell, D., H. Wittkowski, T. Vogl, and J. Roth. 2007. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 81:28-37.
134. Delano, M. J., P. O. Scumpia, J. S. Weinstein, D. Coco, S. Nagaraj, K. M. Kelly-Scumpia, K. A. O'Malley, J. L. Wynn, S. Antonenko, S. Z. Al-Quran, R. Swan, C. S. Chung, M. A. Atkinson, R. Ramphal, D. I. Gabrilovich, W. H. Reeves, A. Ayala, J. Phillips, D. Laface, P. G. Heyworth, M. Clare-Salzler, and L. L. Moldawer. 2007. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 204:1463-1474.
135. Movahedi, K., M. Guillemins, J. Van den Bossche, R. Van den Bergh, C. Gysemans, A. Beschinn, P. De Baetselier, and J. A. Van Ginderachter. 2008. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111:4233-4244.
136. Bronte, V., P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, V. Tosello, A. Mazzoni, D. M. Segal, C. Staib, M. Lowel, G. Sutter, M. P. Colombo, and P. Zanovello. 2003. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 170:270-278.
137. Terabe, M., S. Matsui, J. M. Park, M. Mamura, N. Noben-Trauth, D. D. Donaldson, W. Chen, S. M. Wahl, S. Ledbetter, B. Pratt, J. J. Letterio, W. E. Paul, and J. A. Berzofsky. 2003. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 198:1741-1752.
138. Sinha, P., V. K. Clements, and S. Ostrand-Rosenberg. 2005. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res* 65:11743-11751.

139. Kusmartsev, S., and D. I. Gabrilovich. 2005. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* 174:4880-4891.
140. Bronte, V., and P. Zanovello. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5:641-654.
141. Lechner, M. G., C. Megiel, S. M. Russell, B. Bingham, N. Arger, T. Woo, and A. L. Epstein. 2011. Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *Journal of translational medicine* 9:90.
142. Rodriguez, P. C., and A. C. Ochoa. 2008. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 222:180-191.
143. Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, and A. C. Ochoa. 2007. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109:1568-1573.
144. Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt, and U. R. Kees. 1998. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 160:5729-5734.
145. Harari, O., and J. K. Liao. 2004. Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des* 10:893-898.
146. Rivoltini, L., M. Carrabba, V. Huber, C. Castelli, L. Novellino, P. Dalerba, R. Mortarini, G. Arancia, A. Anichini, S. Fais, and G. Parmiani. 2002. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 188:97-113.
147. Schmielau, J., and O. J. Finn. 2001. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* 61:4756-4760.
148. Sauer, H., M. Wartenberg, and J. Hescheler. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173-186.
149. Vickers, S. M., L. A. MacMillan-Crow, M. Green, C. Ellis, and J. A. Thompson. 1999. Association of increased immunostaining for inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine with fibroblast growth factor transformation in pancreatic cancer. *Arch Surg* 134:245-251.
150. Cobbs, C. S., T. R. Whisenhunt, D. R. Wesemann, L. E. Harkins, E. G. Van Meir, and M. Samanta. 2003. Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells. *Cancer Res* 63:8670-8673.
151. Nagaraj, S., K. Gupta, V. Pisarev, L. Kinarsky, S. Sherman, L. Kang, D. L. Herber, J. Schneck, and D. I. Gabrilovich. 2007. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 13:828-835.
152. Yang, R., Z. Cai, Y. Zhang, W. H. t. Yutzy, K. F. Roby, and R. B. Roden. 2006. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res* 66:6807-6815.
153. Yang, H., Y. H. Youm, B. Vandanmagsar, J. Rood, K. G. Kumar, A. A. Butler, and V. D. Dixit. 2009. Obesity accelerates thymic aging. *Blood* 114:3803-3812.
154. Kok, J., C. C. Blyth, H. Foo, M. J. Bailey, D. V. Pilcher, S. A. Webb, I. M. Seppelt, D. E. Dwyer, and J. R. Iredell. 2013. Viral pneumonitis is increased in obese patients during the first wave of pandemic A(H1N1) 2009 virus. *PLoS One* 8:e55631.
155. Cocoros, N. M., T. L. Lash, A. Demaria, Jr., and M. Klompas. 2013. Obesity as a risk factor for severe influenza-like illness. *Influenza Other Respi Viruses*.
156. Paich, H. A., P. A. Sheridan, J. Handy, E. A. Karlsson, S. Schultz-Cherry, M. G. Hudgens, T. L. Noah, S. S. Weir, and M. A. Beck. 2013. Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 Influenza a virus. *Obesity (Silver Spring)*.
157. McGillicuddy, F. C., K. A. Harford, C. M. Reynolds, E. Oliver, M. Claessens, K. H. Mills, and H. M. Roche. 2011. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes* 60:1688-1698.
158. Tilg, H., and A. R. Moschen. 2008. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med* 14:222-231.
159. Peters-Golden, M., and W. R. Henderson, Jr. 2007. Leukotrienes. *N Engl J Med* 357:1841-1854.

160. Miyahara, N., K. Takeda, S. Miyahara, C. Taube, A. Joetham, T. Koya, S. Matsubara, A. Dakhama, A. M. Tager, A. D. Luster, and E. W. Gelfand. 2005. Leukotriene B4 receptor-1 is essential for allergen-mediated recruitment of CD8+ T cells and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 174:4979-4984.
161. Harizi, H., and N. Gualde. 2002. Dendritic cells produce eicosanoids, which modulate generation and functions of antigen-presenting cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:459-466.
162. Winer, S., G. Paltser, Y. Chan, H. Tsui, E. Engleman, D. Winer, and H. M. Dosch. 2009. Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol* 39:2629-2635.
163. Chen, H., J. Qin, P. Wei, J. Zhang, Q. Li, L. Fu, S. Li, C. Ma, and B. Cong. 2009. Effects of leukotriene B4 and prostaglandin E2 on the differentiation of murine Foxp3+ T regulatory cells and Th17 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80:195-200.
164. Martinez-Clemente, M., J. Claria, and E. Titos. 2011. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in obesity, insulin resistance, and fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14:347-353.
165. Kaaman, M., M. Ryden, T. Axelsson, E. Nordstrom, A. Sicard, A. Bouloumie, D. Langin, P. Arner, and I. Dahlman. 2006. ALOX5AP expression, but not gene haplotypes, is associated with obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 30:447-452.
166. Back, M., A. Sultan, O. Ovchinnikova, and G. K. Hansson. 2007. 5-Lipoxygenase-activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ Res* 100:946-949.
167. Spite, M., J. Hellmann, Y. Tang, S. P. Mathis, M. Kosuri, A. Bhatnagar, V. R. Jala, and B. Haribabu. 2011. Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity. *J Immunol* 187:1942-1949.
