

Défaut du trafic endosomal Rab4b-dépendant dans les lymphocytes T lors de l'obésité: un nouveau mécanisme de la résistance à l'insuline

Introduction:

La résistance à l'insuline est une des caractéristiques du diabète de type 2 (DT2) et est très souvent associée à l'obésité. De nombreuses études ont démontré une relation étroite entre anomalies d'expansion et/ou de fonction du tissu adipeux (TA) et le développement de la résistance à l'insuline et du DT2. Le TA joue un rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie lipidique et énergétique par sa capacité à stocker les triglycérides en condition de balance énergétique positive et à libérer des acides gras en cas de besoin d'énergie. Cette fonction de stockage est également cruciale pour éviter l'accumulation de lipides toxiques pour leur sensibilité à l'insuline dans d'autres organes métaboliques (foie, muscles...). Le TA est également un organe endocrine sécrétant de nombreuses hormones et cytokines, les adipokines, qui contrôlent l'homéostasie gluco-lipidique, la prise alimentaire, et la dépense énergétique.

L'inflammation métabolique chronique de bas grade est maintenant reconnue comme un processus clé du développement de la résistance à l'insuline. Cette inflammation du TA participe aux modifications d'expansion et aux anomalies des fonctions endocrines et de stockage de ce tissu. Cependant, un certain niveau d'inflammation au sein du TA est également requis pour permettre son expansion lors d'un apport énergétique accru. Des modifications des populations de cellules immunitaires dans le TA pourraient être un événement clé dans la balance entre inflammation « physiologique » et inflammation pathologique impliquée dans la dysfonction du TA et la résistance à l'insuline. Ainsi, il a été montré que, au cours du développement de l'obésité, le phénotype et les propriétés des macrophages du TA (ATM) sont modifiés et cela impacte sur l'expansion du TA et participe au développement de la résistance à l'insuline. Cependant, les causes des modifications fonctionnelles des ATMs lors de l'obésité sont encore mal comprises.

Les lymphocytes T sont des partenaires immunitaires des macrophages et des modifications de l'homéostasie des lymphocytes T au sein du TA participent au développement de son inflammation lors de l'obésité. Les quelques études disponibles sur les cinétiques de modifications des cellules immunitaires lors de l'installation de l'obésité chez la souris démontrent que les modifications de la population de lymphocytes T précèdent celle des macrophages. Les perturbations de l'homéostasie des lymphocytes T au sein du TA pourraient donc moduler le phénotype inflammatoire des macrophages mais aussi des adipocytes et ainsi participer au développement de la résistance à l'insuline. Il est donc important d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les modifications de populations des cellules T dans le TA lors de l'obésité. **Nous avons émis l'hypothèse que Rab4b, un membre de la famille des protéines Rabs impliqué dans le recyclage endocytotique, pourrait être un acteur important dans le contrôle des lymphocytes T lors de l'obésité.**

Avancées majeurs du travail de recherche:

Nous avons démontré que l'expression de Rab4b était diminuée dans les lymphocytes T du tissu adipeux (TA) de souris et de patients obèses lors de l'obésité. **Grâce au financement SFD-MSD, nous avons pu mettre en évidence, chez la souris, que le niveau d'expression de Rab4b dans les lymphocytes T du TA est inversement corrélé à la glycémie à jeun, au poids des tissus adipeux épидidymaires et à l'aire sous courbes des GTT (point 3 du projet). Ces résultats suggèrent un rôle important de la réduction de l'expression Rab4b dans les lymphocytes T sur le métabolisme gluco-lipidique.** Pour comprendre ce rôle de Rab4b, nous avons généré des souris invalidées pour Rab4b spécifiquement dans les lymphocytes T (Rab4b^{Tcell KO}). La caractérisation métabolique par une approche cinétique (10, 25 et 35 semaines) de ces souris avait permis de montrer, sous régime normal, une apparition progressive de la résistance à l'insuline (25 sem.) puis dès 35 semaines une intolérance au glucose due à une dyslipidémie et au dépôt de lipides ectopiques dans le foie et le muscle. La dyslipidémie s'explique par un défaut d'expansion du tissu adipeux dû à une réduction de la différenciation adipocytaire. **Grace au financement SFD-MSD, nous avons pu montrer que le défaut de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et des pré-adipocytes, observée *in vivo*, n'est pas intrinsèque à ces cellules, puisqu'aucune différence de différenciation n'a été observée *in vitro* (point 2.1. du projet). De plus, nous montrons que le sécrétome des TA des souris Rab4b^{Tcell KO} de 10 semaines inhibe la différenciation des 3T3-L1 *in vitro*. De manière intéressante, l'étude des cytokines présentes dans ce sécrétome (point 2.3. du projet) met en avant une augmentation de la sécrétion, entre autre, d'IL-6 et d'IL-17, deux cytokines capables d'inhiber la différenciation adipocytaire. Par**