168. Horrillo, R., A. Gonzalez-Periz, M. Martinez-Clemente, M. Lopez-Parra, N. Ferre, E. Titos, E. Moran-Salvador, R. Deulofeu, V. Arroyo, and J. Claria. 2010. 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. *J Immunol* 184:3978-3987.
169. Mothe-Satney, I., C. Filloux, H. Amghar, C. Pons, V. Bourlier, J. Galitzky, P. A. Grimaldi, C. C. Feral, A. Bouloumie, E. Van Obberghen, and J. G. Neels. 2012. Adipocytes secrete leukotrienes: contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice. *Diabetes* 61:2311-2319.
170. Schroder, K., and J. Tschopp. 2010. The inflammasomes. *Cell* 140:821-832.
171. Dunne, A. 2011. Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection. *Biochem Soc Trans* 39:669-673.
172. Zhou, R., A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, and J. Tschopp. 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11:136-140.
173. Wen, H., J. P. Ting, and L. A. O'Neill. 2012. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol* 13:352-357.
174. Wen, H., D. Gris, Y. Lei, S. Jha, L. Zhang, M. T. Huang, W. J. Brickey, and J. P. Ting. 2011. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 12:408-415.
175. Stienstra, R., L. A. Joosten, T. Koenen, B. van Tits, J. A. van Diepen, S. A. van den Berg, P. C. Rensen, P. J. Voshol, G. Fantuzzi, A. Hijmans, S. Kersten, M. Muller, W. B. van den Berg, N. van Rooijen, M. Wabitsch, B. J. Kullberg, J. W. van der Meer, T. Kanneganti, C. J. Tack, and M. G. Netea. 2010. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 12:593-605.
176. Vandanmagsar, B., Y. H. Youm, A. Ravussin, J. E. Galgani, K. Stadler, R. L. Mynatt, E. Ravussin, J. M. Stephens, and V. D. Dixit. 2011. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 17:179-188.
177. Mandrup-Poulsen, T., L. Pickersgill, and M. Y. Donath. 2010. Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 6:158-166.
178. Masters, S. L., A. Dunne, S. L. Subramanian, R. L. Hull, G. M. Tannahill, F. A. Sharp, C. Becker, L. Franchi, E. Yoshihara, Z. Chen, N. Mooloo, L. A. Mielke, J. Harris, R. C. Coll, K. H. Mills, K. H. Mok, P. Newsholme, G. Nunez, J. Yodoi, S. E. Kahn, E. C. Lavelle, and L. A. O'Neill. 2010. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nat Immunol* 11:897-904.

179. Saitoh, T., N. Fujita, M. H. Jang, S. Uematsu, B. G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, and S. Akira. 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 456:264-268.
180. Chung, Y., S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30:576-587.
181. Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino, and G. S. Hotamisligil. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-614.
182. Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.
183. Hotamisligil, G. S., P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson, and B. M. Spiegelman. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415.
184. Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808.
185. Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder, and H. Hauner. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1023-1033.
186. Jernas, M., J. Palming, K. Sjoholm, E. Jennische, P. A. Svensson, B. G. Gabriellsson, M. Levin, A. Sjogren, M. Rudemo, T. C. Lystig, B. Carlsson, L. M. Carlsson, and M. Lonn. 2006. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *Faseb J* 20:1540-1542.
187. Awazawa, M., K. Ueki, K. Inabe, T. Yamauchi, N. Kubota, K. Kaneko, M. Kobayashi, A. Iwane, T. Sasako, Y. Okazaki, M. Ohsugi, I. Takamoto, S. Yamashita, H. Asahara, S. Akira, M. Kasuga, and T. Kadowaki. 2011. Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell Metab* 13:401-412.
188. Fujisaka, S., I. Usui, M. Icutani, A. Aminuddin, A. Takikawa, K. Tsuneyama, A. Mahmood, N. Goda, Y. Nagai, K. Takatsu, and K. Tobe. 2013. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1alpha-dependent and HIF-1alpha-independent manner in obese mice. *Diabetologia* 56:1403-1412.
189. O'Rourke, R. W., A. E. White, M. D. Metcalf, A. S. Olivas, P. Mitra, W. G. Larison, E. C. Cheang, O. Varlamov, C. L. Corless, C. T. Roberts, Jr., and D. L. Marks. 2011. Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* 54:1480-1490.
190. Kawasaki, N., R. Asada, A. Saito, S. Kanemoto, and K. Imaizumi. 2012. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific reports* 2:799.
191. Hummasti, S., and G. S. Hotamisligil. 2010. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res* 107:579-591.
192. Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Gorgun, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, and G. S. Hotamisligil. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336.
193. Aguirre, V., E. D. Werner, J. Giraud, Y. H. Lee, S. E. Shoelson, and M. F. White. 2002. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277:1531-1537.
194. Wu, D., A. B. Molofsky, H. E. Liang, R. R. Ricardo-Gonzalez, H. A. Jouihan, J. K. Bando, A. Chawla, and R. M. Locksley. 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332:243-247.
195. Wentworth, J. M., G. Naselli, W. A. Brown, L. Doyle, B. Phipson, G. K. Smyth, M. Wabitsch, P. E. O'Brien, and L. C. Harrison. 2010. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 59:1648-1656.
196. Zeyda, M., D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Gyori, G. J. Zlabinger, and T. M. Stulnig. 2007. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)* 31:1420-1428.

197. Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A. S. Greenberg, and M. S. Obin. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347-2355.
198. Oh, D. Y., H. Morinaga, S. Talukdar, E. J. Bae, and J. M. Olefsky. 2012. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes* 61:346-354.
199. Chatterjee, P., S. Seal, S. Mukherjee, R. Kundu, S. Mukherjee, S. Ray, S. Mukhopadhyay, S. S. Majumdar, and S. Bhattacharya. 2013. Adipocyte fetuin-A contributes to macrophage migration into adipose tissue and polarization of macrophages. *J Biol Chem* 288:28324-28330.
200. Osborn, O., and J. M. Olefsky. 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 18:363-374.
201. Curat, C. A., A. Miranville, C. Sengenès, M. Diehl, C. Tonus, R. Busse, and A. Bouloumie. 2004. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53:1285-1292.
202. Amano, S. U., J. L. Cohen, P. Vangala, M. Tencerova, S. M. Nicoloso, J. C. Yawe, Y. Shen, M. P. Czech, and M. Aouadi. 2013. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab* 19:162-171.
203. Haase, J., U. Weyer, K. Immig, N. Kloting, M. Bluher, J. Eilers, I. Bechmann, and M. Gericke. 2013. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia*.
204. Weisberg, S. P., D. Hunter, R. Huber, J. Lemieux, S. Slaymaker, K. Vaddi, I. Charo, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, Jr. 2006. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116:115-124.
205. Solinas, G., C. Vilcu, J. G. Neels, G. K. Bandyopadhyay, J. L. Luo, W. Naugler, S. Grivnenikov, A. Wynshaw-Boris, M. Scadeng, J. M. Olefsky, and M. Karin. 2007. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab* 6:386-397.
206. Sachithanandan, N., K. L. Graham, S. Galic, J. E. Honeyman, S. L. Fynch, K. A. Hewitt, G. R. Steinberg, and T. W. Kay. 2011. Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. *Diabetes* 60:2023-2031.
207. Kang, K., S. M. Reilly, V. Karabacak, M. R. Gangl, K. Fitzgerald, B. Hatano, and C. H. Lee. 2008. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 7:485-495.
208. Arkan, M. C., A. L. Hevener, F. R. Greten, S. Maeda, Z. W. Li, J. M. Long, A. Wynshaw-Boris, G. Poli, J. Olefsky, and M. Karin. 2005. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11:191-198.
209. Stefanovic-Racic, M., X. Yang, M. S. Turner, B. S. Mantell, D. B. Stolz, T. L. Sumpter, I. J. Sipula, N. Dedousis, D. K. Scott, P. A. Morel, A. W. Thomson, and R. M. O'Doherty. 2012. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes* 61:2330-2339.
210. Bertola, A., T. Ciucci, D. Rousseau, V. Bourlier, C. Duffaut, S. Bonnafous, C. Blin-Wakkach, R. Anty, A. Iannelli, J. Gugenheim, A. Tran, A. Bouloumie, P. Gual, and A. Wakkach. 2012. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 61:2238-2247.
211. Elgazar-Carmon, V., A. Rudich, N. Hadad, and R. Levy. 2008. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* 49:1894-1903.
212. Talukdar, S., Y. Oh da, G. Bandyopadhyay, D. Li, J. Xu, J. McNelis, M. Lu, P. Li, Q. Yan, Y. Zhu, J. Ofrecio, M. Lin, M. B. Brenner, and J. M. Olefsky. 2012. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* 18:1407-1412.
213. Nijhuis, J., S. S. Rensen, Y. Slaats, F. M. van Dielen, W. A. Burman, and J. W. Greve. 2009. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 17:2014-2018.

214. Liu, J., A. Divoux, J. Sun, J. Zhang, K. Clement, J. N. Glickman, G. K. Sukhova, P. J. Wolters, J. Du, C. Z. Gorgun, A. Doria, P. Libby, R. S. Blumberg, B. B. Kahn, G. S. Hotamisligil, and G. P. Shi. 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 15:940-945.
215. Wang, Z., H. Zhang, X. H. Shen, K. L. Jin, G. F. Ye, L. Qian, B. Li, Y. H. Zhang, and G. P. Shi. 2011. Immunoglobulin E and mast cell proteases are potential risk factors of human pre-diabetes and diabetes mellitus. *PLoS One* 6:e28962.
216. Xia, S., H. Sha, L. Yang, Y. Ji, S. Ostrand-Rosenberg, and L. Qi. 2011. Gr-1+ CD11b+ myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity. *J Biol Chem* 286:23591-23599.
217. Yin, B., G. Ma, C. Y. Yen, Z. Zhou, G. X. Wang, C. M. Divino, S. Casares, S. H. Chen, W. C. Yang, and P. Y. Pan. 2010. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J Immunol* 185:5828-5834.
218. Winer, D. A., S. Winer, L. Shen, P. P. Wadia, J. Yantha, G. Paltser, H. Tsui, P. Wu, M. G. Davidson, M. N. Alonso, H. X. Leong, A. Glassford, M. Caimol, J. A. Kenkel, T. F. Tedder, T. McLaughlin, D. B. Miklos, H. M. Dosch, and E. G. Engleman. 2011. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17:610-617.
219. DeFuria, J., A. C. Belkina, M. Jagannathan-Bogdan, J. Snyder-Cappione, J. D. Carr, Y. R. Nersesova, D. Markham, K. J. Strissel, A. A. Watkins, M. Zhu, J. Allen, J. Bouchard, G. Toraldo, R. Jasuja, M. S. Obin, M. E. McDonnell, C. Apovian, G. V. Denis, and B. S. Nikolajczyk. 2013. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5133-5138.
220. Nishimura, S., I. Manabe, S. Takaki, M. Nagasaki, M. Otsu, H. Yamashita, J. Sugita, K. Yoshimura, K. Eto, I. Komuro, T. Kadowaki, and R. Nagai. 2013. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metab*.
221. Pacifico, L., L. Di Renzo, C. Anania, J. F. Osborn, F. Ippoliti, E. Schiavo, and C. Chiesa. 2006. Increased T-helper interferon-gamma-secreting cells in obese children. *Eur J Endocrinol* 154:691-697.
222. Winer, S., Y. Chan, G. Paltser, D. Truong, H. Tsui, J. Bahrami, R. Dorfman, Y. Wang, J. Zielenski, F. Mastronardi, Y. Maezawa, D. J. Drucker, E. Engleman, D. Winer, and H. M. Dosch. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15:921-929.
223. Kintscher, U., M. Hartge, K. Hess, A. Foryst-Ludwig, M. Clemenz, M. Wabitsch, P. Fischer-Posovszky, T. F. Barth, D. Dragun, T. Skurk, H. Hauner, M. Bluher, T. Unger, A. M. Wolf, U. Knippschild, V. Hombach, and N. Marx. 2008. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28:1304-1310.
224. Rocha, V. Z., E. J. Folco, G. Sukhova, K. Shimizu, I. Gotsman, A. H. Vernon, and P. Libby. 2008. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res* 103:467-476.
225. Wu, H., S. Ghosh, X. D. Perrard, L. Feng, G. E. Garcia, J. L. Perrard, J. F. Sweeney, L. E. Peterson, L. Chan, C. W. Smith, and C. M. Ballantyne. 2007. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115:1029-1038.
226. Duffaut, C., A. Zakaroff-Girard, V. Bourlier, P. Decaunes, M. Maumus, P. Chiotasso, C. Sengenès, M. Lafontan, J. Galitzky, and A. Bouloumie. 2009. Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29:1608-1614.
227. O'Rourke, R. W., M. D. Metcalf, A. E. White, A. Madala, B. R. Winters, Maizlin, II, B. A. Jobe, C. T. Roberts, Jr., M. K. Slifka, and D. L. Marks. 2009. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 33:978-990.
228. Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, F. A. Carvalho, T. C. Cullender, S. Mwangi, S. Srinivasan, S. V. Sitaraman, R. Knight, R. E. Ley, and A. T. Gewirtz. 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328:228-231.

229. Deiliulis, J., Z. Shah, N. Shah, B. Needleman, D. Mikami, V. Narula, K. Perry, J. Hazey, T. Kampfrath, M. Kollengode, Q. Sun, A. R. Satoskar, C. Lumeng, S. Moffatt-Bruce, and S. Rajagopalan. 2011. Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. *PLoS One* 6:e16376.