une analyse en cytométrie en flux des populations présentes dans le TA à 10 semaines, nous montrons que l'invalidation de Rab4b dans les lymphocytes T provoque une réduction du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et Trégradeurs (Treg) et une augmentation du nombre de lymphocytes Th17. Étant donné la dichotomie de la différenciation Treg/Th17, nos résultats suggèrent que Rab4b pourrait contrôler cette balance de différenciation des lymphocytes T. Nous confirmons cette hypothèse *in vitro*, en montrant que les Th0 invalidés pour Rab4b se différencient préférentiellement en Th17 et cela même en présence du cocktail de différenciation utilisé pour favoriser une différenciation en Treg (TGFβ et sans IL6). **Ces résultats suggèrent que la réduction de Rab4b dans les lymphocytes T observée durant l'obésité participe à la mise en place des défauts métaboliques en perturbant le dialogue entre les cellules de l'immunité adaptative et les adipocytes. Ces travaux qui ont pu être terminés grâce au financement SFD-MSD, feront l'objet d'une publication en cours d'écriture. De plus, ces travaux vont être présentés aux sessions poster de l'AFERO (janvier 2017, Toulouse) et de l'IR2017 (avril 2017, Nice) et un résumé a été soumis à l'European Congress on Obesity 2017 (Mai 2017, Porto).**

Nous avons ensuite voulu, grâce au financement SFD-MSD, mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le défaut de différenciation Treg vs Th17 (Point 1 du projet). Rab4b étant une protéine du recyclage endosomal, nous nous sommes dans un premier temps demandé si la quantité à la membrane des récepteurs importants pour la différenciation/fonctions des lymphocytes T n'était pas altérée, expliquant ainsi leurs défauts de différenciation. Nos résultats préliminaires obtenus par cytométrie en flux démontrent que l'invalidation de Rab4b dans les lymphocytes T diminue la localisation membranaire (mais pas l'expression) du complexe TCR/CD3 et du corécepteur CD28, et augmente fortement la localisation membranaire (mais pas l'expression) du récepteur de l'IL-6. De manière intéressante, cet effet est spécifique de ces récepteurs puisqu'aucune modification n'a été retrouvée pour les corécepteur CD4 et ICOS, et pour les récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-4. L'IL-6 étant nécessaire à la différenciation en Th17 et inhibant la différenciation en Treg, il est possible que l'augmentation membranaire du récepteur de l'IL-6 favorise *in vivo* la différenciation en Th17. Néanmoins cela n'explique pas nos résultats de différenciation *in vitro* favorisant la différenciation en Th17 en absence d'IL-6 (milieu de différenciation Treg). Le métabolisme des lymphocytes T est un déterminant de leur différenciation en Treg vs Th17, nous nous sommes demandé si l'invalidation de Rab4b ne pouvait pas modifier le métabolisme des Th0 et expliquer le défaut de différenciation *in vitro*. Les résultats de l'analyse de la respiration des lymphocytes Th0 par le Seahorse, montrent une diminution de la respiration mitochondriale et de la production d'ATP. De plus, la production de lactate en réponse au glucose semble réduite dans les lymphocytes Th0 invalidés pour Rab4b. Nous avons confirmé ce résultat par un dosage du lactate dans le milieu de culture des Th0 après 72h. Néanmoins cette baisse n'est pas due à une diminution de la glycolyse, puisque la quantité de glucose dans le milieu de culture des Th0 des souris Rab4b^{T cell KO} après 72h est réduit et que la capture par ces cellules du 6-NBDG (analogue fluorescent du glucose) est plus élevée que dans les cellules isolées des souris contrôles. **Ces résultats démontrent qu'un changement métabolique se produit dans les Th0 invalidés pour Rab4b, favorisant l'entrée massive de glucose, mais poussant la glycolyse vers une autre voie que la production de lactate et d'ATP.** Dans l'année qui nous reste, nous tenterons de déterminer quelles sont ces voies et comment ce changement métabolique contrôle la différenciation Treg vs Th17. Pour cela, nous caractériserons le métabolome de ces cellules. Nous explorerons, par des approches d'inhibiteur pharmacologique, le rôle de la voie des pentoses phosphates, des serines et de la lipogenèse *de novo* dans cette différenciation en faveur des Th17. Nous étudierons aussi les mécanismes moléculaires impliqués en caractérisant les voies de signalisation cellulaire impliqués dans le métabolisme (mTOR, AKT, HIF1...).

Conclusion :

L'aide financière apportée par l'allocation MSD-SFD m'a permis de finir la caractérisation métabolique des souris invalidées pour Rab4b. Ce travail déjà présenté dans des congrès est en cours d'écriture et sera soumis très prochainement. Cette aide m'a également permis d'avancer sur les mécanismes moléculaires responsables des changements de l'homéostasie des lymphocytes T. L'étude de ces mécanismes est important dans l'objectif d'essayer de contrecarrer ces défauts lors de l'obésité et de restaurer une homéostasie normale des lymphocytes T lors de l'obésité.