230. van der Weerd, K., W. A. Dik, B. Schrijver, D. H. Schweitzer, A. W. Langerak, H. A. Drexhage, R. M. Kiewiet, M. O. van Aken, A. van Huisstede, J. J. van Dongen, A. J. van der Lelij, F. J. Staal, and P. M. van Hagen. 2012. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* 61:401-408.
231. Zuniga, L. A., W. J. Shen, B. Joyce-Shaikh, E. A. Pyatnova, A. G. Richards, C. Thom, S. M. Andrade, D. J. Cua, F. B. Kraemer, and E. C. Butcher. 2010. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 185:6947-6959.
232. Jagannathan-Bogdan, M., M. E. McDonnell, H. Shin, Q. Rehman, H. Hasturk, C. M. Apovian, and B. S. Nikolajczyk. 2011. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol* 186:1162-1172.
233. Goossens, G. H., E. E. Blaak, R. Theunissen, A. M. Duijvestijn, K. Clement, J. W. Tervaert, and M. M. Thewissen. 2012. Expression of NLRP3 inflammasome and T cell population markers in adipose tissue are associated with insulin resistance and impaired glucose metabolism in humans. *Mol Immunol* 50:142-149.
234. Fabbrini, E., M. Cella, S. A. McCartney, A. Fuchs, N. A. Abumrad, T. A. Pietka, Z. Chen, B. N. Finck, D. H. Han, F. Magkos, C. Conte, D. Bradley, G. Fraterrigo, J. C. Eagon, B. W. Patterson, M. Colonna, and S. Klein. 2013. Association between specific adipose tissue CD4<sup>+</sup> T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* 145:366-374 e361-363.
235. Zhu, L., Y. Wu, H. Wei, X. Xing, N. Zhan, H. Xiong, and B. Peng. 2011. IL-17R activation of human periodontal ligament fibroblasts induces IL-23 p19 production: Differential involvement of NF-kappaB versus JNK/AP-1 pathways. *Mol Immunol* 48:647-656.
236. Yagi, Y., A. Andoh, O. Inatomi, T. Tsujikawa, and Y. Fujiyama. 2007. Inflammatory responses induced by interleukin-17 family members in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J Gastroenterol* 42:746-753.
237. Kopp, A., C. Buechler, M. Neumeier, J. Weigert, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and A. Schaffler. 2009. Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 17:648-656.
238. Feuerer, M., L. Herrero, D. Cipolletta, A. Naaz, J. Wong, A. Nayer, J. Lee, A. B. Goldfine, C. Benoist, S. Shoelson, and D. Mathis. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15:930-939.
239. Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki, and R. Nagai. 2009. CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15:914-920.
240. Rausch, M. E., S. Weisberg, P. Vardhana, and D. V. Tortoriello. 2008. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 32:451-463.
241. Kunz, J., R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuter-Reinhard, N. R. Movva, and M. N. Hall. 1993. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73:585-596.
242. Cafferkey, R., P. R. Young, M. M. McLaughlin, D. J. Bergsma, Y. Koltin, G. M. Sathe, L. Faucette, W. K. Eng, R. K. Johnson, and G. P. Livi. 1993. Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 13:6012-6023.
243. Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst, and S. H. Snyder. 1994. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78:35-43.
244. Brown, E. J., M. W. Albers, T. B. Shin, K. Ichikawa, C. T. Keith, W. S. Lane, and S. L. Schreiber. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369:756-758.

245. Laplante, M., and D. M. Sabatini. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274-293.
246. Ma, X. M., and J. Blenis. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:307-318.
247. Laplante, M., and D. M. Sabatini. 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122:3589-3594.
248. Duvel, K., J. L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A. I. Lipovsky, A. L. Souza, E. Triantafellow, Q. Ma, R. Gorski, S. Cleaver, M. G. Vander Heiden, J. P. MacKeigan, P. M. Finan, C. B. Clish, L. O. Murphy, and B. D. Manning. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39:171-183.
249. Laughner, E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon, and G. L. Semenza. 2001. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21:3995-4004.
250. Cunningham, J. T., J. T. Rodgers, D. H. Arlow, F. Vazquez, V. K. Mootha, and P. Puigserver. 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450:736-740.
251. Brugarolas, J. B., F. Vazquez, A. Reddy, W. R. Sellers, and W. G. Kaelin, Jr. 2003. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell* 4:147-158.
252. Jung, C. H., C. B. Jun, S. H. Ro, Y. M. Kim, N. M. Otto, J. Cao, M. Kundu, and D. H. Kim. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20:1992-2003.
253. Ganley, I. G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, S. Chen, and X. Jiang. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 284:12297-12305.
254. Settembre, C., R. Zoncu, D. L. Medina, F. Vetrini, S. Erdin, T. Huynh, M. Ferron, G. Karsenty, M. C. Vellard, V. Facchinetti, D. M. Sabatini, and A. Ballabio. 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *Embo J* 31:1095-1108.
255. Pena-Llopis, S., and J. Brugarolas. 2011. TFEB, a novel mTORC1 effector implicated in lysosome biogenesis, endocytosis and autophagy. *Cell Cycle* 10:3987-3988.
256. Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard, and D. M. Sabatini. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159-168.
257. Phung, T. L., K. Ziv, D. Dabydeen, G. Eyiah-Mensah, M. Riveros, C. Perruzzi, J. Sun, R. A. Monahan-Earley, I. Shiojima, J. A. Nagy, M. I. Lin, K. Walsh, A. M. Dvorak, D. M. Briscoe, M. Neeman, W. C. Sessa, H. F. Dvorak, and L. E. Benjamin. 2006. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell* 10:159-170.
258. Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger, and M. N. Hall. 2011. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144:757-768.
259. Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101.
260. Garcia-Martinez, J. M., and D. R. Alessi. 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416:375-385.
261. Sarbassov, D. D., S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. M. Sabatini. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14:1296-1302.
262. Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall, and M. N. Hall. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6:1122-1128.
263. Yang, Q., K. Inoki, T. Ikenoue, and K. L. Guan. 2006. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* 20:2820-2832.
264. Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin, and B. Su. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127:125-137.

265. Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald, and D. M. Sabatini. 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 11:859-871.
266. Gangloff, Y. G., M. Mueller, S. G. Dann, P. Svoboda, M. Sticker, J. F. Spetz, S. H. Um, E. J. Brown, S. Cereghini, G. Thomas, and S. C. Kozma. 2004. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol* 24:9508-9516.
267. Polak, P., and M. N. Hall. 2009. mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 21:209-218.
268. Polak, P., N. Cybulski, J. N. Feige, J. Auwerx, M. A. Ruegg, and M. N. Hall. 2008. Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. *Cell Metab* 8:399-410.
269. Kim, J. E., and J. Chen. 2004. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* 53:2748-2756.
270. Gagnon, A., S. Lau, and A. Sorisky. 2001. Rapamycin-sensitive phase of 3T3-L1 preadipocyte differentiation after clonal expansion. *J Cell Physiol* 189:14-22.
271. Zhang, C., M. S. Yoon, and J. Chen. 2009. Amino acid-sensing mTOR signaling is involved in modulation of lipolysis by chronic insulin treatment in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E862-868.
272. Kumar, A., J. C. Lawrence, Jr., D. Y. Jung, H. J. Ko, S. R. Keller, J. K. Kim, M. A. Magnuson, and T. E. Harris. 2010. Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 59:1397-1406.
273. Um, S. H., F. Frigerio, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P. R. Allegrini, S. C. Kozma, J. Auwerx, and G. Thomas. 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431:200-205.
274. Khamzina, L., A. Veilleux, S. Bergeron, and A. Marette. 2005. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146:1473-1481.
275. Ozcan, U., L. Ozcan, E. Yilmaz, K. Duvel, M. Sahin, B. D. Manning, and G. S. Hotamisligil. 2008. Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol Cell* 29:541-551.
276. Hotamisligil, G. S. 2010. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140:900-917.
277. Philp, A., D. L. Hamilton, and K. Baar. 2011. Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1. *J Appl Physiol* (1985) 110:561-568.
278. Bentzinger, C. F., K. Romanino, D. Cloetta, S. Lin, J. B. Mascarenhas, F. Oliveri, J. Xia, E. Casanova, C. F. Costa, M. Brink, F. Zorzato, M. N. Hall, and M. A. Ruegg. 2008. Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab* 8:411-424.
279. Kumar, A., T. E. Harris, S. R. Keller, K. M. Choi, M. A. Magnuson, and J. C. Lawrence, Jr. 2008. Muscle-specific deletion of rictor impairs insulin-stimulated glucose transport and enhances Basal glycogen synthase activity. *Mol Cell Biol* 28:61-70.
280. Wang, Y., and H. A. Tissenbaum. 2006. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev* 127:48-56.
281. Sparks, L. M., H. Xie, R. A. Koza, R. Mynatt, M. W. Hulver, G. A. Bray, and S. R. Smith. 2005. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54:1926-1933.
282. Patti, M. E., A. J. Butte, S. Crunkhorn, K. Cusi, R. Berria, S. Kashyap, Y. Miyazaki, I. Kohane, M. Costello, R. Saccone, E. J. Landaker, A. B. Goldfine, E. Mun, R. DeFronzo, J. Finlayson, C. R. Kahn, and L. J. Mandarino. 2003. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466-8471.

283. Mootha, V. K., C. M. Lindgren, K. F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstrale, E. Laurila, N. Houstis, M. J. Daly, N. Patterson, J. P. Mesirov, T. R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E. S. Lander, J. N. Hirschhorn, D. Altshuler, and L. C. Groop. 2003. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273.
284. Sengupta, S., T. R. Peterson, M. Laplante, S. Oh, and D. M. Sabatini. 2010. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 468:1100-1104.
285. Yecies, J. L., H. H. Zhang, S. Menon, S. Liu, D. Yecies, A. I. Lipovsky, C. Gorgun, D. J. Kwiatkowski, G. S. Hotamisligil, C. H. Lee, and B. D. Manning. 2011. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab* 14:21-32.
286. Li, S., M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 2010. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3441-3446.
287. Tremblay, F., S. Brule, S. Hee Um, Y. Li, K. Masuda, M. Roden, X. J. Sun, M. Krebs, R. D. Polakiewicz, G. Thomas, and A. Marette. 2007. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14056-14061.
288. Peterson, T. R., S. S. Sengupta, T. E. Harris, A. E. Carmack, S. A. Kang, E. Balderas, D. A. Guertin, K. L. Madden, A. E. Carpenter, B. N. Finck, and D. M. Sabatini. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146:408-420.
289. Shigeyama, Y., T. Kobayashi, Y. Kido, N. Hashimoto, S. Asahara, T. Matsuda, A. Takeda, T. Inoue, Y. Shibutani, M. Koyanagi, T. Uchida, M. Inoue, O. Hino, M. Kasuga, and T. Noda. 2008. Biphasic response of pancreatic beta-cell mass to ablation of tuberous sclerosis complex 2 in mice. *Mol Cell Biol* 28:2971-2979.
290. Rachdi, L., N. Balcazar, F. Osorio-Duque, L. Elghazi, A. Weiss, A. Gould, K. J. Chang-Chen, M. J. Gambello, and E. Bernal-Mizrachi. 2008. Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9250-9255.
291. Gu, Y., J. Lindner, A. Kumar, W. Yuan, and M. A. Magnuson. 2011. Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between beta-cell proliferation and cell size. *Diabetes* 60:827-837.
292. Elghazi, L., N. Balcazar, M. Blandino-Rosano, C. Cras-Meneur, S. Fatrai, A. P. Gould, M. M. Chi, K. H. Moley, and E. Bernal-Mizrachi. Decreased IRS signaling impairs beta-cell cycle progression and survival in transgenic mice overexpressing S6K in beta-cells. *Diabetes* 59:2390-2399.
293. Klein, B. Y., H. Tamir, D. L. Hirschberg, S. B. Glickstein, and M. G. Welch. 2013. Oxytocin modulates mTORC1 pathway in the gut. *Biochem Biophys Res Commun* 432:466-471.
294. Makky, K., J. Tekiela, and A. N. Mayer. 2007. Target of rapamycin (TOR) signaling controls epithelial morphogenesis in the vertebrate intestine. *Dev Biol* 303:501-513.
295. Rhoads, J. M., X. Niu, J. Odle, and L. M. Graves. 2006. Role of mTOR signaling in intestinal cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G510-517.
296. Nakamura, A., K. Hara, K. Yamamoto, H. Yasuda, H. Moriyama, M. Hirai, M. Nagata, and K. Yokono. 2012. Role of the mTOR complex 1 pathway in the in vivo maintenance of the intestinal mucosa by oral intake of amino acids. *Geriatr Gerontol Int* 12:131-139.
297. Yilmaz, O. H., P. Katajisto, D. W. Lamming, Y. Gultekin, K. E. Bauer-Rowe, S. Sengupta, K. Birsoy, A. Dursun, V. O. Yilmaz, M. Selig, G. P. Nielsen, M. Mino-Kenudson, L. R. Zukerberg, A. K. Bhan, V. Deshpande, and D. M. Sabatini. 2012. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* 486:490-495.
298. Weichhart, T., and M. D. Saemann. 2009. The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol* 30:218-226.
299. Mills, R. E., and J. M. Jameson. 2009. T cell dependence on mTOR signaling. *Cell Cycle* 8:545-548.
300. Delgoffe, G. M., and J. D. Powell. 2009. mTOR: taking cues from the immune microenvironment. *Immunology* 127:459-465.
301. Turnquist, H. R., J. Cardinal, C. Macedo, B. R. Rosborough, T. L. Sumpter, D. A. Geller, D. Metes, and A. W. Thomson. 2010. mTOR and GSK-3 shape the CD4<sup>+</sup> T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS. *Blood* 115:4758-4769.

302. Haidinger, M., M. Poglitsch, R. Geyeregger, S. Kasturi, M. Zeyda, G. J. Zlabinger, B. Pulendran, W. H. Horl, M. D. Saemann, and T. Weichhart. 2010. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *J Immunol* 185:3919-3931.
303. Colina, R., M. Costa-Mattioli, R. J. Dowling, M. Jaramillo, L. H. Tai, C. J. Breitbach, Y. Martineau, O. Larsson, L. Rong, Y. V. Svitkin, A. P. Makrigiannis, J. C. Bell, and N. Sonenberg. 2008. Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* 452:323-328.
304. Thomson, A. W., H. R. Turnquist, and G. Raimondi. 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 9:324-337.
305. Hackstein, H., T. Taner, A. F. Zahorchak, A. E. Morelli, A. J. Logar, A. Gessner, and A. W. Thomson. 2003. Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* 101:4457-4463.
306. Hackstein, H., T. Taner, A. J. Logar, and A. W. Thomson. 2002. Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells. *Blood* 100:1084-1087.
307. Jagannath, C., D. R. Lindsey, S. Dhandayuthapani, Y. Xu, R. L. Hunter, Jr., and N. T. Eissa. 2009. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med* 15:267-276.
308. Sordi, V., G. Bianchi, C. Buracchi, A. Mercurio, F. Marchesi, G. D'Amico, C. H. Yang, W. Luini, A. Vecchi, A. Mantovani, P. Allavena, and L. Piemonti. 2006. Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin. *Transplantation* 82:826-834.
309. Weichhart, T., G. Costantino, M. Poglitsch, M. Rosner, M. Zeyda, K. M. Stuhlmeier, T. Kolbe, T. M. Stulnig, W. H. Horl, M. Hengstschlager, M. Muller, and M. D. Saemann. 2008. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 29:565-577.
310. Baker, A. K., R. Wang, N. Mackman, and J. P. Luyendyk. 2009. Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages by reducing IL-10 expression. *Mol Immunol* 46:2249-2255.
311. Yang, C. S., C. H. Song, J. S. Lee, S. B. Jung, J. H. Oh, J. Park, H. J. Kim, J. K. Park, T. H. Paik, and E. K. Jo. 2006. Intracellular network of phosphatidylinositol 3-kinase, mammalian target of the rapamycin/70 kDa ribosomal S6 kinase 1, and mitogen-activated protein kinases pathways for regulating mycobacteria-induced IL-23 expression in human macrophages. *Cell Microbiol* 8:1158-1171.
312. Weinstein, S. L., A. J. Finn, S. H. Dave, F. Meng, C. A. Lowell, J. S. Sanghera, and A. L. DeFranco. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon-beta. *J Leukoc Biol* 67:405-414.
313. Fox, R., T. Q. Nhan, G. L. Law, D. R. Morris, W. C. Liles, and S. M. Schwartz. 2007. PSGL-1 and mTOR regulate translation of ROCK-1 and physiological functions of macrophages. *Embo J* 26:505-515.
314. Pan, H., T. F. O'Brien, P. Zhang, and X. P. Zhong. 2012. The role of tuberous sclerosis complex 1 in regulating innate immunity. *J Immunol* 188:3658-3666.
315. Mercurio, A., I. Calavita, E. Dugnani, A. Citro, E. Cantarelli, R. Nano, R. Melzi, P. Maffi, A. Secchi, V. Sordi, and L. Piemonti. 2013. Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1. *Immunology* 140:179-190.
316. Byles, V., A. J. Covarrubias, I. Ben-Sahra, D. W. Lamming, D. M. Sabatini, B. D. Manning, and T. Horng. 2013. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun* 4:2834.
317. McInturff, A. M., M. J. Cody, E. A. Elliott, J. W. Glenn, J. W. Rowley, M. T. Rondina, and C. C. Yost. 2012. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Blood* 120:3118-3125.
318. Lorne, E., X. Zhao, J. W. Zmijewski, G. Liu, Y. J. Park, Y. Tsuruta, and E. Abraham. 2009. Participation of mammalian target of rapamycin complex 1 in Toll-like receptor 2- and 4-induced neutrophil activation and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41:237-245.
319. Gomez-Cambronero, J. 2003. Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration. *FEBS Lett* 550:94-100.

320. Liu, L., S. Das, W. Losert, and C. A. Parent. 2010. mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev Cell* 19:845-857.
321. Yamaki, K., and S. Yoshino. 2012. Preventive and therapeutic effects of rapamycin, a mammalian target of rapamycin inhibitor, on food allergy in mice. *Allergy* 67:1259-1270.
322. Kim, M. S., H. S. Kuehn, D. D. Metcalfe, and A. M. Gilfillan. 2008. Activation and function of the mTORC1 pathway in mast cells. *J Immunol* 180:4586-4595.
323. Smrz, D., M. S. Kim, S. Zhang, B. A. Mock, S. Smrzova, W. DuBois, O. Simakova, I. Maric, T. M. Wilson, D. D. Metcalfe, and A. M. Gilfillan. 2011. mTORC1 and mTORC2 differentially regulate homeostasis of neoplastic and non-neoplastic human mast cells. *Blood* 118:6803-6813.
324. Weichhart, T., M. Haidinger, K. Katholnig, C. Kopecky, M. Poglitsch, C. Lassnig, M. Rosner, G. J. Zlabinger, M. Hengstschlager, M. Muller, W. H. Horl, and M. D. Saemann. 2011. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood* 117:4273-4283.
325. Schmitz, F., A. Heit, S. Dreher, K. Eisenacher, J. Mages, T. Haas, A. Krug, K. P. Janssen, C. J. Kirschning, and H. Wagner. 2008. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J Immunol* 38:2981-2992.
326. Delgoffe, G. M., K. N. Pollizzi, A. T. Waickman, E. Heikamp, D. J. Meyers, M. R. Horton, B. Xiao, P. F. Worley, and J. D. Powell. 2011. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol* 12:295-303.
327. Yang, K., G. Neale, D. R. Green, W. He, and H. Chi. 2011. The tumor suppressor Tsc1 enforces quiescence of naive T cells to promote immune homeostasis and function. *Nat Immunol* 12:888-897.
328. Lee, K., P. Gudapati, S. Dragovic, C. Spencer, S. Joyce, N. Killeen, M. A. Magnuson, and M. Boothby. 2010. Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* 32:743-753.
329. Araki, K., B. Youngblood, and R. Ahmed. 2010. The role of mTOR in memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol Rev* 235:234-243.
330. Araki, K., A. P. Turner, V. O. Shaffer, S. Gangappa, S. A. Keller, M. F. Bachmann, C. P. Larsen, and R. Ahmed. 2009. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460:108-112.
331. Rao, R. R., Q. Li, M. R. Gubbels Bupp, and P. A. Shrikant. 2012. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 36:374-387.
332. Sinclair, L. V., D. Finlay, C. Feijoo, G. H. Cornish, A. Gray, A. Ager, K. Okkenhaug, T. J. Hagenbeek, H. Spits, and D. A. Cantrell. 2008. Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 9:513-521.
333. Zheng, Y., S. L. Collins, M. A. Lutz, A. N. Allen, T. P. Kole, P. E. Zarek, and J. D. Powell. 2007. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J Immunol* 178:2163-2170.
334. Zhong, X. P., J. Shin, B. K. Gorentla, T. O'Brien, S. Srivatsan, L. Xu, Y. Chen, D. Xie, and H. Pan. 2011. Receptor signaling in immune cell development and function. *Immunol Res* 49:109-123.
335. Perkey, E., D. Fingar, R. A. Miller, and G. G. Garcia. 2013. Increased mammalian target of rapamycin complex 2 signaling promotes age-related decline in CD4 T cell signaling and function. *J Immunol* 191:4648-4655.
336. Monti, P., M. Scirpoli, P. Maffi, L. Piemonti, A. Secchi, E. Bonifacio, M. G. Roncarolo, and M. Battaglia. 2008. Rapamycin monotherapy in patients with type 1 diabetes modifies CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T-cells. *Diabetes* 57:2341-2347.
337. Battaglia, M., A. Stabilini, B. Migliavacca, J. Horejs-Hoeck, T. Kaupper, and M. G. Roncarolo. 2006. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 177:8338-8347.
338. Kang, J., S. J. Huddlestone, J. M. Fraser, and A. Khoruts. 2008. De novo induction of antigen-specific CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in vivo following systemic antigen administration accompanied by blockade of mTOR. *J Leukoc Biol* 83:1230-1239.
339. Battaglia, M., A. Stabilini, and M. G. Roncarolo. 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105:4743-4748.

340. Sauer, S., L. Bruno, A. Hertweck, D. Finlay, M. Leleu, M. Spivakov, Z. A. Knight, B. S. Cobb, D. Cantrell, E. O'Connor, K. M. Shokat, A. G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7797-7802.
341. Peter, C., H. Waldmann, and S. P. Cobbold. 2010. mTOR signalling and metabolic regulation of T cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 22:655-661.
342. Cobbold, S. P., E. Adams, C. A. Farquhar, K. F. Nolan, D. Howie, K. O. Lui, P. J. Fairchild, A. L. Mellor, D. Ron, and H. Waldmann. 2009. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12055-12060.
343. Zeng, H., K. Yang, C. Cloer, G. Neale, P. Vogel, and H. Chi. 2013. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* 499:485-490.
344. Zhang, F., A. S. Lazorchak, D. Liu, F. Chen, and B. Su. 2011. Inhibition of the mTORC2 and chaperone pathways to treat leukemia. *Blood* 119:6080-6088.
345. Benhamron, S., and B. Tirosh. 2011. Direct activation of mTOR in B lymphocytes confers impairment in B-cell maturation and loss of marginal zone B cells. *Eur J Immunol* 41:2390-2396.
346. Donahue, A. C., and D. A. Fruman. 2007. Distinct signaling mechanisms activate the target of rapamycin in response to different B-cell stimuli. *Eur J Immunol* 37:2923-2936.
347. Donahue, A. C., and D. A. Fruman. 2003. Proliferation and survival of activated B cells requires sustained antigen receptor engagement and phosphoinositide 3-kinase activation. *J Immunol* 170:5851-5860.
348. Hess, K. L., A. C. Donahue, K. L. Ng, T. I. Moore, J. Oak, and D. A. Fruman. 2004. Frontline: The p85alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase is essential for a subset of B cell receptor-initiated signaling responses. *Eur J Immunol* 34:2968-2976.
349. Goldfinger, M., M. Shmuel, S. Benhamron, and B. Tirosh. 2011. Protein synthesis in plasma cells is regulated by crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Eur J Immunol* 41:491-502.
350. Lamming, D. W., L. Ye, D. M. Sabatini, and J. A. Baur. 2013. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest* 123:980-989.
351. Champion, L., M. Stern, D. Israel-Biet, M. F. Mamzer-Bruneel, M. N. Peraldi, H. Kreis, R. Porcher, and E. Morelon. 2006. Brief communication: sirolimus-associated pneumonitis: 24 cases in renal transplant recipients. *Annals of internal medicine* 144:505-509.
352. Morelon, E., M. Stern, D. Israel-Biet, J. M. Correas, C. Danel, M. F. Mamzer-Bruneel, M. N. Peraldi, and H. Kreis. 2001. Characteristics of sirolimus-associated interstitial pneumonitis in renal transplant patients. *Transplantation* 72:787-790.
353. Mahe, E., E. Morelon, S. Lechaton, H. Kreis, Y. de Prost, and C. Bodemer. 2007. Angioedema in renal transplant recipients on sirolimus. *Dermatology* 214:205-209.
354. Mahe, E., E. Morelon, S. Lechaton, K. H. Sang, R. Mansouri, M. F. Ducasse, M. F. Mamzer-Bruneel, Y. de Prost, H. Kreis, and C. Bodemer. 2005. Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy. *Transplantation* 79:476-482.
355. Thauinat, O., C. Beaumont, L. Chatenoud, S. Lechaton, M. F. Mamzer-Bruneel, B. Varet, H. Kreis, and E. Morelon. 2005. Anemia after late introduction of sirolimus may correlate with biochemical evidence of a chronic inflammatory state. *Transplantation* 80:1212-1219.
356. Buron, F., P. Malvezzi, E. Villar, C. Chauvet, B. Janbon, L. Denis, M. Brunet, S. Daoud, R. Cahen, C. Pouteil-Noble, M. C. Gagnieu, J. Bienvenu, F. Bayle, E. Morelon, and O. Thauinat. 2013. Profiling sirolimus-induced inflammatory syndrome: a prospective tricentric observational study. *PLoS One* 8:e53078.
357. Gyurus, E., Z. Kaposztas, and B. D. Kahan. 2011. Sirolimus therapy predisposes to new-onset diabetes mellitus after renal transplantation: a long-term analysis of various treatment regimens. *Transplantation proceedings* 43:1583-1592.
358. Gupta-Ganguli, M., K. Cox, B. Means, I. Gerling, and S. S. Solomon. 2011. Does therapy with anti-TNF-alpha improve glucose tolerance and control in patients with type 2 diabetes? *Diabetes care* 34:e121.

359. Ogata, A., A. Morishima, T. Hirano, Y. Hishitani, K. Hagihara, Y. Shima, M. Narazaki, and T. Tanaka. 2011. Improvement of HbA1c during treatment with humanised anti-interleukin 6 receptor antibody, tocilizumab. *Annals of the rheumatic diseases* 70:1164-1165.
360. Owyang, A. M., K. Maedler, L. Gross, J. Yin, L. Esposito, L. Shu, J. Jadhav, E. Domsgen, J. Bergemann, S. Lee, and S. Kantak. 2010. XOMA 052, an anti-IL-1{beta} monoclonal antibody, improves glucose control and {beta}-cell function in the diet-induced obesity mouse model. *Endocrinology* 151:2515-2527.
361. Williams, L. M. 2012. Hypothalamic dysfunction in obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society* 71:521-533.
362. Strijbos, P. J., A. J. Hardwick, J. K. Relton, F. Carey, and N. J. Rothwell. 1992. Inhibition of central actions of cytokines on fever and thermogenesis by lipocortin-1 involves CRF. *The American journal of physiology* 263:E632-636.
363. Nguyen, K. D., Y. Qiu, X. Cui, Y. P. Goh, J. Mwangi, T. David, L. Mukundan, F. Brombacher, R. M. Locksley, and A. Chawla. 2011. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480:104-108.
364. Barlow, A. D., M. L. Nicholson, and T. P. Herbert. 2013. Evidence for rapamycin toxicity in pancreatic beta-cells and a review of the underlying molecular mechanisms. *Diabetes* 62:2674-2682.
365. Obici, S., Z. Feng, G. Karkanas, D. G. Baskin, and L. Rossetti. 2002. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature neuroscience* 5:566-572.
366. Poci, A., T. K. Lam, R. Gutierrez-Juarez, S. Obici, G. J. Schwartz, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, and L. Rossetti. 2005. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434:1026-1031.
367. Bruun, J. M., A. S. Lihn, C. Verdich, S. B. Pedersen, S. Toubro, A. Astrup, and B. Richelsen. 2003. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E527-533.
368. Simons, P. J., P. S. van den Pangaart, J. M. Aerts, and L. Boon. 2007. Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. *The Journal of endocrinology* 192:289-299.
369. Tang, T., J. Zhang, J. Yin, J. Staszkiwicz, B. Gawronska-Kozak, D. Y. Jung, H. J. Ko, H. Ong, J. K. Kim, R. Mynatt, R. J. Martin, M. Keenan, Z. Gao, and J. Ye. 2010. Uncoupling of inflammation and insulin resistance by NF-kappaB in transgenic mice through elevated energy expenditure. *J Biol Chem* 285:4637-4644.
370. Gabrysova, L., J. R. Christensen, X. Wu, A. Kissenpfennig, B. Malissen, and A. O'Garra. 2011. Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF-beta-dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 41:1242-1248.
371. Eller, K., A. Kirsch, A. M. Wolf, S. Sopper, A. Tagwerker, U. Stanzl, D. Wolf, W. Patsch, A. R. Rosenkranz, and P. Eller. 2011. Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes* 60:2954-2962.
372. Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmee, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrieres, J. F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi, and R. Burcelin. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772.
373. Karlsson, C. L., J. Onnerfalt, J. Xu, G. Molin, S. Ahrne, and K. Thorngren-Jerneck. 2012. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)* 20:2257-2261.
374. Bhatena, J., C. Martoni, A. Kulamarva, C. Tomaro-Duchesneau, M. Malhotra, A. Paul, A. M. Urbanska, and S. Prakash. 2013. Oral probiotic microcapsule formulation ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in Bio F1B Golden Syrian hamsters. *PLoS One* 8:e58394.
375. Ma, Y. Y., L. Li, C. H. Yu, Z. Shen, L. H. Chen, and Y. M. Li. 2013. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology : WJG* 19:6911-6918.
376. Yadav, H., J. H. Lee, J. Lloyd, P. Walter, and S. G. Rane. 2013. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J Biol Chem* 288:25088-25097.

377. Kanoski, S. E., S. M. Fortin, M. Arnold, H. J. Grill, and M. R. Hayes. 2011. Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology* 152:3103-3112.
378. Kimura, I., K. Ozawa, D. Inoue, T. Imamura, K. Kimura, T. Maeda, K. Terasawa, D. Kashihara, K. Hirano, T. Tani, T. Takahashi, S. Miyauchi, G. Shioi, H. Inoue, and G. Tsujimoto. 2013. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun* 4:1829.
379. Maslowski, K. M., A. T. Vieira, A. Ng, J. Kranich, F. Sierro, D. Yu, H. C. Schilter, M. S. Rolph, F. Mackay, D. Artis, R. J. Xavier, M. M. Teixeira, and C. R. Mackay. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461:1282-1286.
380. Vinolo, M. A., G. J. Ferguson, S. Kulkarni, G. Damoulakis, K. Anderson, Y. M. Bohlooly, L. Stephens, P. T. Hawkins, and R. Curi. 2011. SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One* 6:e21205.
381. Park, J. S., E. J. Lee, J. C. Lee, W. K. Kim, and H. S. Kim. 2007. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *International immunopharmacology* 7:70-77.
382. Tedelind, S., F. Westberg, M. Kjerrulf, and A. Vidal. 2007. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 13:2826-2832.
383. Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase, and H. Ohno. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504:446-450.
384. Cipolletta, D., M. Feuerer, A. Li, N. Kamei, J. Lee, S. E. Shoelson, C. Benoist, and D. Mathis. 2012. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486:549-553.
385. Bruno, F. A., W. E. V. Lankaputhra, and N. P. Shah. 2002. Growth, Viability and Activity of Bifidobacterium spp. in Skim Milk Containing Prebiotics. *Journal of food science* 67:2740-2744.
386. Cani, P. D., A. M. Neyrinck, F. Fava, C. Knauf, R. G. Burcelin, K. M. Tuohy, G. R. Gibson, and N. M. Delzenne. 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50:2374-2383.
387. Russo, F., M. Linsalata, C. Clemente, M. Chiloiro, A. Orlando, E. Marconi, G. Chimienti, and G. Riezzo. 2012. Inulin-enriched pasta improves intestinal permeability and modifies the circulating levels of zonulin and glucagon-like peptide 2 in healthy young volunteers. *Nutrition research* 32:940-946.
388. Westerbeek, E. A., A. van den Berg, H. N. Lafeber, W. P. Fetter, and R. M. van Elburg. 2011. The effect of enteral supplementation of a prebiotic mixture of non-human milk galacto-, fructo- and acidic oligosaccharides on intestinal permeability in preterm infants. *Br J Nutr* 105:268-274.
389. Cani, P. D., S. Possemiers, T. Van de Wiele, Y. Guiot, A. Everard, O. Rottier, L. Geurts, D. Naslain, A. Neyrinck, D. M. Lambert, G. G. Muccioli, and N. M. Delzenne. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58:1091-1103.
390. Everard, A., C. Belzer, L. Geurts, J. P. Ouwerkerk, C. Druart, L. B. Bindels, Y. Guiot, M. Derrien, G. G. Muccioli, N. M. Delzenne, W. M. de Vos, and P. D. Cani. 2013. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:9066-9071.